**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA**

**BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS
RELACIONADOS À ATIVIDADE DA DOENÇA
PERIODONTAL EM DIABÉTICOS**

PRISCILA PAGANINI COSTA

PG.PERIO
FORP-USP

**RIBEIRÃO PRETO
2012**

PRISCILA PAGANINI COSTA

**BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS RELACIONADOS À ATIVIDADE
DA DOENÇA PERIODONTAL EM DIABÉTICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Mario Taba Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central
do Campus USP - Ribeirão Preto

Costa, Priscila Paganini

Biomarcadores diagnósticos relacionados à atividade da doença
periodontal em diabéticos.
Ribeirão Preto, 2012.

180p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Periodontia.

Orientador: Taba, Mario Jr.

Coorientador: Souza, Sérgio Luís Scombatti.

1. Biomarcadores. 2. Periodontite crônica. 3. Diabetes mellitus

Trabalho realizado na Clínica de Pós-graduação e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de CTBMF e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número: 2008/11033-9.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Paganini Costa

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

5) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais **João e Ana Maria**, que sempre me guiaram e apoiaram, com dedicação, confiança e carinho, não medindo esforços para me proporcionar a melhor formação. A vocês, minha eterna gratidão e todo o meu amor.

Às minhas irmãs **Alessandra, Andréa e Cíntia**, pelo estímulo e carinho. Agradeço ao ombro amigo, e pela força que vocês sempre me oferecem.

Ao **Rodrigo**, por compartilhar os momentos, pelo apoio em todas as decisões, por me incentivar sempre, por toda a dedicação e companheirismo. Amo você!

Agradecimento Especial

A Deus,
pelo o dom da vida.

À minha família,
especialmente, aos meus cunhados, pelo carinho,
e aos meus sobrinhos, alegrias do meu viver.

Ao meu orientador
Prof. Dr. Mario Taba Jr,
pela confiança em todos os momentos,
desde os primeiros trabalhos e projetos,
pela sabedoria e experiência sempre compartilhadas,
e pela atenção e tranquilidade em todos os passos deste estudo.

Agradecimientos

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo.

Aos professores do curso de Periodontia **Arthur Belém Novaes Jr, Márcio Fernando de Moraes Grisi, Sérgio Luís Scombatti de Souza e Daniela Bazan Palioto**, pelo profissionalismo, que conduziram o curso, pelo apoio e oportunidades para a construção do meu currículo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela bolsa de estudos para realização do curso de doutorado (processo Nº 2008/11033-9).

A **todos os professores** que contribuíram para minha formação, serei eternamente grata a todos vocês.

À **Viviane Mariguela, Ingrid Ribeiro e Janine Montenegro**, pela prestatividade, amizade e auxílio na realização deste trabalho.

À amiga e profa. **Maria Letícia Bucchianeri Pinheiro** pelo convívio, amizade, incentivo e dedicação na minha formação profissional.

À profa. **Maria Cristina Foss** e às funcionárias **Ivanilda e Marivone**, pela colaboração e atenção durante o período em que estive no Hospital das Clínicas e no Centro de Saúde Escola.

Aos meus **pacientes**, pela cooperação e esforço, sem os quais este trabalho não seria possível.

Às amigas **Adriana, Flávia e Luciana**, que estiveram comigo desde o início de doutorado, pelo apoio e amizade em todos os momentos dessa longa caminhada e pela maravilhosa convivência. Sentirei saudades!

A todos os funcionários da FORP pelo profissionalismo, atenção e amizade ao longo desses anos de convivência, em especial **Tatiana, Dulce, Suely, Zilda, Fabíola, Adriana, Isabel Sola e Regiane Moi**.

Aos colegas e amigos de doutorado, **Danilo, Luciana Maia e Patrícia**, e do mestrado, **Carolina Delmondes, Carolina Mandetta, Carolina Scanavez, Igor, Lívia, Lauro e Umberto** por compartilharem os momentos desta trajetória.

A **todos**, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

COSTA, PP. **Biomarcadores diagnósticos relacionados à atividade da doença periodontal em diabéticos.** 2012. 180 p. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O objetivo geral deste estudo foi monitorar a atividade da doença periodontal e sugerir potenciais biomarcadores salivares relacionados a esta atividade em pacientes com periodontite crônica associada ou não Diabetes mellitus tipo 2, a partir da avaliação do perfil da expressão gênica de sítios periodontais progressivos e de proteínas inflamatórias salivares. Foram incluídos 56 pacientes, sendo 21 com periodontite crônica (DP), 20 com periodontite crônica associada ao Diabetes mellitus tipo 2 (DP+DM) e 15 periodontal e sistemicamente saudáveis (controle). Foi realizado exame radiográfico antes e dois meses após a terapia periodontal básica, e posteriormente foi feita a subtração radiográfica a partir dos pares das radiografias. As medidas das áreas com perda de densidade foram registradas. Coleta de saliva não estimulada, verificação da hemoglobina glicada (HbA1c) e exame clínico periodontal – profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção relativo (NCIR), sangramento à sondagem (SS) e índice de placa (IP) – também foram realizados antes e dois meses após a terapia periodontal básica. Os sítios periodontais com perda de inserção progressiva ≥ 1 mm na reavaliação foram considerados ativos de acordo com uma adaptação do método de tolerância. Biópsias de tecido gengival de sítios ativos e inativos com parâmetros clínicos semelhantes foram analisadas com *real time PCR Array* para análise do perfil de expressão gênica da resposta imune-inflamatória. As amostras de saliva foram submetidas ao imunoensaio *Multiplex Cytokine Profiling* para análise de expressão de proteínas. No grupo DP, 9% dos sítios foram classificados como ativos e no grupo DP+DM, 12% ($p > 0,05$). A média de perda de inserção clínica foi maior no grupo DP+DM (1,34 mm) em relação ao grupo DP (1,21 mm) ($p < 0,05$). Houve correlação entre a perda de inserção clínica e a área da perda de densidade radiográfica tanto nos sítios ativos do grupo DP ($R = 0,79$; $p = 0,001$), quanto do grupo DP+DM ($R = 0,86$; $p < 0,001$). Ambos os grupos DP e DP+DM apresentaram um perfil *down-regulated* em relação aos pacientes saudáveis (grupo controle). Quando comparado o grupo DP+DM ao grupo DP, pacientes diabéticos apresentaram um perfil *up-regulated*. Sítios ativos do grupo DP mostraram nove genes (ABCF1, CD40LG, IL10, IL5, CCR2, CCR4, CCR7, CCL18 e CXCL1) diferencialmente expressos ($p < 0,05$) com um perfil *up-regulated*. Sítios ativos do grupo DP+DM mostraram seis genes (LTA, CXCR1, CCL19, CCL8, CCL17 e CXCL12) diferencialmente expressos ($p < 0,05$) com um perfil *up-regulated*. Após a terapia periodontal básica, houve uma significativa redução de algumas proteínas salivares (IL1b, IL1ra, IL10, IL17, TGFb, IL8, eotaxin e MCP-3) nos grupos DP e DP+DM, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Concluindo, este estudo foi capaz de monitorar a atividade da doença periodontal em pacientes com e sem diabetes após a terapia periodontal básica; foi possível identificar genes diferencialmente expressos em sítios ativos de ambos os grupos, que podem ser úteis na indicação de potenciais biomarcadores para diagnóstico da doença periodontal na fase ativa; as proteínas salivares analisadas mostram uma tendência em diferenciar o padrão de saúde e de doença, podendo ser futuramente utilizadas como potenciais biomarcadores de periodontite associada ou não ao diabetes.

Palavras-chave: Biomarcadores; Periodontite crônica; Diabetes mellitus.

Abstract

COSTA, PP. **Diagnostic biomarkers related to periodontal disease activity in diabetics**. 2012. 180 p. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The overall aim of this study was to monitor the periodontal disease activity and suggest potential salivary biomarkers related to this activity in chronic periodontitis patients with or without type 2 Diabetes mellitus (DM), based on the evaluation of gene expression profile of progressive periodontal sites and salivary inflammatory proteins. Fifty-six patients were enrolled, 21 with chronic periodontitis (PD group), 20 with chronic periodontitis and DM (PD+DM group) and 15 periodontal- and systemically healthy (control). Radiographs were taken before and two months after non-surgical periodontal therapy, and radiographic subtraction was performed from pairs of these radiographs. Measurements of the areas with density loss were recorded. Unstimulated saliva collection, glycated hemoglobin (HbA1c) measurement and periodontal examination – probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (rCAL), bleeding on probing (BOP) and plaque index (PI) – were also conducted before and two months after non-surgical periodontal therapy. The periodontal sites with progressive attachment loss ≥ 1 mm at the recall visit were considered active sites according to the adapted method of tolerance. Gingival biopsies of active and non-active sites with similar clinical parameters were harvested for gene expression analysis of the immune-inflammatory response with Real Time PCR Array. Saliva samples were analyzed by Multiplex Cytokine Profiling Immunoassay for analysis of protein expression profile. In PD group, 9% of the sites were classified as active and in PD+DM group, 12% ($p > 0.05$). The clinical attachment loss mean was higher in the PD+DM group (1.34 ± 0.23 mm) compared to the PD group (1.21 ± 0.16 mm) ($p < 0.05$). There was a correlation between clinical attachment loss and darkened radiographic areas in active sites of the PD group ($R = 0.79$, $p = 0.001$) and PD+DM group ($R = 0.86$, $p < 0.001$). Both PD and PD+DM groups showed a down-regulated profile compared to healthy subjects (control group). When compared PD group to PD+DM, patients with diabetes had an up-regulated profile. Active sites of the PD group showed nine genes (ABCF1, CD40LG, IL10, IL5, CCR2, CCR4, CCR7, CCL18 and CXCL1) differentially expressed ($p < 0.05$) with an up-regulated profile. Active sites of the PD+DM group showed six genes (LTA, CXCR1, CCL19, CCL8, CCL17 and CXCL12) differentially expressed ($p < 0.05$) with an up-regulated profile. After non-surgical periodontal therapy, there was a significant reduction of clinical parameters and HbA1c levels ($p < 0.05$), accompanied by a reduction of some salivary proteins (IL1b, IL1ra, IL10, IL17, TGFb, IL8, eotaxin and MCP-3) in groups PD and PD+DM, but without statistically significant difference ($p > 0.05$). In conclusion, this study was able to monitor the periodontal disease activity in periodontal patients with or without diabetes after the non-surgical periodontal therapy; it was possible to identify genes differentially expressed in active sites from both groups, which may be considered useful in indicating potential biomarkers for the diagnosis of active periodontal disease; salivary proteins show a trend in distinguishing the standard of health and disease and may be used in the future as potential biomarkers of periodontitis with or without diabetes.

Keywords: Biomarkers; Chronic periodontitis; Diabetes mellitus.

Lista de Figuras e Tabelas

Material e Métodos	Página
Figura 1	40
Figura 2	41
Figura 3	42
Figura 4	44
Tabela 1	46
Figura 5	47
Tabela 2	48
Figura 6	48
Tabela 3	49
Artigo I	
Tabela 4	54
Figura 7	55
Figura 8	55
Figura 9	56
Figura 10	56
Figura 11	57
Figura 12	57
Figura 13	58
Figura 14	58
Figura 15	59
Artigo II	
Tabela 5	85
Tabela 6	86
Tabela 7	87
Tabela 8	88
Figura 16	89
Tabela 9	91
Figura 17	91
Tabela 10	92
Figura 18	92
Tabela 11	93
Figura 19	95
Tabela 12	97

Figura 20	99
Tabela 13	101
Figura 21	102
Tabela 14	103
Figura 22	103
Tabela 15	104
Figura 23	104
Artigo III	
Tabela 16	130
Tabela 17	131
Figura 24	132
Figura 25	133
Figura 26	133
Figura 27	134
Figura 28	134
Figura 29	135
Figura 30	135
Tabela 18	136

Lista de Abreviaturas e Siglas

%:	porcentagem
°C:	grau Celsius
µg:	micrograma
µl:	microlitro
6Ckine (CCL21):	ligante de quimiocina (motif C-C)
ABCF1:	cassete de ligação de ATP, subfamília F (GCN20), membro 1
ACTB:	actina beta
AGEs:	produtos finais da glicação avançada
<i>Aids:</i>	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
BCA-1:	quimiocina 1 atraente de células B
BCL6:	célula-B CLL/Linfoma 6
B2M:	microglobulina beta-2
CARD18:	família de domínio de recrutamento de caspase, membro 18
C3:	componente do complemento 3
C4A:	componente do complemento 4A
C5:	componente do complemento 5
CCL:	ligante de quimiocina (motif C-C)
CCR:	receptor de quimiocina (motif C-C)
CD40LG:	ligante CD40
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementar
CEBPB:	CCAAT/ proteína intesificadora de ligação (C/EBP), beta
CRP:	proteína C-reativa, relacionada à pentaxina
Ct:	ciclo limiar (cycle threshold)
CXCL:	ligante de quimiocina (motif C-X-C)
CX3CR1:	<i>chemokine (C-X3-C motif) receptor 1</i>
DM:	pacientes com Diabetes mellitus
DP:	pacientes com periodontite crônica
DP+DM:	pacientes com periodontite e Diabetes mellitus
ELISA:	ensaio imunoenzimático
ENA-78 (CXCL5):	ligante de quimiocina 5 (motif C-X-C)
g:	gravidade
GAPDH:	desidrogenase fosfato-3-gliceraldeído
HbA1c:	hemoglobina glicada A1c
HPRT1:	fosforibosiltransferase hipoxantina
I-309:	quimiocina CC

ICTP:	piridinolina interligada ao telopeptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I
IL:	interleucina
IL1F5:	família da Interleucina 1, membro 5 (delta)
IL1F6:	família da Interleucina 1, membro 6 (epsilon)
IL1F7:	família da Interleucina 1, membro 7 (zeta)
IL1F8:	família da Interleucina 1, membro 8 (eta)
IL1F9:	família da Interleucina 1, membro 9
IL1F10:	família da Interleucina 1, membro 10 (theta)
IL1R1:	receptor de interleucina 1, tipo 1
IL1RN (IL1ra):	receptor antagonista de interleucina 1
IL5RA:	receptor de interleucina 5, alfa
IL9R:	receptor de interleucina 9
IL8RA:	receptor de Interleucina 8, alfa
IL8RB:	receptor de Interleucina 8, beta
IL10RA:	receptor de interleucina 10, alfa
IL10RB:	receptor de interleucina 10, beta
IL13RA1:	receptor de interleucina 13, alfa 1
INF:	interferon
IP:	índice de placa
IP10:	proteína imune 10
LTA:	linfotóxina alfa (Superfamília TNF, membro 1)
LTB:	linfotóxina beta (Superfamília TNF, membro 3)
LTB4R:	receptor de leucotrieno B4
MCP:	proteína quimiotática de monócito
MIP:	proteína inflamatória de macrófagos
mg:	miligrama
MIF:	fator inibitório de migração de macrófago
min.:	minuto
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mm ² :	milímetro quadrado
MMP:	metaloproteinase da matriz
n:	número
n. dentes:	número de dentes

NICR:	nível clínico de inserção relativo
OPG:	osteoprotegerina
PE:	ficoeritrina
PS:	profundidade de sondagem
PS $\leq$ 3:	profundidade de sondagem $\leq$ 3 mm
PS 4-6:	profundidade de sondagem entre 4 e 6 mm
PS $\geq$ 7:	profundidade de sondagem $\geq$ 7 mm
R:	valor da correlação
RAGEs:	receptores para produtos finais da glicação avançada
RANKL:	ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear
RNA:	ácido ribonucléico
RNAse:	enzima ribonuclease
RPL13A:	proteína ribossomal L13a
RT-PCR:	reação em cadeia de polimerase em tempo real
SCYE1:	pequenas subfamílias de indução de citocinas E, membro 1 (ativação de monócitos endoteliais)
sCD40L:	ligante CD40 solúvel
sIL2Ra:	receptor de interleucina 2, alfa, solúvel
SPP1:	fosfoproteína 1 secretada
SS:	sangramento à sondagem
seg.:	segundo
TARC:	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TIFF:	<i>tagged image file format</i>
TNF:	fator de necrose tumoral
TGF:	fator de crescimento transformante
TOLLIP:	proteína de interação Toll
XCR1:	receptor de quimiocina 1 (motif C)

Sumário

1. JUSTIFICATIVA.....	26
2. INTRODUÇÃO	30
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Seleção de pacientes	38
4.2 Exame clínico periodontal	39
4.3 Subtração radiográfica	40
4.4 Controle metabólico	42
4.5 Coleta de saliva	42
4.6 Terapia periodontal básica	42
4.7 Determinação da atividade da doença periodontal	43
4.8 Coleta do tecido gengival (biópsia)	43
4.9 Extração de RNA.....	44
4.10 Síntese de cDNA	45
4.11 Análise da expressão gênica	45
4.12 Análise de proteínas salivares	48
4.13 Análise estatística	50
5. ARTIGO I	52
5.1 Resultados	53
5.1.1 Sítios periodontais	53
5.1.2 Análise radiográfica	57
5.2 Discussão e conclusão.....	59
5.3 Artigo em inglês.....	63
6. ARTIGO II	83
6.1 Resultados	84
6.1.1 Parâmetros clínicos periodontais	84
6.1.2 Análise da expressão gênica	86
6.2 Discussão e conclusão.....	104
6.3 Artigo em inglês.....	109
7. ARTIGO III	128
7.1 Resultados	129

7.1.1 Parâmetros clínicos periodontais	129
7.1.2 Análise de proteínas salivares	132
7.1.3 Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares.....	136
7.2 Discussão e conclusão.....	136
7.3 Artigo em inglês.....	140
8. CONCLUSÕES DA TESE.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
ANEXOS	178

1. Justificativa

A periodontite crônica é, atualmente, a forma mais prevalente da doença periodontal destrutiva e uma das principais causas de perda dentária em adultos (Silva *et al.*, 2007). Segundo Albandar *et al.* (2002), a periodontite crônica afeta mais de 50% da população adulta nos Estados Unidos. Portanto, o diagnóstico da fase ativa da doença e a identificação de pacientes com risco de doença teriam grande impacto na saúde bucal da população mundial.

O diagnóstico periodontal tradicional inclui parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa e exame radiográfico para verificação da perda óssea alveolar (Lamster; Grbic, 1995; Armitage, 2004). Embora tenha bom custo-benefício e seja relativamente fácil de usar e não invasiva, a avaliação do nível clínico de inserção por sonda periodontal manual verifica apenas danos decorrentes de episódios passados de destruição tecidual. Adicionalmente, a perda tecidual só é detectada a partir de uma mudança mínima de 2 a 3 mm na avaliação deste parâmetro clínico. O uso da subtração radiográfica tem sido utilizado como meio para detectar alterações mínimas na densidade óssea, podendo contribuir para o diagnóstico periodontal. Entretanto, tanto os parâmetros clínicos como a subtração radiográfica não têm capacidade para identificar pacientes altamente suscetíveis à progressão da doença (Goodson, 1992; Giannobile *et al.*, 2009).

Avanços nas pesquisas de diagnóstico periodontal estão direcionando os métodos para que o risco e a atividade da doença possam ser identificados e quantificados por meio de biomarcadores, que podem ser encontrados em amostras de fluido crevicular gengival, soro e saliva (Ebersole *et al.*, 1997; Taba *et al.*, 2005).

A saliva, um fluido bucal elaborado a partir das secreções de glândulas salivares, é uma valiosa fonte de informação clinicamente relevante por conter proteínas produzidas localmente devido ao processo inflamatório periodontal, bem como outras moléculas da circulação sistêmica (Miller *et al.*, 2006). Isso a torna uma potencial candidata para identificar biomarcadores que reflitam as alterações da periodontite e de outras doenças bucais e sistêmicas. Atualmente, já existem testes salivares para o diagnóstico e a identificação do risco ao desenvolvimento de determinadas doenças sistêmicas como *Aids* e hepatite, bem como na avaliação da atividade de cárie (Taba *et al.*, 2005).

O desencadeamento da periodontite ocorre devido ao desequilíbrio entre bactérias periodontopatogênicas e resposta do hospedeiro, o que gera uma

descarga de componentes relacionados aos processos biológicos da doença – inflamação, destruição do tecido conjuntivo e remodelação do osso alveolar (Ng *et al.*, 2007; Gonçalves Lda *et al.*, 2010). Estes componentes do processo inflamatório e destrutivo dos tecidos periodontais têm sido detectados em níveis elevados na saliva total de pacientes com periodontite, tornando-os biomarcadores putativos da doença (Sorsa *et al.*, 1994; Lamster, 1997; Faizuddin *et al.*, 2003; Lamster *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2006; Lda Gonçalves *et al.*, 2010). O diabetes apresenta um estado hiperinflamatório que pode modificar a resposta do hospedeiro na doença periodontal. Por isso, produz também uma descarga de proteínas que podem ser refletidas na saliva (Costa *et al.*, 2010).

A análise da saliva pode ser especialmente benéfica na determinação do estado periodontal atual, por meio da busca de biomarcadores que possam caracterizar melhor a periodontite (Taba *et al.*, 2005). Estudos têm indicado que a determinação dos níveis de biomarcadores inflamatórios em fluidos biológicos são bons indicadores da atividade inflamatória, além de examinarem se marcadores bioquímicos e imunológicos na saliva podem refletir a extensão da destruição periodontal (Ozmeric, 2004; Miller *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Sexton *et al.*, 2011).

Especificamente, interleucina (IL)-1 β , proteína C-reativa, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1a, metaloproteinase da matriz (MMP)-8 e -9, osteoprotegerina (OPG), fator de necrose tumoral (TNF)- α , ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear (RANKL) e piridinolina interligada ao telopeptídeo carboxiterminal de colágeno tipo I (ICTP) (Bertolini *et al.*, 1986; Pederson *et al.*, 1995; Christodoulides *et al.*, 2005; 2007; Gorska; Nedzi-Gora, 2006; Miller *et al.*, 2006; 2010; Ng *et al.*, 2007; Scannapieco *et al.*, 2007; Frodge *et al.*, 2008; Tobon-Arroyave *et al.*, 2008; Gursoy *et al.*, 2009) parecem ser mediadores inflamatórios que prometem ajudar no reconhecimento de alguns aspectos da periodontite. Além disso, algumas destas proteínas têm sido estudadas em pacientes portadores de periodontite associada a outras doenças inflamatórias sistêmicas como Diabetes mellitus (Costa *et al.*, 2010) e artrite reumatóide (Mirrielees *et al.*, 2010).

Contudo, devido à complexa natureza da doença periodontal, é altamente improvável que um único biomarcador irá provar ser uma medida isolada para o diagnóstico da doença periodontal. Além disso, é importante salientar que o diferencial do diagnóstico por meio de biomarcadores na saliva deve ser a

verificação da atividade da doença e o risco futuro. Assim, estudos que avaliem um conjunto de biomarcadores salivares não somente no estado momentâneo da doença periodontal como também a atividade da doença parece promissor na área do diagnóstico periodontal (Kaufman; Lamster, 2000; Ozmeric, 2004; Nakashima *et al.*, 1996).

Justifica-se, dessa forma, a necessidade de um estudo que relacione a análise de parâmetros clínicos e radiográficos e o perfil gênico de sítios com doença periodontal em atividade com a expressão de proteínas na saliva para identificação de possíveis biomarcadores salivares relacionados à atividade da doença.

2. Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória que se caracteriza pela perda de inserção e perda óssea ao redor dos dentes, associada à formação de bolsas periodontais devido à migração apical do epitélio juncional. A periodontite crônica é a forma mais comum de doença periodontal destrutiva na população adulta. Especificamente na periodontite crônica, a presença de irritantes locais é compatível com a severidade da doença e a taxa de progressão é normalmente baixa ou moderada e pode apresentar períodos de rápida progressão (Armitage, 1999). Entretanto, embora a ação bacteriana seja primordial no início e na manutenção da periodontite, a susceptibilidade e a progressão da doença são determinadas pela resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (Socransky; Haffajee, 1992; Offenbacher, 1996; Taba *et al.*, 2005; Van Dyke; Sheilesh, 2005). Variações na taxa de progressão e severidade da periodontite podem ocorrer até mesmo sob condições semelhantes de controle e acúmulo de biofilme dental (Van Dyke; Sheilesh, 2005).

Löe *et al.* (1986) realizaram um estudo longitudinal em um grupo de plantadores de chá do Sri Lanka. Neste estudo, os autores verificaram que, embora vivendo sob as mesmas condições de saúde, dieta alimentar, higiene bucal e ausência de cuidados odontológicos especializados, os indivíduos apresentavam diferentes formas de destruição periodontal. Os autores atribuíram a diferença na severidade e progressão da doença a fatores relacionados ao hospedeiro.

Segundo a teoria da progressão da doença periodontal, a periodontite é uma doença intermitente e cíclica, com períodos de exacerbação e remissão. Esse modelo de atividade da doença foi utilizado para explicar uma aparente variabilidade da progressão da doença observada por meio de parâmetros clínicos (Reddy *et al.*, 2000). Em 1983, Haffajee Haffajee *et al.* propuseram um método para verificação da atividade da doença periodontal, que ainda tem sido utilizado por estudos recentes (Hernandez *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2010).

Vários fatores podem modificar a resposta do hospedeiro aos patógenos periodontais e, conseqüentemente, alterar a expressão e a progressão da doença. O Diabetes mellitus é reconhecido como um importante fator de risco para periodontite (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008). Essa complexidade da periodontite acrescida ao próprio comportamento sítio-específico de atividade da doença (Reddy *et al.*, 2000) dificulta a caracterização de marcadores específicos, o diagnóstico e a determinação de terapias para o indivíduo ou sítio doente.

O diabetes tipo 2, a forma mais comum dessa doença metabólica, pode modular a destruição dos tecidos periodontais pela disfunção dos leucócitos polimorfonucleares, alterações vasculares, síntese de glicosaminoglicanas e colágeno alterados, formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) com consequente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e ocorrência de um estado hiperinflamatório (Graves *et al.*, 2007). Estudos avaliando a resposta imuno-inflamatória, em pacientes diabéticos, apresentam maior expressão de citocinas associadas à progressão da periodontite nestes pacientes (Engebretson *et al.*, 2006; Navarro-Sanchez *et al.*, 2007), devido ao mecanismo de interação entre AGEs e seus receptores (RAGEs) e à obesidade (Sjöholm; Nyström, 2006).

Diversas moléculas bioquímicas estão envolvidas nas três fases biológicas da periodontite: inflamação, degradação do tecido conjuntivo e remodelação óssea alveolar (Gemmell *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2007; Sexton *et al.*, 2011). A ação das diferentes moléculas, como citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogênese da periodontite, dirige a migração e a manutenção dos diversos tipos celulares – leucócitos polimorfonucleares, células *natural-killer*, células dendríticas, macrófagos e linfócitos no tecido gengival. Estas células participam da reação imune e inflamatória agindo na eliminação do patógeno, na apresentação de antígenos e na produção de mais citocinas. Este mecanismo de auto-regulação da resposta e recrutamento seletivo dos tipos celulares leva à produção de diferentes citocinas no sítio da resposta, podendo determinar a progressão ou não doença (Garlet *et al.*, 2003). Portanto, a expressão de diferentes citocinas pode representar fenótipos e estágios de desenvolvimento da doença ou transição de fases das doenças periodontais (Gemmell *et al.*, 1997).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular envolvidas no processo inflamatório e imune. São reguladoras celulares e produzidas principalmente por linfócitos T e macrófagos (Gemmell *et al.*, 1997). Realizam diversas ações na resposta imunoinflamatória, na regulação do crescimento e diferenciação das células (Offenbacher, 1996), sendo consideradas reguladoras do processo imunoinflamatório na periodontite (Ishikawa, 2007). Já as quimiocinas ou citocinas quimiotáticas são moléculas fundamentais na migração e ativação de leucócitos, tráfico de linfóides e desenvolvimento de células T helper (Th1 e Th2), mas ainda não foram totalmente caracterizadas em relação à periodontite (Graves, 1999).

Estes mediadores inflamatórios e imunes associados à defesa do hospedeiro têm sido identificados na saliva (Taba *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010; Sexton *et al.*, 2011), sangue (Queiroz *et al.*, 2008), fluido gengival (Hernandez *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006). Níveis aumentados dessas moléculas podem estar relacionados à condição periodontal, permitindo a identificação e o monitoramento de pacientes com periodontite (Armitage, 2004).

Kumar *et al.* (2006) utilizaram biópsias gengivais para avaliação da expressão de MMP-8 e MMP-9 em pacientes portadores de periodontite crônica com ou sem Diabetes mellitus pelo método *Western Blotting* e verificaram altos níveis de MMP-8 e MMP-9 nos tecidos gengivais de diabéticos. Mengel *et al.* (2002) mensuraram IL-1 β , IL-6 e níveis de cortisol no sangue periférico de pacientes portadores de periodontite para verificar as interações com o estresse psicossocial, verificando que apenas o grupo de pacientes com periodontite agressiva não-tratada apresentava níveis significantes de IL-6 e correlação com a perda de inserção analisada.

Hernandez *et al.* (2006) avaliaram a presença de MMP-13 em amostras de fluido gengival de pacientes com atividade de periodontite crônica (sítios ativos e inativos) e determinaram a atividade de MMP-13 em lesões com episódios de perda de inserção pelo método ELISA (ensaio imunoenzimático) e a expressão de MMP-13 pelo método de *Western Blotting*. Este estudo pode concluir que a atividade de MMP-13, em fluido gengival, foi significativamente maior em sítios ativos para periodontite progressiva, suportando seu papel na perda óssea alveolar. Com base nessa linha de pesquisa, Costa *et al.* (2010) avaliaram a presença IL-6, MMP-8 e OPG na saliva de pacientes com periodontite crônica associada ao Diabetes mellitus pelo método ELISA, reforçando a ideia de que existem biomarcadores presentes na saliva específicos para diferentes aspectos da periodontite como inflamação, degradação de colágeno e remodelamento ósseo.

A análise da saliva pode ser especialmente benéfica no diagnóstico do estado periodontal atual, por meio da busca de biomarcadores que possam melhor caracterizar esta doença. A determinação dos níveis de mediadores inflamatórios em fluidos biológicos são bons indicadores de atividade inflamatória (Taba *et al.*, 2005). Outros estudos relacionados à patogênese da periodontite têm verificado se marcadores bioquímicos e imunológicos na saliva também são capazes de indicar a direção futura da progressão da doença (Champagne *et al.*, 2003; Ozmeric *et al.*, 2004; Sexton *et al.*, 2011). Além de exercer o papel protetor e lubrificante, a saliva

vem sendo agora examinada para diagnósticos como, por exemplo, do vírus da *Aids* devido à fácil manipulação, não ser invasiva e com baixo custo laboratorial. Estas características tornam a saliva útil para testes diagnósticos na periodontite (Taba *et al.*, 2005).

Portanto, os avanços na área de biologia molecular, que permitem a utilização de métodos mais específicos, fornecerão informações adicionais ao conhecimento atual da patogênese da doença, podendo contribuir para o estabelecimento de diagnóstico mais apurado e abordagens terapêuticas mais específicas e potencialmente mais previsíveis. O mapeamento da expressão gênica, por exemplo, merece ainda ser explorado a fim de contribuir para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no estabelecimento, progressão e atividade da doença e, conseqüentemente, auxiliar na seleção e validação de potenciais biomarcadores salivares para periodontite.

Adicionalmente, mais estudos devem ser realizados no sentido de selecionar um conjunto de potenciais biomarcadores salivares de pacientes com periodontite em atividade, associada ou não às doenças sistêmicas, para identificar a fase ativa da doença e pacientes com risco, fornecendo pontos chaves para o seu monitoramento e terapias futuras.

Uma vez que a periodontite apresenta ciclos de exacerbação e remissão e que pacientes acometidos por periodontite crônica, associada ou não ao Diabetes mellitus tipo 2, podem apresentar perfis diferentes de expressão gênica, o rastreamento de genes candidatos poderá trazer informações importantes a respeito do estabelecimento, progressão e atividade da doença. Tais informações serão úteis para auxiliar na seleção de potenciais biomarcadores da atividade da doença com a finalidade diagnóstica.

3. Proposição

Objetivo geral:

Este estudo se propôs a monitorar a atividade da doença periodontal e sugerir potenciais biomarcadores salivares relacionados à doença periodontal ativa em pacientes com periodontite crônica associada ou não ao Diabetes mellitus tipo 2, a partir da avaliação do perfil da expressão gênica de sítios periodontais e da avaliação de proteínas inflamatórias salivares.

Objetivos específicos:

- (i) identificar e monitorar sítios com doença periodontal em atividade;
- (ii) correlacionar a perda de inserção clínica de sítios ativos com sua respectiva área de perda óssea radiográfica;
- (iii) avaliar o perfil da expressão gênica em sítios ativos e inativos nas condições de saúde e periodontite crônica associada ou não ao diabetes tipo 2, por meio da tecnologia do *PCR Real Time Array*;
- (iv) identificar genes que se apresentaram diferencialmente expressos nos sítios ativos nas condições de periodontite crônica associada ou não ao diabetes tipo 2;
- (v) avaliar a expressão de proteínas salivares nas condições de saúde e periodontite crônica associada ou não ao diabetes tipo 2, por meio da tecnologia do imunoensaio *Multiplex Cytokine Profiling*;
- (vi) sugerir potenciais biomarcadores salivares relacionados à atividade da doença periodontal nas condições de periodontite crônica associada ou não ao diabetes tipo 2.

4. Material e Métodos

4.1 Seleção de pacientes

Este estudo foi conduzido em conjunto com o Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia e o Departamento de Medicina Interna – Divisão de Doenças Metabólicas e Endocrinológicas da Universidade de São Paulo (USP). E foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, nº 2009.1.88.58.7 (Anexo A). Todos os pacientes selecionados foram convidados a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B). Foram fornecidas informações sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo para cada participante.

Os critérios de inclusão foram: (i) presença de, no mínimo, 14 dentes naturais, sendo 10 deles posteriores; (ii) idade entre 35 e 65 anos; (iii) cinco dentes com profundidade de sondagem ≥ 5 mm e perda de inserção ≥ 3 mm (Hernandez *et al.*, 2006); (iv) pacientes sem história positiva de tabagismo; (v) não gestantes ou lactantes; (vi) sem uso de antibióticos ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; (vii) sem terapia medicamentosa, exceto para condição diabética; (viii) sem presença de outras condições inflamatórias; (ix) sem complicações graves do diabetes (retinopatia, nefropatia, neuropatia e arterosclerose). Pacientes que não eram portadores da doença periodontal (grupo controle) deveriam apresentar PS ≤ 3 mm em todos os dentes e índice de placa e sangramento $\leq 20\%$, com alguma indicação de cirurgia estética.

Pacientes com diagnóstico estabelecido de Diabetes mellitus tipo 2 (hemoglobina glicada – HbA1c $> 7\%$) (American Diabetes Association, 2009) e aderência ao tratamento para diabetes (hipoglicemiantes orais) foram recrutados do Setor Ambulatorial da Clínica de Endocrinologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Um total de 56 pacientes foi dividido em três grupos:

grupo Controle (n = 15): pacientes saudáveis periodontal e sistemicamente;

grupo DP (n = 21): pacientes sistemicamente saudáveis e com diagnóstico de periodontite crônica (Armitage, 1999);

grupo DP+DM (n = 20): pacientes com diabetes tipo 2 (diagnosticados na Clínica de Endocrinologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) e com diagnóstico de periodontite crônica (Armitage, 1999).

Apenas na análise da expressão gênica, foram acrescentados quatro pacientes com periodonto saudável, porém portadores de diabetes tipo 2 (grupo DM) a fim de alcançar um resultado mais completo.

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico periodontal, exame radiográfico e coleta de saliva inicialmente e após dois meses de terapia periodontal básica. Nos pacientes diabéticos, foi realizado também exame de HbA1c.

O seguinte desenho experimental foi proposto neste estudo:

4.2 Exame clínico periodontal

O exame clínico foi realizado por único examinador experiente no início do estudo e após terapia periodontal básica. O estado de higiene bucal foi analisado pelo índice de placa (IP), no qual depósitos de biofilme dental foram observados (sem corante) sobre as quatro superfícies de cada dente (vestibular, mesial, distal e lingual). Concomitantemente a esse procedimento, os pacientes receberam instruções de higiene bucal, incluindo a técnica de escovação, uso de fio dental e escova interdental e unitufo quando necessárias. A presença de biofilme dental foi avaliada dicotomicamente (O'Leary *et al.*, 1972).

Para as mensurações da profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção relativo (NCIR), foi utilizada uma sonda periodontal computadorizada¹ de pressão controlada (Figura 1). Foram avaliados seis sítios por dente (mésio

¹ Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA.

vestibular, vestibular, disto vestibular, méso lingual, lingual e disto lingual). A profundidade de sondagem foi medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa com a ponta tipo *pocket* e o nível clínico de inserção relativo foi medido da superfície incisal/oclusal até o fundo da bolsa com o auxílio da ponta *disk*.

Figura 1. Sonda periodontal computadorizada (ponta tipo *pocket*).

A presença do sangramento à sondagem (SS) foi considerada positiva quando ocorrida em até vinte segundos após a inserção da sonda para medida da profundidade de sondagem. As porcentagens dos sítios com sangramento, avaliados dicotomicamente, foram calculados para cada indivíduo (Ainamo; Bay, 1976). Foi também verificado o envolvimento de bifurcação com auxílio de uma sonda periodontal de Nabers².

O examinador foi calibrado para o exame clínico periodontal. A calibração avaliou a variabilidade intraexaminador para os parâmetros clínicos periodontais. Nesta calibração, o examinador avaliou três pacientes, com intervalos de 20 minutos entre os exames no mesmo paciente. O teste Kappa foi usado para aferir a calibração. O resultado do teste Kappa para as medidas de profundidade de sondagem foi de 0,92.

4.3 Subtração radiográfica

O exame radiográfico consistiu em uma série periapical completa de cada paciente no início do estudo, por meio da técnica do paralelismo, com auxílio de posicionadores radiográficos tipo *Han-Shin*. Nos dentes selecionados pela determinação de atividade de doença, ou seja, dentes com sítios periodontais ativos,

² Hu-Friedy, Chicago, IL, USA.

também foram realizadas radiografias periapicais após dois meses de terapia periodontal básica.

Em seguida, as radiografias foram digitalizadas em formato *tagged image file format* (TIFF) em um *scanner*³. Posteriormente, as radiografias iniciais e após dois meses foram utilizadas para subtração radiográfica, com o auxílio de um programa de computador específico⁴ a fim de confirmar a atividade da doença em relação à perda óssea. Somente os dentes com sítios interproximais em atividade foram incluídos nesta análise.

Os pares de imagens radiográficas foram colocados lado a lado no monitor e tiveram os níveis de cinza calibrados entre si por meio de ajuste de contraste, e foram alinhados geometricamente após a determinação de quatro pontos de referência em comum. Na imagem subtraída, mudanças entre as radiografias foram retratadas como uma área escura para perda de densidade radiográfica, cinza neutro para nenhuma diferença e uma área clareada para aumento da densidade radiográfica (Figura 2). As medidas das áreas de perda de densidade radiográfica foram calculadas em mm² com o auxílio de programa computador específico para mensurações⁵.

Como no exame clínico periodontal, foi realizada uma calibração intraexaminador para as medidas das áreas de perda de densidade radiográfica. O resultado do teste Kappa foi de 0,81.

Figura 2. A. radiografia inicial; B. radiografia após dois meses; C. radiografia digital de subtração.

³ Scanner HP 5370, Hewlett-Packard, Cupertino, California, USA.

⁴ Emago Dental Software, Oral Diagnostics Dental Systems, Amsterdam, The Netherlands.

⁵ Image Tool for Windows, version 3.00, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.

4.4 Controle metabólico

Os níveis de HbA1c foram utilizados para a avaliação metabólica nos pacientes diabéticos (grupo DP+DM) no início do estudo e após dois meses de terapia periodontal. Os pacientes foram encaminhados para o laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, em datas predefinidas para a coleta de amostras de sangue e realização do exame de HbA1c⁶. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem.

4.5 Coleta de saliva

Amostra de saliva total não estimulada (~3 ml) foi coletada de cada paciente em tubos estéreis, de acordo com protocolo de Navazesh (1993), antes e após a terapia periodontal. Os pacientes foram orientados a não ingerirem alimentos, beberem ou realizarem higiene bucal por, pelo menos, 1 hora antes da coleta da saliva. As amostras de saliva foram colocadas imediatamente no gelo e aliquotadas antes do congelamento a -80° C (Figura 3).

Figura 3. Saliva total não estimulada em tubo estéril e aliquotada.

4.6 Terapia periodontal básica

A terapia periodontal básica foi realizada por meio de raspagem e alisamento radicular em estágio único e instrução de higiene bucal acompanhada de profilaxia periódica. A raspagem e alisamento radicular foi realizada em um intervalo de até 48

⁶ Labtest Sistemas para Diagnóstico, São Paulo, SP, Brasil.

horas (Quirynen *et al.*, 1999), com aparelho de ultra-som⁷ e com curetas tipo Gracey⁸. Os pacientes retornavam uma semana após o procedimento para nova instrução de higiene bucal e início do controle do biofilme, feito com profilaxia mensal.

Os pacientes do grupo DP+DM receberam, em combinação com a raspagem, doxiciclina 100 mg⁹/dia, durante 14 dias, começando com uma dose única de 200 mg um dia antes da primeira sessão de instrumentação mecânica (O'Connell *et al.*, 2008).

4.7 Determinação da atividade da doença periodontal

Um novo exame clínico periodontal foi realizado dois meses após a terapia periodontal básica a fim de se detectar a atividade da doença, que é verificado a cada dois meses segundo o método de tolerância proposto por Haffajee *et al.* (1983). O diagnóstico da atividade foi adaptado do método de tolerância, em que os sítios foram considerados ativos quando apresentaram perda de inserção clínica ≥ 1 mm (equivalente a 3 vezes o desvio padrão da margem de erro de 0,3 mm da sonda periodontal computadorizada), após dois meses de terapia. Os sítios inativos serviram como controles dentro do mesmo indivíduo e foram definidos como aqueles com profundidade de sondagem equivalente aos sítios ativos na consulta de reavaliação, mas sem perda de inserção durante o mesmo período.

Dentes com prótese ou com lesão de bifurcação não foram considerados na determinação da atividade de doença.

4.8 Coleta do tecido gengival (biópsia)

Amostras de tecido gengival (tecido epitelial e conjuntivo) foram obtidas de um sítio ativo e inativo, do mesmo paciente, em cirurgias de acesso para raspagem ou eliminação de bolsa periodontal (Figura 4). Para as amostras do grupo controle, cirurgias com finalidade estética de áreas sem sinal de doença periodontal ou inflamação, quando indicadas, foram biopsiadas.

⁷ Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

⁸ Hu-Friedy instruments, Chigago, IL, USA.

⁹ Doxilegrand, Legrand, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

Após a coleta, as amostras foram colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e depois foram conservadas a -80°C para posteriormente serem submetidas à extração de RNA total e análise de expressão gênica.

Figura 4. Desenho esquemático referente ao local da biópsia do tecido gengival.

4.9 Extração de RNA

A extração do RNA das amostras de tecido gengival foi realizada segundo protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando-se o reagente Trizol¹⁰. Brevemente, cada fragmento de tecido gengival foi macerado em recipiente específico e homogeneizado em reagente Trizol (1 ml/mg de tecido). Para cada milímetro de suspensão, 0,2 ml de clorofórmio¹¹ foi adicionado e agitado durante 15 seg. e incubada por 3 min., à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$, por 15 min., a 4°C . Após a centrifugação, foram observadas três fases na solução, em que a fase aquosa incolor contendo o RNA foi transferida para outro tubo e acrescida de isopropanol¹². A amostra foi agitada, incubada por 20 min., a -20°C e centrifugada novamente. O *pellet* foi lavado com 1 ml de álcool etílico 100%¹³ e seco à temperatura ambiente. Após seco, o *pellet* de RNA foi ressuspenso em 150 μl de água DEPC. As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante (agarose 2% contendo 2,2 M de formaldeído e tampão MOPS 1X) para verificação de sua integridade, quantificadas em espectrofotômetro e armazenadas a -80°C .

¹⁰ Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy.

¹¹ Sigma, St Louis, MO, USA.

¹² Sigma, St Louis, MO, USA.

¹³ Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA.

4.10 Síntese de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionada a fita de DNA complementar (cDNA) por uma reação de transcrição reversa¹⁴, baseado no protocolo proposto pelo fabricante. Ao final desta reação, o cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

4.11 Análise da expressão gênica

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

A RT-PCR *Array* permitiu a análise simultânea de 84 genes relacionados à inflamação. Além dos genes de interesse (Tabela 1), as placas¹⁵ apresentavam cinco diferentes controles endógenos (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB) que garantem sensibilidade, especificidade e alta reprodutibilidade dos resultados.

¹⁴ RT² First Strand Kit, SABioscience (cód. C03), Frederick, MD, USA.

¹⁵ RT² ProfilerTM PCR Array Human Inflammatory Cytokines & Receptors (PAHS-011), SABiosciences, Frederick, MD, USA.

Tabela 1. Genes avaliados no RT-PCR Array.

quimiocinas	receptores de quimiocinas	citocinas	receptores de citocinas	outros
CCL1 (I-309)	CCR1	IL10	IL10RA	ABCF1
CCL11 (eotaxin)	CCR2	IL13	IL10RB	ICEBERG (CARD18)
CC13 (mcp-)	CCR3	IL17C	IL13	BCL6
CCL15 (MIP-1d)	CCR4	IL1A	IL13RA1	C3
CCL16 (HCC-4)	CCR5	IL1B	IL5RA	C4A
CCL17 (TARC)	CCR6	IL1F10	IL9R	CEBPB
CCL18 (PARC)	CCR7	IL1F5	IL1R1	CRP
CCL19	CCR8	IL1F6	IL1RN	C5
CCL2 (mcp-1)	CCR9	IL1F7	LTB4R	TOLLI
CCL20 (MIP-3a)	CX3CR1	IL1F8		
CCL21 (MIP-2)	IL8RA	IL1F9		
CCL23 (MPIF-1)	IL8RB	IL22		
CCL24 (eotaxin-2)	XCR1 (CCXCR1)	IL5		
CCL25 (TECK)		IL9		
CCL26		LTA		
CCL3 (MIP-1a)		LTB		
CCL4 (MIP-1b)		MIF		
CCL5 (RANTES)		SCYE1		
CCL7 (mcp-3)		SPP1		
CCL8 (mcp-2)		TNF		
CXCL1		INFA2		
CXCL10 (IP-10)		CD40LG (TNFSF5)		
CXCL11 (I-TAC/IP-9)				
CXCL12 (SDF1)				
CXCL13				
CXCL14				
CXCL2				
CXCL3				
CXCL5 (ENA-78/LIX)				
CXCL6 (GCP-2)				
CXCL9				
IL8				
CCL13 (mcp-4)				

A seguir, a Figura 5 ilustra os passos desde a obtenção do RNA até os gráficos de análise dos resultados da expressão gênica.

Figura 5. Fluxograma da análise da expressão gênica por PCR Array. Esquema ilustrando o sistema de PCR Array em tempo real e as fases que ocorrem desde a obtenção do RNA até a análise de resultado. Fonte: figura retirada do material didático fornecido pelo fabricante.

As reações foram realizadas em duplicatas para cada amostra de tecido (sítio ativo, inativo e controle). Foi utilizado para cada reação de RT-PCR: 1350 µl do tampão¹⁶; 102 µl de reação de síntese de cDNA diluído; 1248 µl de água livre de RNase. Foram adicionados 25 µl desta mistura em cada poço da placa de 96 poços já contendo pares de *primers* liofilizados para via inflamatória e citocinas. Em seguida, a reação foi executada em um termociclador em tempo real¹⁷. Os tempos e as

¹⁶ 2X SuperArray RT² qPCR Master Mix, SYBR Green, SABiosciences, Frederick, MD, USA.

¹⁷ CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

temperaturas utilizados na amplificação dos genes estão descritos na Tabela 2. Após a amplificação das amostras (Figura 6), os cálculos para esta análise foram realizados.

Tabela 2. Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica.

	ciclos	duração	temperatura
<i>CFX96™ Real-Time PCR Detection System</i>	1	10 minutos	95°C
		15 segundos	95°C
	40	30 a 40 segundos	55°C
		30 segundos	72°C

CFX96™ Real-Time PCR Detection System = nome do termociclador utilizado; ciclos = quantidade de ciclos ocorridos; duração = tempo decorrido em cada ciclo; temperatura = temperatura alcançada durante o ciclo.

Figura 6. Exemplo de curva de amplificação dos genes por RT-PCR Array.
Fonte: figura retirada do material didático fornecido pelo fabricante.

4.12 Análise das proteínas salivares

A análise de expressão de proteínas na saliva foi realizada em todos os pacientes que exibiram doença periodontal em atividade, por meio de imunoensaio *Multiplex Cytokine Profiling*, na plataforma Luminex. Esta tecnologia¹⁸ permite a detecção simultânea de múltiplos analitos com pequena quantidade de amostra (~ 50 µl) e realiza um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois

¹⁸ Luminex™ xMAP, Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo equipamento Luminex¹⁹. Os kits²⁰ foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio.

Este imunoensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, as amostras de saliva foram preparadas com tampão de diluição do kit específico (1:100) e as proteínas dosadas estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3. Proteínas dosadas (pg/ml) nas amostras de saliva.

painel MPXHCYTO60K-27 plex	painel MPXHCYP3-63K-04 plex	painel MPXHCYP-62K-08 plex
eotaxin	CXCL9/MIG	MCP-2
INFa2	CXCL11/ITAC	ENA-78
INFy	CCL19/MIP3b	BCA-1/CXCL13
IL1ra	CCL20/MIP3a	I-309/CCL1
IL1b		TARC/CCL17
IL2		6Ckine/CCL21
sIL2Ra		eotaxin-2
IL3		eotaxin-3
IL4		
IL5		
IL6		
IL7		
IL8		
IL9		
IL10		
IL13		
IL15		
IL17		
IP10		
MCP-1		
MCP-3		
MIP1a		
MIP1b		
sCD40L		
TGFa		
TNFa		
TNFB		

¹⁹ Luminex 200™, Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

²⁰ Milliplex™, Millipore, Billerica, MA, USA.

Anticorpos de captura específicos para cada analito (amostra) foram imobilizados nas microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito ligou-se aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final foi feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final foi um ensaio “sanduíche” realizado por meio de microesferas. O equipamento Luminex foi movimentando estas esferas em fila única através de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detectou a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantificou o sinal de reporte em cada microesfera.

4.13 Análise estatística

- Parâmetros clínicos e níveis de HbA1c:

Os dados foram registrados como média e desvio-padrão. Os indivíduos foram considerados para a análise estatística não paramétrica após teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). Com relação aos dados clínicos, para as comparações intragrupos, antes e 2 meses após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Wilcoxon. Para comparações entre os grupos controle, DP e DP+DM no tempo inicial foi aplicado teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. E para as comparações entre os grupos DP e DP+DM após dois meses, foi aplicado Mann-Whitney. Nas análises de distribuição de sítios ativos e inativos nos dois grupos, o teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado foram utilizados. O programa SPSS²¹ foi usado para a análise estatística.

- Análise de subtração radiográfica:

Após o teste de normalidade, a área de perda de densidade radiográfica foi comparada entre os grupos DP e DP+DM pelo teste t não pareado e foi correlacionado à perda de inserção clínica com a análise de Correlação linear de Pearson.

²¹ SPSS Statistics 17.0, IBM, Armonk, NY, USA.

- Expressão gênica:

Os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análise de dados²². Os genes que apresentaram valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Dessa forma, os dados serão representados como diferença na expressão gênica (*fold regulation*), que será normalizada pela média geométrica de cinco genes de controle endógeno.

- Expressão de proteínas salivares:

Em relação às proteínas salivares, as mesmas comparações foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

²² RT² Profiler PCR Array Data Analysis SuperArray, SABiosciences, Frederick, MD, USA.

5. Artigo I

No artigo I, foram considerados os seguintes procedimentos do material e métodos:

- exame clínico periodontal;
- subtração radiográfica;
- controle metabólico;
- terapia periodontal básica;
- determinação de atividade;
- análise estatística.

A população do artigo em questão foi composta por 41 indivíduos, sendo 21 portadores de periodontite crônica (grupo DP) e 20 com periodontite crônica e Diabetes mellitus tipo 2 (grupo DP+DM).

5.1 Resultados

5.1.1 Sítios periodontais

De 212 indivíduos que apresentaram todos os critérios de inclusão, cinco pacientes foram eliminados porque não terminaram o tratamento, dois pacientes porque tiveram câncer e os outros pacientes não apresentaram sítios periodontais em atividade. A amostra final deste estudo foi composta de 41 pacientes. Dessa forma, somente 20% do total de pacientes apresentaram doença periodontal em atividade. O grupo DP apresentou média de idade de 51,6 ($\pm 2,6$) anos, e o grupo DP+DM, média de 51,8 ($\pm 1,8$) anos.

Ambos os grupos apresentaram parâmetros clínicos similares no tempo inicial, e todos parâmetros clínicos diminuíram após a terapia. A média dos níveis de hemoglobina glicada indicaram que os pacientes diabéticos eram pobremente controlados (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros clínicos periodontais e controle metabólico.

Parâmetros	DP (n = 21)	DP+DM (n = 20)	*p valor
PS (mm)			
inicial	2,44 ± 0,43	2,52 ± 0,51	NS
2 meses	2,08 ± 0,37	2,12 ± 0,32	NS
** p valor	< 0,001	< 0,001	
NCIR (mm)			
inicial	9,89 ± 1,28	10,73 ± 1,55	NS
2 meses	9,65 ± 1,26	10,28 ± 1,38	NS
** p valor	NS	0,002	
IP (%)			
inicial	53,94 ± 14,73	58,79 ± 19,25	NS
2 meses	30,59 ± 17,21	29,60 ± 12,33	NS
** p valor	< 0,001	< 0,001	
SS (%)			
inicial	39,31 ± 20,94	38,51 ± 14,55	NS
2 meses	23,05 ± 17,69	12,96 ± 7,01	NS
** p valor	< 0,001	< 0,001	
PS ≤ 3 mm (n. sítios)			
Inicial	124,62 ± 31,11	108,95 ± 33,05	NS
2 meses	135,81 ± 30,02	119,70 ± 30,56	NS
**Valor de p	< 0,001	< 0,001	
PS 4-6 mm (n. sítios)			
Inicial	20,19 ± 17,00	21,80 ± 14,37	NS
2 meses	11,33 ± 12,72	11,85 ± 9,55	NS
**Valor de p	< 0,001	< 0,001	
PS ≥ 7 mm (n. sítios)			
Inicial	3,76 ± 4,18	1,85 ± 3,03	NS
2 meses	1,43 ± 1,89	0,15 ± 0,49	0,005
**Valor de p	< 0,001	0,001	
n. dentes			
inicial	24,76 ± 4,70	21,95 ± 4,98	NS
2 meses	23,84 ± 4,97	20,02 ± 4,22	NS
** p valor	NS	NS	
HbA1c (%)			
inicial	—	10,24 ± 2,56	—
2 meses	—	9,06 ± 2,40	—
** p valor		< 0,001	

NS: não significativa ($p > 0,05$)

* Teste t não pareado (comparação entre os grupos).

** Teste t pareado (comparação intragrupo).

No total, foram analisados 5754 sítios de ambos os grupos e estes foram classificados conforme atividade de doença periodontal em sítios ativos ou inativos. Houve maior ocorrência de sítios ativos no grupo DP+DM; entretanto, essa diferença na prevalência não foi estatisticamente significativa (Figura 7). O grupo DP+DM apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo DP em relação à perda de inserção clínica nos sítios ativos (Figura 8).

Figura 7. Distribuição de sítios ativos e inativos nos grupos DP e DP+DM. Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$.

Figura 8. Perda de inserção clínica nos sítios ativos dos grupos DP e DP+DM. *Teste t não pareado, $p < 0,05$.

A presença do sangramento à sondagem foi semelhante tanto nos sítios ativos e inativos dos grupos DP e DP+DM (Figura 9), bem como quando os sítios ativos foram distribuídos em relação à categorização das profundidades de sondagem (Figura 10).

Figura 9. Presença de sangramento à sondagem nos sítios ativos e inativos dos grupos DP e DP+DM.

SS: sangramento à sondagem.

Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$.

Figura 10. Categorização das profundidades de sondagem nos sítios ativos dos grupos DP e DP+DM.

PS: profundidade de sondagem.

Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$.

A distribuição de sítios ativos por sextante também se mostrou semelhante em ambos os grupos DP e DP+DM, sendo mais frequente nos sextantes 2 e 5 (Figura 11). Em relação à face de dente com maior frequência no sítios ativos, pode-se destacar a face disto lingual e vestibular para o grupo DP e disto vestibular e vestibular para o grupo DP+DM (Figura 12).

Frequência de sítios ativos por sextante - grupo DP

Frequência de sítios ativos por sextante - grupo DP+DM

Figura 11. Distribuição de sítios ativos por sextante nos grupos DP e DP+DM.

Frequência de sítios ativos por localização de sítio - grupo DP

Frequência de sítios ativos por localização de sítio - grupo DP+DM

Figura 12. Distribuição de sítios ativos por localização de cada sítio periodontal nos grupos DP e DP+DM.

5.1.2 Análise radiográfica

A análise radiográfica foi realizada pelo método da subtração radiográfica. A subtração radiográfica, por sua vez, foi obtida com a sobreposição da radiografia inicial e da radiografia após dois meses de terapia periodontal, em sítios ativos interproximais, submetidos a biópsias, nos grupos DP e DP+DM. A área radiolúcida medida nas radiografias de subtração não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos DP ($0,33 \pm 0,17$) e DP+DM ($0,45 \pm 0,21$). As medidas radiográficas das áreas estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13. Área radiolúcida (mm^2) obtida pela subtração das radiografias iniciais e de 2 meses dos sítios ativos dos grupos DP e DP+DM. Teste t não pareado, $p > 0,05$.

As medidas das áreas radiolúcidas dos sítios ativos foram correlacionadas positivamente com suas respectivas medidas da perda de inserção clínica nos grupos DP ($R = 0,79$; $p = 0,001$) e DP+DM ($R = 0,86$; $p < 0,001$). As correlações dos grupos DP e DP+DM estão apresentadas nas Figuras 14 e 15 respectivamente.

Figura 14. Correlação entre as medidas das áreas da perda de densidade radiográfica e medidas da perda de inserção clínica no grupo DP. Correlação linear de Pearson ($p = 0,001$).

Figura 15. Correlação entre as medidas das áreas da perda de densidade radiográfica e medidas da perda de inserção clínica no grupo DP+DM. Correlação linear de Pearson ($p < 0,001$).

5.2 Discussão e conclusão

O objetivo deste estudo foi monitorar sítios com doença periodontal em atividade, em indivíduos diabéticos, após dois meses de terapia periodontal básica. Alguns estudos (Jeffcoat; Reddy, 1991; Reddy *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2006; Dezerega *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011) acompanharam pacientes periodontais para monitorar a progressão e a atividade da periodontite crônica a cada dois meses. Entretanto, nenhum deles monitorou a atividade da doença após a terapia periodontal.

O presente estudo monitorou pacientes com doença periodontite e Diabetes mellitus tipo 2, já que o diabetes tem um impacto deletério na condição periodontal, colaborando para a progressão da doença. Pesquisas epidemiológicas em uma população com uma prevalência externamente alta de diabetes tipo 2 (Pima Indians) revelaram que esta população também apresenta uma alta prevalência para doença periodontal (usando parâmetros de perda de inserção periodontal ou perda óssea radiográfica) (Emrich *et al.*, 1991). Adicionalmente, quando os pacientes diabéticos foram divididos em controlados, moderadamente e pobremente controlados, houve diferença significativa nos parâmetros clínicos entre os diabéticos pobremente controlados e o grupo controle, sugerindo que o diabetes afeta a evolução da doença periodontal (Novaes *et al.*, 1991; Novaes *et al.*, 1997).

Os pacientes diabéticos deste estudo eram pobremente controlados (média de HbA1c = 10,24%). Dessa forma, a terapia periodontal básica foi associada à doxiciclina. Estudos de nosso grupo (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008) suportam o uso sistêmico de antibiótico em pacientes diabéticos pobremente controlados. A doxiciclina é um modulador potente da resposta do hospedeiro em indivíduos com diabetes, bem como um inibidor de metaloproteinase (Sorsa *et al.*, 1992). Também inibe a glicação não enzimática de proteínas extracelulares e pode ter um efeito semelhante na glicação da hemoglobina (Grossi *et al.*, 1997).

Neste estudo, mesmo com parâmetros clínicos iniciais semelhantes em ambos os grupos e com o uso de doxiciclina sistêmica pelos diabéticos, o grupo DP+DM teve uma quantidade de sítios ativos um pouco maior e uma média de perda de inserção clínica maior que no grupo DP. Estes resultados podem estar relacionados a uma exagerada resposta imune do hospedeiro, causada por disfunção de leucócitos polimorfonucleares, alterações vasculares, síntese alterada de colágeno e glicosaminoglicanas, desequilíbrio na produção de citocinas e forma de produtos finais da glicação avançada (AGEs) (Duarte *et al.*, 2007).

Após dois meses de terapia periodontal básica, houve melhora significativa nos parâmetros clínicos avaliados. Este achado corrobora com a literatura científica atual, em que parâmetros clínicos e microbiológicos melhoraram significativamente após a terapia periodontal (Serino *et al.*, 2001). Entretanto, alguns sítios periodontais continuaram a perder inserção clínica, confirmando o comportamento sítio-específico da doença periodontal. Alguns estudos (Hernandez *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2010) têm explorado sítios periodontais progressivos a nível molecular para que se possa compreender melhor a razão para esse comportamento.

A porcentagem de indivíduos com sítios ativos em cada grupo deste estudo confirmou os achados de prévios estudos (Haffajee *et al.*, 1983; Hernandez *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2010). Entretanto, estes estudos classificaram sítios ativos com sonda periodontal manual, com perda de inserção clínica a partir de 2 mm e antes de qualquer terapia periodontal, o que torna difícil estabelecer uma comparação direta.

De acordo com o método de tolerância (Haffajee *et al.*, 1983), sítios periodontais podem ser classificados em ativos quando têm perda de inserção clínica de, pelo menos, 2 mm. A variação de 2 a 3 mm significa três vezes o valor do

desvio padrão ou “erro intrínseco” do método com sondagem manual (Reddy *et al.*, 2000). Entretanto, alterações pequenas significativas na inserção clínica não são detectadas por este instrumento. Dessa forma, neste trabalho, a atividade de doença seguiu o método da tolerância preconizado por Haffajee *et al.* (1983) modificado para sondagem eletrônica para minimizar esta dificuldade. Os sítios considerados ativos foram os que apresentaram perda de inserção ≥ 1 mm (considerando 3 vezes o desvio padrão da margem de erro de 0,3 mm da sonda eletrônica) após dois meses de acompanhamento. Os sítios inativos foram definidos como aqueles sem perda de inserção durante o mesmo período.

Ainda que o sangramento seja reconhecido como sinal visível clinicamente significante de resposta inflamatória do hospedeiro à presença de biofilme e cálculo, a presença deste parâmetro não é confiável na previsão de progressão da doença periodontal (Reddy *et al.*, 2000). Em acordo com estes autores, o presente estudo não mostrou relação entre atividade de doença periodontal e sangramento à sondagem, bem como com a categorização de profundidade de sondagem.

Este estudo examinou ainda o padrão de perda inserção em sextantes e nas localizações dos sítios periodontais. Não houve diferença significativa entre os sextantes nos dois grupos avaliados. Ao contrário deste estudo, Reddy *et al.* (2000) verificaram que a perda óssea em sítios de dentes posteriores foi mais frequente. Já em relação à frequência de sítios ativos em cada localização de sítio, disto-lingual foi mais frequente no grupo DP, enquanto que o sítio disto-vestibular foi mais frequente no grupo DP+DM. Entretanto, deve-se considerar que dentes com lesão de bifurcação foram excluídos da amostra.

Neste estudo, também foi investigada a possibilidade da perda de densidade radiográfica ser um indicativo de alterações clínicas detectáveis pela perda de inserção. Alterações entre as radiografias inicial e após dois meses foram descritas como uma área escura relacionada à perda de massa óssea alveolar nas radiografias digital de subtração. Como era esperada, a média da área escura no grupo DP+DM foi mais alta quando comparada à média do grupo DP, porém sem diferença significativa. A positiva correlação entre as mensurações das áreas escuras nas radiografias de subtração e as medidas de perda de inserção clínica indica a habilidade de pequenas alterações na densidade radiográfica serem um indicativo de futuras perdas de inserção clínica, o que está de acordo com os resultados do estudo de Reddy *et al.* (2000).

Baseado nos achados, este estudo foi capaz de identificar e monitorar a atividade da doença periodontal em pacientes diabéticos mesmo após a terapia periodontal. A perda de inserção clínica foi mais severa nos pacientes diabéticos. Entretanto, não foi possível identificar diferenças significantes na atividade da doença periodontal entre os grupos DP e DP+DM. Deve-se considerar que pacientes diabéticos receberam terapia periodontal antimicrobiana adjuvante. Futuros estudos podem excluir a doxiciclina sistêmica para que se alcance um melhor entendimento da atividade da doença periodontal em pacientes com diabetes tipo 2.

5.3 Artigo em inglês

Monitoring of progressive periodontal sites in diabetic patients after non-surgical periodontal therapy

Running Title: Monitoring of progressive periodontal sites

Priscila Paganini Costa¹, Paula Cristina dos Santos¹, Daniela Bazan Palioto¹, Márcio Fernando de Moraes Grisi¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹, Arthur Belém Novaes Júnior¹, Mario Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone number: 55 16 36024135. Fax number: 55 16 3602 4788

Corresponding author:

Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Periodontitis, Type 2 Diabetes Mellitus, Periodontal Attachment Loss.

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no potential conflict of interest. This study was financially supported by FAPESP.

Abstract

Background: The aim of the study was to identify and monitor progressive periodontal sites of diabetic patients after periodontal therapy with the aid of digital subtraction radiography (DSR) and a computerized periodontal probe. These methods allowed detection of small changes in disease activity.

Material and Methods: Forty-one patients were included, 21 with chronic periodontitis (PD group) and 20 with chronic periodontitis and type 2 diabetes (PD+DM group). Clinical and radiographic examinations were taken at baseline and 2 months after non-surgical periodontal therapy. The periodontal sites with progressive attachment loss $\geq 1\text{mm}$ were considered active. Radiographic subtraction was performed in pairs of radiographs, and the measurements of the areas with density loss in DSR were recorded. The glycated hemoglobin (HbA1c) levels were also verified.

Results: The HbA1c mean level indicates that diabetic patients were poorly controlled. From the 5754 sites evaluated, 9% of PD group and 12% of PD+DM group lost clinical attachment and were classified as active sites ($p > 0.05$). The mean clinical attachment loss in active sites was higher in the PD+DM group ($p < 0.05$). Measurements of darkened areas were correlated with their respective measurements of clinical attachment loss in PD group ($R = 0.79$, $p = 0.001$) and in PD+DM ($R = 0.86$, $p < 0.001$).

Conclusions: This study was able to identify and monitor the progressive periodontal disease even after non-surgical periodontal therapy, correlating clinical data with radiographic data. Clinical attachment loss was more severe in diabetic patients.

Introduction

Periodontitis appears to result from a complex interaction between specific bacteria and the immune and inflammatory responses of host (Silva *et al.*, 2008). Particularly in chronic periodontitis, the presence of local irritants is compatible with severity of disease (Armitage, 1999). Although bacteria are essential in the onset and maintenance of periodontitis, susceptibility and disease progression are determined by the immune-inflammatory host response (Socransky; Haffajee, 1992; Offenbacher, 1996; Taba *et al.*, 2005; Van Dyke; Sheilesh, 2005). Despite the evidence that the primary etiologic agent in periodontitis is bacteria, there has been a poor association between clinical measures of plaque accumulation and prediction of periodontal disease activity (Reddy *et al.*, 2000). According to Van Dyke and Sheilesh (2005), changes in the rate of periodontitis progression may occur even under similar conditions of control and accumulation of dental plaque.

Several factors can modify the host response to periodontal pathogens and thereby alter the disease progression. Diabetes mellitus is recognized as an important risk factor for periodontitis (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008). It is accepted that periodontitis is more prevalent and more severe in patients with diabetes (Soskolne *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1998). The mechanisms responsible for these outcomes in patients with diabetes are mainly related to impairment of collagen and glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts, and increased collagenolytic activity and production (Nishimura *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 2001; Lalla *et al.*, 2001).

Another characteristic of periodontitis is that the rate of disease progression is usually low or moderate and may experience periods of fast progression (Armitage, 1999). Goodson *et al.* (1982) have presented evidence indicating that periodontal disease has dynamic states of exacerbation and remission and can be described in terms of patterns of progression and regression of the disease. This burst model of periodontal disease activity was proposed to explain the apparent variability of periodontal disease progression observed in clinical trials that used routine clinical measurements (Reddy *et al.*, 2000).

The clinical examination for diagnosis and monitoring of periodontal disease has been carried out with manual periodontal probe and conventional radiographic examination. However, the evaluation of the clinical attachment level using

periodontal probe manual is only capable of checking the damages from past episodes of tissue destruction. Periodontal tissue loss is only detected by the manual probe in a change of at least 2 to 3 mm in the evaluation of clinical attachment level. Therefore, meaningful small changes in tooth attachment are not detected by this instrument (Reddy *et al.*, 2000). On the other hand, digital subtraction has been used as a means to detect minimal changes in bone density and may contribute to the diagnosis (Giannobile *et al.*, 2009).

Despite the possible limitations imposed by the use of a manual probe and the potential benefits of digital subtraction, this study utilized digital subtraction radiography and computerized periodontal probe to achieve the monitoring of sites with periodontal disease progression in diabetic patients even after periodontal therapy.

Material and Methods

Study subjects

The present study was carried out at the Ribeirão Preto School of Dentistry - University of São Paulo between February 2009 and July 2011 as a joint collaboration of the Department of Oral Surgery and Periodontology and the Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism. It was reviewed and approved by the Institutional Human Research Committee of the University of São Paulo (n. 2009.1.88.58.7). All subjects were informed about the nature of the proposed study and informed consent forms were signed.

The study population aged between 35 - 65 years old and presented a minimum of 14 natural teeth and, 10 of which should be posterior teeth. The proposed criterion for periodontitis case definition was the presence of five teeth with a probing pocket depth (PPD) of ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm (Hernandez *et al.*, 2006). The exclusion criteria were: (i) smoking within the past 5 years; (ii) pregnancy or lactancy; (iii) use of antibiotics or periodontal therapy in the previous six months; (iv) concomitant medical therapy, except for diabetic condition; (v) other inflammatory conditions; (vi) major diabetic complications such as retinopathy, nephropathy, neuropathy and atherosclerosis.

The patients had type 2 Diabetes mellitus diagnosed for at least 5 years and current metabolic control above normal range (glycated hemoglobin level, HbA1c >

7%) (American Diabetes Association, 2009). All diabetic patients were under the supervision of an endocrinologist advised to communicate any change in medicine intake or diet.

Qualified subjects who agreed to participate in the study were rescheduled for laboratory, periodontal, and clinical and radiographic examinations. The sample of 20 patients was considered to be sufficient to detect the difference of 0.5 mm in clinical attachment level between the groups, considering that the experiment had a power of 80%. Forty-one patients were included in this study, divided in two groups:

PD group (n = 21) – subjects with chronic periodontitis (Armitage, 1999);

PD+DM group (n = 20) – subjects with chronic periodontitis (Armitage, 1999) and previously diagnosed type 2 Diabetes mellitus.

Clinical parameters

Clinical exams were performed at baseline and two months after periodontal disinfection by only one trained and calibrated examiner. Intra-examiner calibration was performed in three patients with a 20-minute interval between the exams in the same patient. Intra-class correlation coefficient of > 0.90 was obtained in probing pocket depth. The probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (rCAL) and bleeding on probing (BOP) were recorded at six sites per tooth (mesio-buccal, buccal, disto-buccal, mesio-lingual, lingual and disto-lingual) with the aid of a computerized periodontal probe (Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA). The presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index - PI) were recorded (O’Leary *et al.*, 1972). It was also verified the furcation involvement with the aid of a manual periodontal probe (Nabers, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Glycated hemoglobin (HbA1c) measurement

For the metabolic assessment, peripheral blood samples were analyzed for glycated hemoglobin (HbA1c) levels at baseline and two months after periodontal therapy. The HbA1c data was expressed in percentage, and it was measured by high-performance liquid chromatography (Labtest Sistemas para Diagnóstico, São Paulo, SP, Brasil) at the Clinical analysis laboratory of Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

Radiographic procedures

A complete series of radiographs was taken in each patient at baseline, using the paralleling technique. In teeth with active periodontal sites, radiographs were taken two months after periodontal therapy. All radiographs were obtained using the same mobile X-Ray system (10 Orthoceph – Siemens, set to 62 KV and 16mA, with exposure time of 0.8 seconds).

Thereafter, the radiographs were digitized in tagged image file format (TIFF) on a scanner (Scanner HP 5370, Hewlett-Packard, Cupertino, California, USA). Digital subtraction radiographs (DSR) were performed with the baseline and two-month radiographs using specific software (Emago Dental Software, Oral Diagnostics Dental Systems, Amsterdam, The Netherlands). Only teeth with interproximal sites with periodontal disease activity were included in this analysis.

The first step of the computer-assisted subtraction procedure was to calibrate the gray levels of all pixels in the full image between the radiographs. Four reference points were placed in areas surrounding the periodontal site at the same positions in both images and an alignment of images was performed to correct small geometric misalignments (Bittar-Cortez *et al.*, 2006). All pairs of baseline and 2-month radiographs for each periodontal site were subtracted. Changes between radiographs were depicted as a darkened area for loss of alveolar bone mass (Figure 1), a neutral gray for no change in alveolar bone mass, and a lightened area for an increase in alveolar bone mass (Danesh *et al.*, 2002). These areas were measured (mm²) using specific measurements software (Image Tool for Windows, version 3.00, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.).

As in the clinical examination, it was performed intra-examiner calibration for the measurements of areas of radiographic density loss. Intra-class correlation coefficient was 0.81.

Non-surgical periodontal therapy

The scaling and root planning sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24- to 48-hour interval (Quirynen *et al.*, 1999) using hand instruments (Gracey curettes, Hu-Friedy Instruments, Chicago, IL, USA) and an ultrasonic device (Cavitron, Dentsply, York, PA, USA). Teeth presenting periapic radiolucencies and severe periodontal destruction were extracted. Oral hygiene was

reviewed after a week and after a month of periodontal disinfection, followed by prophylaxis.

In diabetic patients (PD+DM group), the non-surgical periodontal therapy was associated with systemic doxycycline (Vibramicina, Pfizer, São Paulo, SP, Brazil) 100 mg/day, for 2 weeks after an initial dose of 200 mg, started on the day before periodontal therapy (O'Connell *et al.*, 2008).

Periodontal disease activity

A second clinical examination was performed two months after non-surgical periodontal therapy in order to detect periodontal disease activity, which is checked every two months according to the tolerance method proposed by Haffajee *et al.* (1983). The present study adapted the tolerance method (Haffajee *et al.*, 1983) for computerized periodontal probe. Active sites were those which presented clinical attachment loss of ≥ 1 mm (considering the standard deviation of 0.3 mm for the computerized periodontal probe multiplied by 3) two months after initial clinical examination/periodontal therapy. Sites were considered non-active if presenting a probing pocket depth equivalent to those of the active ones, but without any clinical attachment loss during the same period.

Teeth with prosthesis or furcation lesion were not considered for periodontal disease activity.

Statistical analysis

Data were registered as mean and standard deviation, and the experimental unit was the subject and periodontal site. Data were tested for normality before applying the adequate parametric or non-parametric tests. In the clinical and diabetic parameters, Paired t test was applied for intra-group analysis, and unpaired t test was used for intergroup comparison. In the analysis of distribution of active and non-active sites in two groups, Fisher's Exact test and χ^2 test were applied.

The darkened areas in the subtraction radiographs were compared between the PD and PD+DM groups by unpaired t test. Correlations between clinical attachment loss and radiographic density loss were measured by Pearson Correlation. Statistical significance was considered at level of 5% ($p < 0.05$). SPSS Statistics 17.0 software package (SPSS Statistics 17.0, IBM Corporation, New York, NY, USA) was used for statistical analysis.

Results

Periodontal sites

From 212 subjects who fulfilled the inclusion criteria, five patients were eliminated because they did not finish the treatment, two patients, because they had cancer and the other patients, for not having active periodontal sites. The final sample consisted of 41 patients. Therefore, only 20% of patients had periodontal disease activity.

The mean age of PD and PD+DM groups were similar. The PD group showed an age mean of 51.6 (± 2.6) years, and PD+DM group, a mean of 51.8 (± 1.8) years. Both groups had similar clinical parameters at baseline. All clinical parameters decreased after therapy. The mean of HbA1c levels indicates that diabetic patients were poorly controlled. Moreover, the mean HbA1c in PD+DM group showed statistically significant differences ($p < 0.05$) between baseline and two-month evaluation, with an average reduction of 1.18 that corresponds to a percentage of 11.52% (Table 1).

The 5754 sites in both groups were monitored and classified for disease activity in active or non-active lesions. A greater number of active sites in the PD+DM group was present; however, the difference was not statistically significant (Figure 2). The mean of clinical attachment loss in the active sites was higher in the PD+DM group compared to the DP group ($p < 0.05$) (Figure 3).

Disease activity was separated according to bleeding on probing (Figure 4) and probing pocket depth categorization (Figure 5). The presence of bleeding on probing was similar in both active and non-active sites of PD and PD+DM groups. When the active sites were distributed in the probing pocket depth categorization, there were no statistically difference between the groups.

The distribution of active sites in each sextant was also similar in both PD and PD+DM groups (Figure 6), no significant differences were observed between the sextants. Regarding the frequency of active sites in each site location, distolingual was more frequent in PD group, while disto buccal was more frequent in PD+DM group (Figure 7).

Radiographic analysis

The darkened areas of the digital subtraction radiographs showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the PD group (0.33 ± 0.17) and PD+DM group (0.45 ± 0.21). The radiographic measurements of the areas are presented in Figure 8.

The measurements of darkened areas were positively correlated with their respective measurements of clinical attachment loss in groups PD ($R = 0.79$, $p = 0.001$) and PD+DM ($R = 0.86$, $p < 0.001$). The correlations of the PD and PD+DM groups are presented in Figures 9 and 10 respectively.

Discussion

The purpose of the study was to monitor progressive periodontal sites in periodontal patients with or without diabetes, two months after non-surgical periodontal therapy. Some studies (Jeffcoat; Reddy, 1991; Reddy *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2006; Dezerega *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011) have followed periodontal patients to monitor the progression and activity of chronic periodontitis. However, none of them monitored the periodontal disease activity after periodontal therapy.

The present study followed diabetic patients, since diabetes has a deleterious impact on the periodontal status collaborating with the disease progression. Epidemiologic researches in a population presenting an extremely high prevalence of type 2 diabetes (Pima Indians) revealed that this population also had a high prevalence for periodontal disease (using either measurements for periodontal attachment loss or radiographic bone loss) (Emrich *et al.*, 1991). In addition, when dividing the diabetic group into controlled, moderately, and poorly controlled diabetes, there were significant differences in the clinical parameters between poorly controlled diabetics and the control group, suggesting that diabetes condition affects the evolution of periodontal disease (Novaes *et al.*, 1991; Novaes *et al.*, 1997).

The diabetic patients of this study were poorly controlled (mean HbA1c of 10.24%). Therefore, non-surgical periodontal therapy was associated with doxycycline. Our group studies (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008) support the systemic antibiotic use in patients with poorly controlled diabetes. Doxycycline is a potent modulator of the host response in the subject with diabetes,

as well as being a metalloproteinase inhibitor (Sorsa *et al.*, 1992). It also inhibits non-enzymatic glycation of extracellular proteins, and it may have a similar effect on the glycation of hemoglobin (Grossi *et al.*, 1997). In accordance with these authors, our study verified an important reduction on the HbA1c levels of diabetic patients.

In this study, even with the association of doxycycline with periodontal therapy in the diabetic patients, PD+DM group had mean of clinical attachment loss statistically higher than patients of PD group. These results may be related to an exaggerated host immune response in diabetic patients caused by polymorphonuclear leukocyte dysfunction, vascular changes, altered collagen and glycosaminoglycan synthesis, deregulation in cytokine production, and the formation of advanced glycation end products (AGEs) (Duarte *et al.*, 2007).

After two months of non-surgical periodontal therapy, there were significant improvements in the evaluated clinical parameters in both groups. This corroborates with the ongoing scientific literature, in which the clinical and microbiological parameters improved significantly after periodontal therapy (Serino, *et al.*, 2001). However, some periodontal sites continued to lose clinical attachment levels, confirming the site-specific behavior of periodontal disease. Some studies (Hernandez *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2010) have explored progressive periodontal sites at the molecular level to better understand the reason of this behavior.

The percentage of subjects with active sites in each group of the current study confirmed the findings from previous studies (Haffajee *et al.*, 1983; Hernandez *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009; Dezerega *et al.*, 2010). However, these studies classified active sites with manual periodontal probes, with clinical attachment loss of at least 2 mm and before the periodontal therapy, which makes it difficult to establish a direct comparison.

According to the tolerance method (Haffajee *et al.*, 1983), periodontal sites may be classified as active when they have clinical attachment loss of at least 2 mm after two months. The variation from 2 to 3 mm uses the standard deviation value from the manual probing method (Reddy *et al.*, 2000) multiplied by 3 or "intrinsic error". However, meaningful small changes in tooth attachment are not detected by this instrument (Reddy *et al.*, 2000). Therefore, this study followed the tolerance method (Haffajee *et al.*, 1983) modified for an electronic controlled force periodontal probe to minimize this difficulty. The active sites were the ones showing clinical

attachment loss of ≥ 1 mm (considering the error margin's standard deviation value from the electronic probe of 0.3 mm multiplied by 3) following two months.

Although bleeding is recognized as significant clinically visible sign of host inflammatory response to the presence of bacterial plaque and calculus, the presence of this parameter has not been reliable in predicting disease progression (Reddy *et al.*, 2000). In accordance with these authors, the present study did not find correlation between periodontal disease activity and bleeding on probing, as well as with probing pocket depth categorization.

This study examined the attachment loss pattern in specific sextants and site location. There is no significant difference between the sextants and between the groups. Unlike this study, Reddy *et al.* (2000) verified that attachment loss at posterior tooth sites was more frequent. Regarding the frequency of active sites in sites location, distolingual was more frequent in PD group, while disto buccal was more frequent in PD+DM group. However, it should considerer that teeth with bifurcation lesion were excluded from the sample.

The issue as to whether small short-term measurements of bone loss as measured by DSR are indicative of larger clinically detectable changes in attachment loss was also addressed in this study. Changes between baseline and 2-month radiographs were depicted as a darkened area for loss of alveolar bone mass in DSR. The darkened area mean was higher in PD+DM group as expected since the mean of clinical attachment loss was greater in diabetic patients. However, there was no significant difference between the groups. Moreover, this measurement was positively correlated with clinical attachment loss in both groups. These data indicate that the ability to measure small changes in radiographic density may be indicative of future attachment loss. Our result was in accordance with results found by Reddy *et al.* (2000).

Based on the findings, this study was able to identify and monitor the periodontal disease activity in diabetic patients even after non-surgical periodontal therapy. The clinical attachment loss was more severe in diabetic patients. However, it is not possible to identify significant differences in disease activity between the PD and PD+DM groups. Future studies may exclude the systemic doxycycline to more completely understand periodontal disease activity in diabetic patients.

Acknowledgments

The study had the financial support of the Foundation for Research Support of São Paulo grant 2007/08424-3 and 2008/11033-9.

References

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement). *Diabetes Care* 2009;32:S62-7.

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

Bittar-Cortez JA, Passeri LA, Boscolo FN, Haiter-Neto F. Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clinical Oral Implants Res*. 2006 Oct;17(5):560-4.

Danesh-Meyer MJ, Chen ST, Rams TE. Digital subtraction radiographic analysis of GTR in human intrabony defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 Oct;22(5):441-9.

Dezerega A, Pozo P, Hernández M, Oyarzún A, Rivera O, Dutzan N, *et al*. Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010 Feb;81(2):267-76.

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

Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, *et al*. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1991 Feb;62(2):123-31.

Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol 2000*. 2009;50:52-64.

Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Nov;9(6):472-81.

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

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*. 1983 May;10(3):298-310.

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, *et al.* Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol.* 2006 Nov;77(11):1863-70.

Hernandez M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, *et al.* Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2011 Oct;90(10):1164-70.

Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of probing attachment loss on adult periodontitis. *J Periodontol.* 1991 Mar;62(3):185-9.

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

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

Novaes AB Jr, Silva MAP, Batista EL Jr, Anjos BA, Novaes AB, Pereira ALA. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of Young Brazilian patients. *J Periodontol.* 1991 Feb;62(2):116-22.

Novaes AB Jr, Silva MAP, Batista EL Jr, Anjos BA, Novaes AB, Pereira ALA. Manifestations of insulin-depedent diabetes mellitus in the periodontium of Young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol.* 1997 Apr;68(4):328-34.

O'Connell PA, Taba M Jr, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, *et al.* Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008 May;79(5):774-83.

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

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

Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Longterm impact on microbial load. *J Periodontol.* 1999 Jun;70(6):646-56.

Reddy MS, Geurs NC, Jeffcoat RL, Proskin H, Jeffcoat MK. Periodontal disease progression. *J Periodontol.* 2000 Oct;71(10):1583-90.

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

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. 2001. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001 Oct;28(10):910-6.

Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, *et al.* Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008 Mar;35(3):206-14.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992 Apr;63(4Suppl): 322-31.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, *et al.* Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992 Feb;19(2):146-9.

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

Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):306-10.

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

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

Table

Table 1. Clinical and diabetic parameters.

Parameters	PD	PD+DM	* <i>p</i> value
PPD (mm)			
baseline	2.44 ± 0.43	2.52 ± 0.51	NS
2 months	2.08 ± 0.37	2.12 ± 0.32	NS
** <i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	
rCAL (mm)			
baseline	9.89 ± 1.28	10.73 ± 1.55	NS
2 months	9.65 ± 1.26	10.28 ± 1.38	NS
** <i>p</i> value	NS	0.002	
PI (%)			
baseline	53.94 ± 14.73	58.79 ± 19.25	NS
2 months	30.59 ± 17.21	29.60 ± 12.33	NS
** <i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	
BOP (%)			
baseline	39.31 ± 20.94	38.51 ± 14.55	NS
2 months	23.05 ± 17.69	12.96 ± 7.01	NS
** <i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	
PPD ≤ 3 mm (n. sítios)			
baseline	124.62 ± 31.11	108.95 ± 33.05	NS
2 months	135.81 ± 30.02	119.70 ± 30.56	NS
** <i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	
PPD 4-6 mm (n. sites)			
baseline	20.19 ± 17.00	21.80 ± 14.37	NS
2 months	11.33 ± 12.72	11.85 ± 9.55	NS
** <i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	
PPD ≥ 7 mm (n. sites)			
baseline	3.76 ± 4.18	1.85 ± 3.03	NS
2 months	1.43 ± 1.89	0.15 ± 0.49	0.005
** <i>p</i> value	< 0.001	0.001	
n. teeth			
baseline	24.76 ± 4.70	21.95 ± 4.98	NS
2 months	23.84 ± 4.97	20.02 ± 4.22	NS
** <i>p</i> value	NS	NS	
HbA1c (%)			
baseline	—	10.24 ± 2.56	—
2 months	—	9.06 ± 2.40	—
** <i>p</i> value		< 0.001	

NS: non-significant (*p* > 0.05).

* Unpaired t test (intergroups comparison).

** Paired t test (intra-group comparison).

Figure legends

Figure 1. A) baseline radiograph; B) 2-month radiograph; C) subtraction radiograph, with a darkened area indicating loss of alveolar bone mass.

Figure 2. Distribution of the active and non-active sites in PD and PD+DM groups. Fisher's Exact test, $p > 0.05$.

Figure 3. Clinical attachment loss in the active sites of PD and PD+DM groups. * Unpaired t test, $p < 0.05$.

Figure 4. Presence of bleeding on probing (BOP) in the active and non-active site of PD and PD+DM groups. Fisher's Exact test, $p > 0.05$.

Figure 5. Probing pocket depth (PPD) categorization in the active sites of tPD and PD+DM groups. Fisher's Exact test, $p > 0.05$.

Figure 6. Frequency of active sites per sextant in PD and PD+DM groups. Fisher's Exact test, $p > 0.05$.

Figure 7. Frequency of active sites per site location in PD and PD+DM groups. Fisher's Exact test, $p > 0.05$.

Figure 8. Darkened area (mm^2) obtained by digital subtraction radiographs of the active sites in PD and PD+DM groups. Unpaired t test, $p > 0.05$.

Figure 9. Correlation between measurements of darkened area and clinical attachment loss in PD group. Pearson Correlation ($p = 0.001$).

Figure 10. Correlation between measurements of darkened area and clinical attachment loss in PD group. Pearson Correlation ($p < 0.001$).

Figures

Figure 1

Figure 2

Disease activity - PD+DM group

Disease activity- PD group

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Frequency of active sites in each sextant
PD group Frequency of active sites in each sextant
PD+DM group

Figure 7

Frequency of active sites per site location
grupo DP Frequency of active sites per site location
grupo DP+DM

Figure 8

Area of radiographic density loss

Figure 9

Figure 10

6. Artigo II

No artigo II, foram considerados os seguintes procedimentos do material e métodos:

- exame clínico periodontal;
- controle metabólico;
- terapia periodontal básica;
- determinação de atividade;
- coleta do tecido gengival (biópsia);
- análise estatística.

A amostra final deste estudo consistiu em 34 pacientes, sendo nove pacientes saudáveis periodontal e sistemicamente (grupo controle), quatro pacientes portadores de diabetes tipo 2 e com periodonto saudável (grupo DM), dez pacientes com periodontite crônica e saudável sistemicamente (grupo DP) e onze pacientes portadores de periodontite crônica e diabetes tipo 2 (grupo DP+DM).

6.1 Resultados

6.1.1 Parâmetros clínicos periodontais

Os dados demográficos da população deste estudo estão presentes na Tabela 5. Houve uma maior prevalência de mulheres e de brancos em todos os grupos, porém no grupo DP+DM, a distribuição foi mais homogênea. As médias de idade dos grupos DM, DP e DP+DM foram semelhantes; entretanto, a média do grupo controle foi menor ($p < 0,05$).

Os dados iniciais dos parâmetros clínicos periodontais demonstraram uma similaridade entre os grupos com periodontite crônica, ou seja, grupos DP e DP+DM e entre os grupos com periodonto saudável (grupos controle e DM). Em geral, houve

diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos dados iniciais somente quando comparados os grupos doentes (DP e DP+DM) ao grupo controle. Houve uma diminuição significativa em todos os parâmetros, com exceção do NCIR, após a terapia periodontal básica (Tabela 5). Houve um ganho de inserção clínica, mas sem diferença estatisticamente significativa, após a terapia periodontal.

Os níveis de HbA1c para avaliação do parâmetro metabólico, no grupo DP+DM, mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tempos inicial e de dois meses. Entretanto, quando comparados níveis de HbA1c iniciais do grupo DM e DP+DM, não houve diferença entre eles (Tabela 5).

Tabela 5. Dados demográficos, parâmetros clínicos e níveis de HbA1c dos grupos.

Parâmetros	Controle (n = 9)	DM (n = 4)	DP (n = 10)	DP+DM (n = 11)	*p valor
idade (anos)	34,4 ± 5,3a	49,3 ± 4,4a,b	50,3 ± 5,7b	52,0 ± 3,9b	< 0,001
feminino	7 (77,8%)	4 (100%)	7 (77,8%)	6 (54,5%)	—
masculino	2 (22,2%)	0 (0%)	2 (22,2%)	5 (45,5%)	—
branco	7 (77,8%)	4 (100%)	7 (77,8%)	9 (81,8%)	—
não branco	2 (22,2%)	0 (0%)	2 (22,2%)	2 (18,2%)	—
n. dentes	26,2 ± 2,8a	26,0 ± 2,8	24,4 ± 6,5	22,6 ± 5,4a	NS
PS (mm)					
inicial	2,03 ± 0,43a	2,11 ± 0,16a,b	2,59 ± 0,53b	2,49 ± 0,65a,b	0,023
2 meses	—	—	2,18 ± 0,49	2,19 ± 0,34	NS
** p valor			0,004	0,001	
NCIR (mm)					
inicial	8,19 ± 0,52a	8,49 ± 0,59a,b	10,04 ± 1,41b	10,50 ± 1,58b	< 0,001
2 meses	—	—	9,62 ± 1,34	10,18 ± 1,51	NS
** p valor			NS	NS	
IP (%)					
inicial	13,50 ± 10,37a	10,31 ± 7,56a	56,92 ± 17,81b	57,91 ± 16,75b	< 0,001
2 meses	—	—	34,79 ± 17,01	29,58 ± 14,34	NS
** p valor			0,008	0,001	
SS (%)					
inicial	14,19 ± 4,92a	16,70 ± 5,71a,b	43,86 ± 28,22b	35,63 ± 12,55b	0,001
2 meses	—	—	27,61 ± 24,51	13,85 ± 7,49	NS
** p valor			0,004	0,001	
HbA1c (%)					
inicial	—	9,75 ± 1,69	—	10,39 ± 2,55	NS
2 meses	—	—	—	9,19 ± 2,26	—
** p valor				0,018	

NS – não significativa ($p < 0,05$).

* Teste de Wilcoxon para comparações intragrupos (horizontal).

** Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações entre os grupos controle, DP e DP+DM no tempo inicial. E teste de Mann-Whitney para comparações entre os grupos DP e DP+DM no tempo de 2 meses (vertical).

Letras diferentes indicam que os grupos são estatisticamente diferentes.

A Tabela 6 descreve os dados clínicos de lesões ativas e inativas de sítios periodontais biopsiados dos grupos DP e DP+DM. Não houve diferenças significativas nas comparações intragrupo (sítios ativos e inativos de cada grupo) e intergrupos (sítios ativos dos grupos DP e DP+DM, sítios inativos dos grupos DP e DP+DM).

Tabela 6. Dados clínicos de sítios ativos e inativos submetidos à biópsia gengival dos grupos DP e DP+DM.

Parâmetros clínicos (2 meses)	group DP		group DP+DM	
	Ativo	Inativo	Ativo	Inativo
PS (mm)	4,72 ± 0,96	4,50 ± 0,70	4,46 ± 0,82	4,71 ± 1,08
NCIR (mm)	11,07 ± 3,91	10,33 ± 2,44	12,19 ± 1,97	12,19 ± 3,15
IP (%)	100	100	100	100
SS (%)	100	100	100	100

Média ± desvio-padrão.

Não houve diferenças estatisticamente significantes nas comparações intragrupo and intergrupos (Teste Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Ativo = sítios ativos.

Inativo = sítios inativos.

6.1.2 Análise da expressão gênica

Os resultados da expressão gênica foram dados pelo número de vezes (*fold regulation*) a partir de comparações entre os grupos do estudo (Tabela 7), apresentando expressão *up-regulated* ou *down-regulated*. Foram considerados somente os genes que apresentaram expressão com nível de significância $p < 0,05$ e que estiveram presentes, em pelo menos, 70% do número total de pacientes de cada grupo. Os resultados estão apresentados a seguir em forma de tabelas e gráficos referentes às comparações entre os grupos do estudo.

Tabela 7. Comparações entre os grupos do estudo para a expressão gênica.

Grupos doentes comparados ao grupo controle		
Grupo controle	X	Grupo DM
		Grupo DP
		Grupo DP+DM
Comparações entre os grupos doentes		
Grupo DM	X	Grupo DP
		Grupo DP+DM
Grupo DP	X	Grupo DP+DM
Atividade de doença periodontal		
Grupo DP – sítios inativos	X	Grupo DP – sítios ativos
Grupo DP+DM – sítios inativos	X	Grupo DP+M – sítios ativos

Se houvesse mais de um sítio ativo no mesmo paciente, a seleção deste para biópsia foi realizada a partir do sítio periodontal com maior perda de inserção no momento do exame clínico de dois meses. A seleção do sítio inativo foi realizada a partir do sítio com profundidade de sondagem mais semelhante ao ativo, no mesmo paciente, porém sem perda de inserção.

Comparações entre o grupo controle e os grupos doentes

Pacientes com diabetes (grupo DM)

Os pacientes apenas com diabetes, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 44 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 8. Desses, 43 (97,7%) encontravam-se *up-regulated* e apenas 1 (2,3%) *down-regulated* (Figura 16). Portanto, o grupo DM apresentou um perfil predominantemente *up-regulated* em relação aos pacientes saudáveis.

Tabela 8. Genes do grupo DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

Gene	Fold Regulation	p valor	Função
ABCF1	-9,20	< 0,01	outros
C3	67,30	< 0,01	outros
C4A	14,37	< 0,01	outros
CCL1	303,58	< 0,01	quimiocina
CCL11	205,25	< 0,01	quimiocina
CCL13	17,84	< 0,01	quimiocina
CCL15	326,59	< 0,01	quimiocina
CCL16	27,44	< 0,01	quimiocina
CCL17	20,64	< 0,01	quimiocina
CCL18	27,30	0,02	quimiocina
CCL19	20,38	< 0,01	quimiocina
CCL21	39,01	< 0,01	quimiocina
CCL23	141,48	< 0,01	quimiocina
CCL25	2,94	< 0,01	quimiocina
CCL26	3926,12	< 0,01	quimiocina
CCL3	11,77	< 0,01	quimiocina
CCL7	97,24	< 0,01	quimiocina
CCR4	144,58	< 0,01	receptor de quimiocina
CCR6	23,82	< 0,01	receptor de quimiocina
CCR8	348,12	< 0,01	receptor de quimiocina
CEBPB	4804,50	< 0,01	outros
CRP	2430,65	< 0,01	outros
CX3CR1	10,91	< 0,01	receptor de quimiocina
CXCL1	123,84	< 0,01	quimiocina
CXCL3	1181,19	< 0,01	quimiocina
CXCL6	38,24	< 0,01	quimiocina
CXCL9	10,17	< 0,01	quimiocina
CXCR1	417,48	< 0,01	receptor de quimiocina
CXCR2	99,20	< 0,01	receptor de quimiocina
IL10	70,61	< 0,01	citocina
IL10RA	25,51	< 0,01	receptor de citocina
IL17C	4569,74	< 0,01	citocina
IL1A	9,91	< 0,01	citocina
IL1F10	145,37	< 0,01	citocina
IL22	52,98	< 0,01	citocina
IL36A	65,33	< 0,01	citocina

Gene	Fold Regulation	p valor	Função
IL36G	32,53	< 0,01	citocina
IL37	17,59	< 0,01	citocina
IL5RA	496,96	< 0,01	receptor de citocina
LTA	649,21	< 0,01	citocina
LTB	172,00	< 0,01	citocina
SPP1	49,72	< 0,01	citocina
TOLLIP	2,45	< 0,01	outros
XCR1	57,01	< 0,01	receptor de quimiocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;

fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;

outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 16. Genes do grupo DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

(A)

(B)

(continua)

Foi realizado um painel com três gráficos baseado em diferentes escalas, conforme o valor do *fold regulation*:

(A) valores do *fold regulation* entre 599 e 6000;

(B) valores do *fold regulation* entre 100 e 500;

(C) valores do *fold regulation* entre -20 e 99.

As barras localizadas no lado positivo do eixo indicam genes *up-regulated* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated*.

Pacientes com periodontite crônica (grupo DP)

Os pacientes portadores somente de periodontite crônica, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 4 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 9. Dos genes diferencialmente expressos no grupo DP, todos (100%) se encontravam *down-regulated* (Figura 17). Portanto, o grupo DP apresentou um perfil *down-regulated* em relação aos pacientes saudáveis.

Tabela 9. Genes do grupo DP diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

	Gene	Fold Regulation	p valor	Função
DP ativo	CCL25	-154,23	< 0,01	quimiocina
	CCR1	-9,57	0,03	receptor de quimiocina
	CX3CR1	-16,08	0,01	receptor de quimiocina
	TOLLIP	-10,00	0,01	outros
DP inativo	CCL25	-96,37	0,01	quimiocina
	CX3CR1	-16,39	0,01	receptor de quimiocina
	TOLLIP	-4,64	0,01	outros

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;
fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;
 outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 17. Genes do grupo DP diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

As barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated*.

Pacientes com periodontite crônica associada ao diabetes (grupo DP+DM)

Os pacientes portadores de periodontite crônica associada ao diabetes mellitus, quando comparados aos pacientes controles, apresentaram 4 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 10. Dos genes diferencialmente expressos no grupo DP+DM, todos (100%) se encontravam *down-regulated* (Figura 18). Portanto, o grupo DP+DM apresentou um perfil *down-regulated* em relação aos pacientes saudáveis.

Tabela 10. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

	Gene	Fold Regulation	p valor	Função
DP+DM ativo	ABCF1	-2,02	0,02	outros
	CCL25	-10,35	0,02	quimiocina
	CX3CR1	-20,18	0,02	receptor de quimiocina
DP+DM inativo	ABCF1	-2,16	0,02	outros
	CCL25	-18,18	0,02	quimiocina
	CX3CR1	-13,35	0,02	receptor de quimiocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;
fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;
 outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 18. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo controle.

As barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated*.

Comparações entre os grupos doentes

Perfil da expressão gênica do grupo DP comparado ao grupo DM

Os pacientes apenas com periodontite, quando comparados aos pacientes somente com diabetes, apresentaram 36 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 11. Desses, 4 genes (11,1%) encontravam-se *up-regulated* e 32 (88,9%) *down-regulated* (Figura 19). Portanto, o grupo DP apresentou um perfil predominantemente *down-regulated* em relação aos pacientes diabéticos.

Tabela 11. Genes do grupo DP diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DM.

	Gene	Fold Regulation	p valor	Função
DP ativo	ABCF1	5,64	0,00	outros
	C4A	-286,83	0,04	outros
	CCL11	-834,50	0,05	quimiocina
	CCL13	-181,44	0,03	quimiocina
	CCL19	-90,53	0,02	quimiocina
	CCL2	2,25	0,01	quimiocina
	CCL24	-45,97	0,00	quimiocina
	CCL25	-397,83	0,01	quimiocina
	CCL7	-1772,12	0,04	quimiocina
	CCL8	-51,11	0,00	quimiocina
	CCR1	-13,23	0,01	receptor de quimiocina
	CCR2	-59,19	0,03	receptor de quimiocina
	CCR3	-116,40	0,03	receptor de quimiocina
	CCR4	-1993,75	0,00	receptor de quimiocina
	CCR6	-131,77	0,03	receptor de quimiocina
	CEBPB	-36781,81	0,03	outros
	CX3CR1	-147,63	0,03	receptor de quimiocina
	CXCL1	-88,34	0,01	quimiocina
	CXCL3	-2117,83	0,01	quimiocina
	CXCL6	-109,37	0,01	quimiocina
	CXCL9	-35,39	0,01	quimiocina
	IFNA2	-258,97	0,03	citocina
	IL10	-288,71	0,04	citocina
	IL17C	-53176,81	0,04	citocina
	IL1A	-17,92	0,01	citocina
	IL1B	-5,51	0,01	citocina
	IL1F10	-511,97	0,02	citocina
	IL1RN	231,65	0,00	receptor de citocina
	IL5	-151,44	0,02	citocina
	CXCR2	-205,71	0,00	receptor de quimiocina
	IL9R	-249,94	0,03	receptor de citocina
	LTB	-119,78	0,03	citocina
	AIMP1	3,33	0,00	citocina
	TNF	-17,33	0,01	citocina
	CD40LG	-16,79	0,03	outros
	XCR1	-344,00	0,04	receptor de quimiocina

	Gene	<i>Fold Regulation</i>	<i>p</i> valor	Função
DP inativo	CCL11	-495,18	0,05	quimiocina
	CCL13	-93,77	0,03	quimiocina
	CCL19	-47,88	0,02	quimiocina
	CCL24	-35,96	0,00	quimiocina
	CCL25	-266,02	0,01	quimiocina
	CCL7	-924,35	0,04	quimiocina
	CCR1	-11,48	0,01	receptor de quimiocina
	CCR4	-1406,31	0,00	receptor de quimiocina
	CEBPB	-23036,66	0,03	outros
	CX3CR1	-141,42	0,03	receptor de quimiocina
	CXCL1	-35,90	0,01	quimiocina
	CXCL3	-1546,79	0,01	quimiocina
	CXCL6	-33,85	0,02	quimiocina
	CXCL9	-32,39	0,00	quimiocina
	IFNA2	-336,16	0,03	citocina
	IL10	-311,50	0,05	citocina
	IL17C	-28878,59	0,04	citocina
	IL1A	-19,90	0,01	citocina
	IL1F10	-609,78	0,02	citocina
	IL5	-53,54	0,02	citocina
	CXCR2	-314,12	0,00	receptor de quimiocina
	IL9R	-50,20	0,03	receptor de citocina
	LTB	-101,17	0,02	citocina
	TNF	-20,69	0,00	citocina
	XCR1	-279,25	0,04	receptor de quimiocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo DM;
fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;
 outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 19. Genes do grupo DP diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DM.

(continua)

Foi realizado um painel com quatro gráficos baseado em diferentes escalas, conforme o valor do *fold regulation*:

(A) valores do *fold regulation* entre -23000 e -55000;

(B) valores do *fold regulation* entre -22999 e -500;

(C) valores do *fold regulation* entre -100 e -500;

(D) valores do *fold regulation* entre -99 e 10.

As barras localizadas no lado positivo do eixo indicam genes *up-regulated* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated*.

Perfil da expressão gênica do grupo DP+DM comparado ao grupo DM

Os pacientes com periodontite associada ao diabetes, quando comparados aos pacientes somente com diabetes, apresentaram 36 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 12. Desses, 4 genes (11,1%) encontravam-se *up-regulated* e 32 (88,9%) *down-regulated* (Figura 20). Portanto, o grupo DP+DM apresentou um perfil predominantemente *down-regulated* em relação aos pacientes diabéticos.

Tabela 12. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DM.

	Gene	Fold Regulation	p valor	Função
DP+DM ativo	ABCF1	5,11	< 0,01	outros
	C4A	-48,43	0,04	outros
	CCL11	-1107,95	0,05	quimiocina
	CCL13	-146,72	0,03	quimiocina
	CCL19	-33,26	0,02	quimiocina
	CCL7	-9,79	0,01	quimiocina
	CCL8	-939,39	0,04	quimiocina
	CCR2	-4,87	0,02	receptor de quimiocina
	CCR4	-821,52	< 0,01	receptor de quimiocina
	CCR6	-97,66	0,03	receptor de quimiocina
	CEBPB	-3436,16	0,03	outros
	CXCL1	-86,15	0,01	quimiocina
	CXCL3	-2195,20	0,01	quimiocina
	CXCL6	-85,57	0,01	quimiocina
	CXCL9	-118,63	< 0,01	quimiocina
	IFNA2	-253,57	0,03	citocina
	IL10	-345,32	0,05	citocina
	IL17C	-18163,29	0,04	citocina
	IL1A	-13,03	0,01	citocina
	IL1F10	-1289,18	0,02	citocina
	IL1RN	121,57	< 0,01	receptor de citocina
	IL5	-87,08	0,02	citocina
	IL8	2,04	0,01	quimiocina
	CXCR2	-166,46	< 0,01	receptor de quimiocina
	IL9R	-89,48	0,03	receptor de citocina
	LTB	-224,66	0,02	citocina
	LTB4R	4,18	0,01	quimiocina
	TNF	-32,54	< 0,01	citocina
	CD40LG	-44,06	0,03	citocina
	XCR1	-158,59	0,04	receptor de quimiocina
DP+DM inativo	ABCF1	4,79	< 0,01	outros
	CCL11	-489,91	0,05	quimiocina
	CCL13	-105,90	0,03	quimiocina
	CCL19	-28,16	0,02	quimiocina
	CCL24	-3,33	< 0,01	quimiocina
	CCL5	-4,70	0,02	quimiocina

Gene	Fold Regulation	p valor	Função
CCL7	-811,41	0,04	quimiocina
CCL8	-37,02	< 0,01	quimiocina
CCR2	-56,00	0,03	receptor de quimiocina
CCR4	-546,67	< 0,01	receptor de quimiocina
CCR6	-79,88	0,03	receptor de quimiocina
CEBPB	-3748,38	0,03	outros
CXCL1	-131,26	0,01	quimiocina
CXCL3	-3155,47	0,01	quimiocina
CXCL6	-84,64	0,01	quimiocina
CXCL9	-224,98	< 0,01	quimiocina
IFNA2	-206,25	0,03	citocina
IL10	-277,40	0,05	citocina
IL17C	-12940,02	0,03	citocina
IL1A	-8,58	0,01	citocina
IL1F10	-1281,39	0,02	citocina
IL1RN	146,80	< 0,01	receptor de citocina
IL5	-50,69	0,02	citocina
CXCR2	-162,78	< 0,01	receptor de quimiocina
LTB	-153,02	0,02	citocina
LTB4R	4,95	< 0,01	quimiocina
AIMP1	2,52	0,01	citocina
TNF	-18,17	0,01	citocina
XCR1	-145,12	0,04	receptor de quimiocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo DM;
fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;
 outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 20. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DM.

(continua)

Foi realizado um painel com três gráficos baseado em diferentes escalas, conforme o valor do *fold regulation*:

(A) valores do *fold regulation* entre -20000 e -800;

(B) valores do *fold regulation* entre -799 e -100;

(C) valores do *fold regulation* entre -99 e 10.

As barras localizadas no lado positivo do eixo indicam genes *up-regulated* e as barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated*.

Perfil da expressão gênica do grupo DP+DM comparado ao grupo DP

Os pacientes com periodontite associada ao diabetes, quando comparados aos pacientes somente com periodontite, apresentaram 11 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 13. Desses, 10 genes (90,9%) encontravam-se *up-regulated* e 1 (9,1%) *down-regulated* (Figura 21). Portanto, o grupo DP+DM apresentou um perfil predominantemente *up-regulated* em relação aos pacientes diabéticos.

Tabela 13. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DP.

	Gene	Fold Regulation	p valor	Função
DP ativo x DP+DM ativo	CCL24	29,52	< 0,01	quimiocina
	CCL25	55,12	< 0,01	quimiocina
	CCL26	9,90	< 0,01	quimiocina
	CCL3	11,81	< 0,01	quimiocina
	CCR3	58,98	< 0,01	receptor de quimiocina
	CEBPB	10,10	< 0,01	outros
	IL37	13,23	< 0,01	citocina
	CXCR1	7,69	0,01	receptor de quimiocina
DP inativo x DP+DM inativo	CCL15	-10,97	0,02	quimiocina
	CCL24	34,81	< 0,01	quimiocina
	CCL25	57,86	< 0,01	quimiocina
	CCL3	9,15	< 0,01	quimiocina
	CCR1	7,74	0,01	receptor de quimiocina
	CCR3	38,66	< 0,01	receptor de quimiocina
	IL37	26,47	< 0,01	citocina
	IL22	9,04	0,01	citocina
	CXCR1	23,90	< 0,01	receptor de quimiocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;

fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;

outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 21. Genes do grupo DP+DM diferencialmente expressos em comparação aos genes do grupo DP.

As barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated* e as barras localizadas no lado positivo correspondem aos genes *up-regulated*.

Perfil da atividade

Pacientes com periodontite crônica (grupo DP)

No grupo de pacientes somente com periodontite, quando comparamos os sítios ativos aos sítios inativos, houve 9 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 14. Desses, 7 genes (77,8%) encontravam-se *up-regulated* e 2 (22,2%) *down-regulated* (Figura 22). Portanto, os sítios ativos apresentaram um perfil predominantemente *up-regulated* em relação aos sítios inativos, no grupo DP.

Tabela 14. Genes dos sítios ativos diferencialmente expressos em comparação aos genes dos sítios inativos, no grupo DP.

Gene	Fold Regulation	p valor	Função
ABCF1	-0,39	< 0,01	outros
CCL18	4,95	0,01	quimiocina
CCR2	6,86	< 0,01	receptor de quimiocina
CCR4	5,12	0,02	receptor de quimiocina
CCR7	4,57	0,02	receptor de quimiocina
CXCL1	3,98	0,01	quimiocina
IL10	-2,01	0,03	citocina
IL5	4,36	0,01	citocina
CD40LG	4,20	< 0,01	citocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;

fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;

outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 22. Genes dos sítios ativos diferencialmente expressos em comparação aos genes dos sítios inativos, no grupo DP.

As barras localizadas no lado negativo do eixo correspondem aos genes *down-regulated* e as barras localizadas no lado positivo correspondem aos genes *up-regulated*.

Pacientes com periodontite crônica associada ao diabetes (grupo DP+DM)

No grupo de pacientes com periodontite associada ao diabetes, quando comparamos os sítios ativos aos sítios inativos, há 6 genes expressos diferencialmente como mostra a Tabela 15. Desses, todos (100%) se encontravam

up-regulated (Figura 23). Portanto, os sítios ativos apresentaram um perfil *up-regulated* em relação aos sítios inativos, no grupo DP.

Tabela 15. Genes dos sítios ativos diferencialmente expressos em comparação aos genes dos sítios inativos, no grupo DP+DM.

Gene	Fold Regulation	p valor	Função
CCL17	2,58	< 0,01	quimiocina
CCL19	3,22	< 0,01	quimiocina
CCL8	2,87	0,01	quimiocina
CXCL12	2,72	< 0,01	quimiocina
CXCR1	10,82	< 0,01	receptor de quimiocina
LTA	3,73	< 0,01	citocina

Gene = gene expresso de forma significativa em relação ao grupo controle;

fold regulation = número de vezes que a expressão está aumentada ou diminuída em relação ao grupo controle;

outros = outros genes envolvidos na resposta inflamatória.

Figura 23. Genes dos sítios ativos diferencialmente expressos em comparação aos genes dos sítios inativos, no grupo DP+DM.

As barras localizadas no lado positivo correspondem aos genes *up-regulated*.

6.2 Discussão e conclusão

O presente estudo avaliou a expressão gênica de sítios ativos de pacientes periodontais com ou sem diabetes, após terapia periodontal básica. Em 2000, Reddy *et al.* (2000) relataram a necessidade de uma investigação que avaliasse a

progressão da doença periodontal após a terapia periodontal. Para o nosso conhecimento, não há estudos que analisaram o perfil da expressão de genes relacionados à via de inflamação em lesões periodontais ativas após a terapia periodontal básica. Beikler *et al.* (2008) analisaram o perfil de expressão gênica de sítios periodontais com bolsas residuais após terapia periodontal básica, mas não de sítios com perda de inserção progressiva. Adicionalmente, o entendimento da genética e da progressão da doença periodontal pode fornecer informações valiosas para a identificação de marcadores como instrumento de diagnóstico (Taba *et al.*, 2005).

Um importante achado deste estudo foi que em sítios periodontais de pacientes com ou sem diabetes (grupos DP e DP+DM) após a terapia básica, o perfil de expressão gênica foi *down-regulated* em comparação aos pacientes periodontal e sistemicamente saudáveis (grupo controle). Os genes diferencialmente expressos nos grupos com periodontite foram: TOLLIP, ABCF1, CCL25, CCR1, CX3CR1. O gene TOLLIP expressa a proteína que é componente da via de sinalização de receptores de IL-1 e Toll-like e inibe a ativação celular por produtos bacterianos (Burns *et al.*, 2000; Zhang; Ghosh, 2002). Já o gene ABCF1 expressa a proteína que transporta várias moléculas através das membranas extra-e intra-celulares e desempenham um papel no aumento da síntese protéica (Ota *et al.*, 2007). Entretanto, o gene ABCF1 deve ser melhor investigado em relação à doença periodontal, devido à escassez de literatura sobre o assunto. As quimiocinas e seus receptores, por sua vez, estão envolvidos na atividade quimiotática células inflamatórias como macrófagos (Queiroz *et al.*, 2008).

A expressão diminuída de genes da resposta inflamatória e imune pode indicar que a terapia periodontal provocou uma forte redução no ataque bacteriano, dessa forma, resultando em uma expressão reduzida destes genes como uma tentativa do hospedeiro controlar a infecção. Em concordância com o presente estudo, Beikler *et al.* (2008) também mostrou um perfil *down-regulated* na expressão gênica de sítios periodontais 6 a 8 semanas após a terapia básica.

Por outro lado, nossos resultados estão em contraste com relatos de outros estudos, que mostraram um aumento na expressão gênica de citocinas específicas em pacientes periodontais mesmo após a terapia periodontal (Garlet *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 2001). No estudo de Garlet *et al.* (2006), biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica foram obtidas quatro semanas após a terapia

periodontal básica, e eles demonstraram um aumento significativo na expressão de TNF- α e IL-10 mRNA. No entanto, um fator importante a ser considerado é que a avaliação de sítios periodontais após dois meses de terapia básica pode ser tardia em relação à expressão gênica, pois neste período provavelmente já houve uma redução de bactérias e de moléculas envolvidas no reparo.

Quando os grupos com diabetes (grupos DM e DP+DM) foram incluídos nas comparações de perfis de expressão gênica (Figuras 2, 5, 6 e 7), foi possível observar um estado hiper-inflamatório originado do diabetes, especialmente em nossos pacientes diabéticos, os quais eram pobremente controlados (níveis de HbA1c em torno de 9 a 10% em ambos os grupos) (Lalla *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2007). Portanto, isso nos mostra que o perfil *down-regulated* dos grupos com periodontite (DP e DP+DM) comparados ao controle parece estar diretamente relacionado com a terapia periodontal.

O presente estudo analisou a expressão gênica em sítios ativos e inativos de pacientes com periodontite, associado ou não ao diabetes (grupos DP+DM e DP respectivamente). No grupo DP, CD40LG, IL5, CCL18, CXCL1, CCR2, CCR4 e CCR7 foram significativamente mais expressos em sítios ativos quando comparados aos inativos. No grupo DP+DM, os sítios ativos também mostraram um perfil *up-regulated*, quando comparados aos sítios inativos, com uma expressão aumentada de LTA, CCL19, CCL17, CCL8, CXCL12 e CXCR1.

Uma lesão periodontal ativa caracteriza-se por uma infiltração proeminente de células T ativadas (Okada *et al.*, 1983; Malberg *et al.*, 1992), que expressam citocinas das respostas Th1 (INF, IL1, IL6, TNF) e Th2 (IL10, IL13, IL4, IL5) (Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; 2006). Confirmando os achados destes estudos, genes IL5 e LTA estavam *up-regulated* em sítios ativos dos grupos DP e DP+DM respectivamente. Já o gene CD40LG codifica uma citocina pró-inflamatória com o mesmo nome, que é normalmente expressa em células Th1 e Th2 e plaquetas ativadas (Datta; Kalled, 1997). A proteína solúvel CD40 também tem sido descrita como marcador de lesão vascular (Heeschen *et al.*, 2003). Recentemente, Marcaccini *et al.* (2009) mostraram um aumento dos níveis plasmáticos de sCD40L em pacientes com periodontite.

Estudos longitudinais sobre a progressão da periodontite indicam que a taxa de destruição periodontal é baixa e ocorre em poucos indivíduos e em poucos sítios periodontais (Lindhe *et al.*, 1989; Hugosan; Laurell, 2000). A perda de inserção

periodontal episódica pode estar associadas a variações na população de células inflamatórias supracrestal, na qual um número significativamente maior de mastócitos, monócitos/macrófagos e células plasmáticas estão presentes em sítios ativos, em comparação aos sítios inativos (Zappa *et al.*, 1991). Estas células são atraídas para as áreas de infecção por proteínas com propriedades quimiotáticas denominadas quimiocinas. Adicionalmente, tem sido relatado que quimiocinas mediam e estimulam a liberação de produtos inflamatórios (Queiroz *et al.*, 2008). Uma análise de lesões periodontais revelou que genes de quimiocinas, incluindo IL-8, MCP-1 e RANTES, estavam *up-regulated* em sítios doentes (Tsai *et al.*, 1995; Fokkema *et al.*, 2003; Emingil *et al.*, 2004). Na presente investigação, algumas quimiocinas estavam *up-regulated* em sítios ativos dos grupos DP e DP+DM, de acordo com achados da literatura atual.

Apenas dois genes, ABCF1 e IL10, estavam *down-regulated* na comparação entre sítios ativos e inativos. Não há relatos na literatura sobre o papel do gene ABCF1 na doença periodontal, como dito anteriormente. Já o gene IL10 expressa a citocina anti-inflamatória que inibe a expressão de citocinas Th1 (Astermark *et al.*, 2006). O regulamento para baixo do gene IL10 em sítios ativos está de acordo com os dados encontrados por Dutzan *et al.* (2009).

Nossos dados demonstraram que os genes diferencialmente expressos nos grupos com doença periodontal podem ser relacionados com a resposta imuno-inflamatória e com a perda de inserção episódica, podendo então explicar parcialmente os mecanismos associados com a destruição dos tecidos de suporte do dente. No entanto, deve ser salientado que os resultados deste estudo são baseados em um número relativamente baixo de amostras e que merece interpretação cautelosa. Mais estudos são necessários para interpretar com propriedade a expressão de genes relacionados com a via inflamatória e sua interação nos tecidos periodontais após a terapia básica. É importante considerar também que a expressão gênica não pode predizer os níveis de proteínas. Portanto, análises complementares, incluindo a caracterização de fenótipos de células, imunohistoquímica e ELISA, em biópsias gengivais, fluido crevicular gengival e saliva devem ser realizadas em associação com a análise de expressão gênica. A correlação direta entre mRNA e os níveis de proteína poderia melhor esclarecer o papel desses marcadores na periodontite relacionada ou não a doenças sistêmicas como diabetes.

Dentro dos limites do presente estudo, o diabetes sobre-regula a expressão gênica da resposta imune-inflamatória; entretanto, a terapia periodontal tende a diminuir a expressão desses genes quando comparados os grupos DP e DP+DM aos controles saudáveis. Sítios periodontais ativos apresentam uma resposta predominantemente *up-regulated* em ambos os grupos. Genes específicos, CD40LG, IL5, LTA, CCL18, CXCL1, CCR2, CCR4, CCR7, CCL19, CCL17, CCL8, CXCL12, e CXCR1, podem ser considerados úteis na indicação de potenciais biomarcadores para diagnóstico da doença periodontal ativa; no entanto, mais estudos devem investigá-los nesta condição e correlacioná-los com a expressão das proteínas codificadas por eles.

6.3 Artigo em inglês

Progressive periodontal sites from diabetic patients have up-regulated inflammatory response

Running title: Progressive periodontal sites from diabetic patients

Priscila Paganini Costa¹, Viviane Casagrande Mariguela¹, Ingrid Webb Josephson Ribeiro¹, Daniela Bazan Palioto¹, Márcio Fernando de Moraes Grisi¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹, Arthur Belém Novaes Júnior¹, Mario Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone number: 55 16 36024135. Fax number: 55 16 3602 4788

Corresponding author:

Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Periodontitis; Type 2 Diabetes Mellitus; Periodontal Attachment Loss; Genes

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no potential conflict of interest. This study was financially supported by FAPESP.

Abstract

Background: Diabetes mellitus (DM) has a deleterious impact on the periodontal status collaborating for disease progression. The aim of this study was to analyze the gene expression profile for immune-inflammatory response in progressive periodontal sites in patients with or without type 2 DM.

Material and Methods: Twenty-one patients were enrolled: ten with chronic periodontitis (PD group), and eleven with chronic periodontitis and DM (PD+DM group). Clinical measurements were performed before and two months after non-surgical periodontal therapy with a computerized periodontal probe. Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured in the diabetic patients. Gingival biopsies from the sites with progressive attachment loss ≥ 1 mm at the recall visit were harvested for Real Time PCR Array gene expression analysis.

Results: The average attachment loss of progressive sites were significantly different between the groups PD+DM 1.42 ± 0.13 mm and PD 1.25 ± 0.16 mm ($p < 0.05$). Eight out of a panel of 82 analyzed genes (CEBPB, IL37, CCR3, CCL26, CCL25, CCL24, CCL3 and CXCR1) were differentially expressed and showed an up-regulated pattern in the PD+DM group ($p < 0.05$).

Conclusion: It may be concluded that an up-regulated inflammatory response is associated to the more severe and progressive periodontal sites of diabetic patients.

Introduction

Chronic periodontitis is an infection caused by groups of specific microorganisms, resulting in progressive destruction of the supporting tissues of the teeth with episodic nature (Armitage, 1999; Hernandez *et al.*, 2011). Disease progression is often determined by loss of the attachment level; sequential probing of periodontal attachment remains the most commonly utilized method to diagnose progressive destruction of the periodontium (Hernandez *et al.*, 2011).

Tissue destruction appears to result from a complex interaction between these bacteria and the host's immune-inflammatory response (Silva *et al.*, 2008). Locally, bacterial lipopolysaccharides induce inflammatory cells to release proinflammatory mediators that seem to act in the destruction of the periodontal tissues (Loss, 2005; Taba *et al.*, 2005). The presence of inflammatory cells and lymphocytes in the infiltrate, the chemotactic factors involved in the recruitment of these cells and cytokines are involved in the pathogenesis and progression of the periodontal disease (Gamonal *et al.*, 2000).

Some factors can modify the host's response to periodontal pathogens and therefore alter the expression and progression of the disease. Diabetes mellitus is recognized as a major risk factor for periodontitis (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008). Type 2 diabetes, the most common form, can modulate the periodontal tissue destruction by dysfunction of polymorphonuclear leukocytes, vascular changes, impairment of the synthesis of glycosaminoglycans and collagen by gingival fibroblasts, formation of advanced glycation end products (AGEs), with consequent increase in production of proinflammatory cytokines and the occurrence of a hyper-inflammatory state (Graves *et al.*, 2007). Furthermore, both periodontitis and DM share common mechanisms of pathogenesis that are related to altered immune-inflammatory responses at local and/or systemic levels (Southerland *et al.*, 2006).

Goodson *et al.* (1982) have presented evidence indicating that periodontal disease has dynamic states of exacerbation and remission and can be described in terms of patterns of progression and regression of the disease. Even after periodontal therapy, some sites can continue to lose attachment. Considerable effort has been made to study mediator profile involved in the pathogenesis of chronic periodontitis. However, the definition of active sites, where current periodontal breakdown occurs, and consecutive characterization of the mediators involved are

still among the main concerns. Studies have been limited to checking specific genes (Bickel *et al.*, 2001; Yoshinari *et al.*, 2004; Garlet *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2011) and a more comprehensive analysis of gene expression related to progressive periodontal sites is needed.

The aim of present investigation was to analyze the gene expression profile associated to immune and inflammatory processes in progressive periodontal sites after non-surgical periodontal therapy, in patients with or without type 2 Diabetes mellitus.

Material and Methods

Study subjects

The present study was carried out at the University of São Paulo between February 2009 and July 2011 as a joint collaboration of the Department of Oral Surgery and Periodontology and the Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism. It was reviewed and approved by the Institutional Human Research Committee of the University of São Paulo (n. 2009.1.88.58.7). Forty-one patients were selected and informed about the nature of the proposed study and informed consent forms were signed.

The study population aged between 35 - 65 years old and presented a minimum of 14 natural teeth and, 10 of which should be posterior teeth. The proposed criterion for periodontitis case definition was the presence of five teeth with a probing pocket depth (PPD) of ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm (Hernandez *et al.*, 2006). The exclusion criteria were: (i) smoking within the last 5 years; (ii) pregnancy or lactancy; (iii) use of antibiotics or periodontal therapy in the previous six months; (iv) concomitant medical therapy, except for diabetic condition; (v) other inflammatory conditions; (vi) major diabetic complications such as retinopathy, nephropathy, neuropathy and atherosclerosis.

Qualified subjects who agreed to participate in the study were rescheduled for laboratory and clinical examinations. From forty-one subjects who presented all inclusion criteria, only twenty-one patients were included in this study and were divided in two groups: PD group (n = 10) had subjects who were systemically healthy and clinically diagnosed with chronic periodontitis (Armitage, 1999); and PD+DM group (n = 11) had subjects with chronic periodontitis (Armitage, 1999) and

previously diagnosed type 2 Diabetes mellitus diagnosed for at least 5 years and glycated hemoglobin (HbA1c) levels > 7% (American Diabetes Association, 2009).

Clinical parameters

Clinical examination was performed at baseline and two months after non-surgical periodontal therapy by one trained and calibrated examiner. Intra-examiner calibration was performed in three patients with a 20-minute interval between the exams in the same patient. Intra-class correlation coefficient of > 0.90 was obtained in probing pocket depth. The probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (rCAL) and bleeding on probing (BOP) were recorded at six sites per tooth with the aid of a computerized periodontal probe (Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA). BOP was assessed according to presence or absence of bleeding up to 30 seconds after probing. The presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index - PI) were recorded (O'Leary *et al.*, 1972). It was also verified the furcation involvement with the aid of a manual periodontal probe (Nabers, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Glycated hemoglobin (HbA1c) measurement

For the metabolic control assessment, the HbA1c levels were analyzed in PD+DM group before and two months after non-surgical periodontal therapy, at the Endocrinology Clinic of the Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo. The HbA1c data were measured by ion exchange chromatography HPLC (high-performance liquid chromatography) and is expressed in percentage. Patients of the PD group were underwent measurements of fasting plasma glucose for only to rule out the possibility of presenting diabetes.

Non-surgical periodontal therapy

The scaling and root planning sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24- to 48-hour interval (Quirynen *et al.*, 1999) using hand instruments (Gracey curettes, Hu-Friedy Instruments, Chicago, IL, USA) and an ultrasonic device (Cavitron, Dentsply, York, PA, USA) in PD and PD+DM groups. Teeth presenting periapic radiolucencies and severe periodontal destruction were extracted. Oral hygiene was reviewed after a week and after a month of periodontal disinfection, followed by prophylaxis.

In PD+DM group, the non-surgical periodontal therapy was associated with systemic doxycycline (Vibramicina, Pfizer, São Paulo, SP, Brazil) 100 mg/day, for two weeks after an initial dose of 200 mg, started on the day before periodontal therapy (O'Connell et al., 2008).

Periodontal disease activity

Disease activity diagnostic was adapted clinically by the tolerance method (Haffajee *et al.*, 1983), that verify clinical attachment loss every two months. According to the tolerance method adapted to the computerized periodontal probe, periodontal sites considered actives if they exhibited clinical attachment loss of ≥ 1 mm (considering the standard deviation of 0.3 mm for the electronic probe multiplied by 3) two months after non-surgical periodontal therapy. Only the patients who presented disease activity were included. Teeth with prosthesis or furcation lesions were not considered for periodontal disease activity.

Gingival biopsy

Gingival tissue samples were obtained from active sites of the each patient of PD and PD+DM groups during regular periodontal surgery. The excised gingival collar was then carefully removed from the roots and the alveolar process. Gingival biopsy comprised epithelial and connective tissues. The samples are immediately submerged into liquid nitrogen to be then stored at -80°C for RNA extraction and gene expression analysis.

RNA extraction

Total RNA from biopsies was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Milan, Italy) according to the directions supplied by the manufacturer. Briefly, Trizol (1 ml/ mg tissue) was added to the biopsy, shaken for 30s and incubated at room temperature for 5 min. To each milliliter of the suspension, 0.2 ml of chloroform (Sigma, St Louis, MO, USA) was added, vortexed and then centrifuged at $12,000 \times g$ by 15 min for 4°C . The aqueous phase was transferred to a new tube, to which the same volume of isopropanol (Sigma, St Louis, MO, USA) was added. The sample was vortexed, incubated for 20 min at -20°C and centrifuged. The pellet was washed in 100% ethanol (Merck, Inc., Whitehouse station, NJ, USA) and dried at room temperature. RNA samples were resuspended in 50 μl of diethylpyrocarbonate

(DEPC)-treated water and stored at -80°C. RNA samples were submitted to electrophoresis in denaturing gel (2% agarose containing 2.2M of formaldehyde and 1X MOPS buffer) for integrity verification. The concentration of RNA was determined from optical density at a wavelength of 260 nm and thus it stored under -80°C.

cDNA Synthesis

From 1 µg of total RNA, a strand of complementary DNA (cDNA) was synthesized through a reverse transcription reaction (RT² First Strand Kit, SABioscience (code C03), Frederick, MD, USA), according to the directions supplied by the manufacturer. At the end of this reaction, cDNA was stored at -20°C for later use.

Real-time PCR array

The RT-PCR array allowed simultaneous analysis of 84 genes involved in specific signaling pathways. The genes included in PCR array plates for human inflammatory cytokines and receptors (PAHS-011, PCR Array SuperArray, SABiosciences, Frederick, MD, USA) are described below:

Chemokine gene:

CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2), CCL25 (TECK) , CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL8, CCL13 (mcp-4)

Chemokine receptor:

CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CCXCR1)

Cytokine gene:

CD40LG (TNFSF5), IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1, SPP1, TNF, IFNA2

Cytokine receptor:

IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9R, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R

Other genes involved in inflammatory response:

ABCF1, ICEBERG (CARD18), BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, C5, TOLLI

The reactions were carried out in duplicates for each sample. For each PCR reaction in real time, we used: 1350 µl of buffer (2X SuperArray RT² qPCR Master Mix - SyberGreen, SABiosciences, Frederick, MD, USA); 102 µl of cDNA synthesis reaction diluted; 1248 µl of RNase free water. Twenty-five µl were added to this mixture in each well of a 96-well plate already containing lyophilized primers pairs for inflammatory pathway and cytokines. Then, the reaction was performed on a real-time thermocycler (CFX96TM Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Conditions of real time PCR were as follows: 10 minutes at 95°C (activate the HotStart DNA polymerase) and 40 cycles for amplification for 15 sec at 95°C (denaturation), 30 to 40 sec at 55°C (annealing) and 30 sec at 72°C (extension). Following sample amplification, calculations were performed for this analysis.

Statistical analysis

Clinical parameters:

Data were registered as mean and standard deviation, and the experimental unit was the subject and the periodontal site. Data were tested for normality before applying the adequate parametric or non-parametric tests. In the clinical and diabetic parameters, Wilcoxon test was applied for intra-group analysis, and Mann-Whitney test was used for intergroup comparison. SPSS Statistics 17.0 software package (SPSS Statistics 17.0, IBM Corporation, New York, NY, USA) was used for statistical analysis.

Real Time PCR Array:

The differential expression calculation was done by specific software for data analysis (RT² Profiler PCR Array Data Analysis, SuperArray, SABiosciences, Frederick, MD, USA). Genes that present threshold cycles (Ct) higher than 30 were considered not expressed. Relative gene expression normalization and quantification was performed by 2- $\Delta\Delta$ CT method (Livak and Schmittgen, 2001). This software also performed pair-wise comparisons among groups of experimental replicates and defined fold-change and statistical significant thresholds. Therefore, data were

presented as a difference (fold regulation) in gene expression, which would be normalized by the geometric mean value of five genes from the endogenous control (B2M, HPRT1, RPL13A, GADPH, ACTB). Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Forty-one patients were selected; however, five patients were eliminated because they did not finish the treatment, two patients, because they had cancer and the other patients, for not having active periodontal sites. The final sample consisted of 21 patients.

The demographic and clinical data of twenty-one patients evaluated with progressive chronic periodontitis are displayed in Table 1. There was a higher prevalence in women and Caucasians in both groups; however, in the PD+DM group, the distribution was more homogeneous. The average age of the PD and PD+DM groups were similar. At baseline and at the 2-month evaluation, both groups (PD and PD+DM groups) had similar mean values for clinical parameters.

Both PD and PD+DM groups showed a significant reduction in the clinical parameters two months after non-surgical periodontal therapy ($p < 0.05$), except in the relative clinical attachment level parameter, a gain was observed but without statistically significant difference. The glycated hemoglobin levels in the PD+DM group showed statistically significant differences ($p < 0.05$) between baseline and two-month evaluation with an average reduction of 1.20 that corresponds to a percentage of 11.55% (Table 1).

The mean of clinical attachment loss in the active sites was higher in the PD+DM group compared to the PD group ($p < 0.05$) (Figure 1).

The results of gene expression were showed as number of times (fold) from comparisons between the groups of this study, with increased expression (up-regulated) or decreased (down-regulated). We considered only those genes that showed expression with a significance level of $p < 0.05$ and that were present in at least 70% of the total number of patients in each group.

The results of gene expression analysis are presented in Figure 2 related to comparison between active sites of the groups. When compared the active sites of PD+DM group to active sites of PD group, there were eight genes (CEBPB, IL37, CCR3, CCL26, CCL25, CCL24, CCL3 and CXCR1) differentially expressed ($p <$

0.05). Of these, all genes were up-regulated. Therefore, the PD+DM group presented a profile predominantly up-regulated in relation to the PD group based on the activity of periodontal disease.

Discussion

The present study evaluated the gene expression of active sites of periodontal patients with or without diabetes, after non-surgical periodontal therapy. Reddy *et al.* (2000) cited the need for an investigation that evaluates the periodontal disease progression after periodontal therapy. To our knowledge, there were no studies that have attempted to analyze the gene expression profile related to the inflammation pathway in active periodontal lesions following non-surgical periodontal therapy. Beikler *et al.* (2008) analyzed the gene expression profile from periodontal sites of patients with residual pockets following non-surgical therapy, but not from periodontal sites with progressive clinical attachment loss. Moreover, the understanding of the genetics and progression of periodontal disease may provide valuable information for identification of disease markers as a diagnostic tool (Taba *et al.*, 2005).

Although diabetes affects the evolution of periodontal disease and our patients were poorly controlled (mean HbA1c of 10.39%), PD and PD+DM groups presented similar clinical parameters at baseline and two months after non-surgical periodontal therapy. In the two-month evaluation, this result can be related to the systemic use of doxycycline associated with the periodontal therapy in PD+DM group. Our studies (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008) support the systemic antibiotic use in patients with poorly controlled diabetes. According to Grossi *et al.* (1997) and Iwamoto *et al.* (2001), the treatment of periodontal disease in diabetic patients by incorporating systemic doxycycline or local minocycline resulted in a significant reduction in periodontal infection and inflammation, and a short term reduction in the levels of glycated hemoglobin (HbA1c). In agreement, the results of the present study also showed a significant reduction in the HbA1c levels after periodontal therapy in PD+DM group.

However, the clinical attachment loss was higher in active sites of the PD+DM group. This finding was followed by an up-regulated profile in active sites of the same group when compared to PD group in gene expression analysis. Eight genes were differentially expressed: CEBPB, IL37, CCR3, CCL26, CCL25, CCL24, CCL3 and

CXCR1. These genes are related to inflammatory and immune responses. The up-regulated profile in diabetic patients is in accordance with the hyper-inflammatory state from diabetes (Lalla *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2007), particularly in the diabetic patients (PD+DM group) of the present study who were poorly controlled even after periodontal therapy (HbA1c levels around 9 to 10%).

An active periodontal lesion has been characterized by a prominent infiltration of activated T cells (Okada *et al.*, 1983; Malberg *et al.*, 1992), which express some cytokines known in the periodontal disease (Takahashi *et al.*, 2005, Vernal *et al.*, 2005, 2006). IL37 (interleukin 1 family, member 7) gene was up-regulated in the active sites of the PD+DM group. It is a cytokine suppressor of innate inflammatory and immune responses (Nold *et al.*, 2010). Therefore, the expression of this gene seems to try to balance the inflammatory process generated by both diabetes and periodontitis. Moschen *et al.* (2011) showed an increase in adipose tissue expression of IL37, which relates this cytokine with diabetes. However, its role in periodontal disease needs to be further investigated because of the scarcity of literature on this subject.

CEBPB (CCAAT enhancing binding protein-beta) is an important transcriptional factor for the induction of a wide array of other genes, including those encoding proteins with a role in innate immunity, cell proliferation, adipogenesis, inflammatory response and the acute-phase response, such as IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α and C-reactive protein (CRP) (Agrawal *et al.*, 2001; Kleemann *et al.*, 2003). According to (Sato *et al.*, 2006), the expression of the chemokine CCL2 was stimulated by enhanced expression of CEBPB gene in the aorta of the insulin resistant rat. Moreover, it has important function in the adipocyte differentiation, which also links this gene with type 2 diabetes (Motyl *et al.*, 2011).

Longitudinal studies on the progression of periodontitis indicate that the rate of periodontal tissue destruction is low, and it occurs in few subjects and few tooth sites (Lindhe *et al.*, 1989; Hugoson; Laurell, 2000). Episodic periodontal attachment loss may be associated with variations in the supracrestal inflammatory cell population where significantly higher numbers of mast cells, monocytes/macrophages and plasma cells are present in active sites (Zappa *et al.*, 1991). These cells are attracted to areas of infection by proteins with chemoattractant properties called chemokines. Moreover, it has been reported that chemokines mediate and stimulate the release of inflammatory products (Queiroz *et al.*, 2008). Additionally, chemokines play an

important role in the development of obesity-related disorders, such as type 2 diabetes (O'Connell *et al.*, 2008). In the present study, some chemokines (CCL26, CCL25, CCL24 and CCL3) and some chemokine receptors (CCR3 and CXCR1) were up-regulated in the active sites of PD+DM groups.

Specifically, CCL3 induces the synthesis and release of other pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF) (Masihi; Schäfer, 2011). Both CCL24 (eotaxin-2) and CCL26 (eotaxin-3) are chemotactic for eosinophils and basophils and binds to CCR3 (Queiroz *et al.*, 2008). Eotaxin has been shown certain degree of chemotactic activity towards Th2 cells, which may explain the relationship between eotaxin and inflammatory process (Mir *et al.*, 2002). However, the relationship between periodontal disease and eotaxin is not well established. The protein encoded by CCL25 gene displays chemotactic activity for dendritic cells, thymocytes and activated macrophages. CCL25 is particularly relevant because of its restricted tissue expression that is limited to the thymus, the intestinal epithelium and the oral mucosa (Ekhlassi *et al.*, 2008). According to Ekhlassi *et al.* (2008), the exposure of gingival cells to *P. gingivalis* lipopolysaccharide induces the synthesis of CCL25. However, its connection with type 2 diabetes is not yet established. And CXCR1 (IL8RA) is a specific receptor for the interleukin 8 (IL-8), which is chemoattractant for neutrophils and has an important role in the inflammatory response. There are still no reports in the literature about CXCR1 and diabetes, but the variation in the CXCR1 gene (IL8RA) does not seem to be associated with susceptibility to chronic periodontitis (Scarel-Caminaga *et al.*, 2011).

In general, our data demonstrates that the genes that are differentially expressed in PD+DM group might correlate with inflammatory and immune processes from diabetes and periodontitis, and could partially explain the mechanisms associated with the progressive destruction of the supporting tissues of the tooth. However, it should be pointed out that the results of this study are based on a relatively low number of specimens, and the results should be interpreted cautiously. Further studies are needed to fully assess the gene expression related to the inflammatory pathway and their interaction in periodontal tissues following therapy. It is important to consider that gene expression may not predict protein levels. Therefore, further analyses in gingival biopsies, gingival crevicular fluid and saliva, including characterization of cells phenotypes, immunohistochemistry and

ELISA, should be performed in association with gene expression analyses. The direct correlation between mRNA and protein levels could better elucidate the role of such markers in periodontitis related to diabetes.

It may be concluded that an up-regulated inflammatory response is associated to the more severe and progressive periodontal sites of diabetic patients. Therefore, the findings suggest that an up-regulation of those genes may be involved in the modulation of periodontal destruction by type 2 diabetes, partially explaining the greater clinical attachment loss and the decreased repair capacity frequently observed in poorly controlled diabetic patients.

Acknowledgements

We applied the first-last-author-emphasis approach for the sequence of authors.

Authors thank Maria Cristina Foss Freitas from Division of Endocrinology and Metabolism of Ribeirão Preto School of Medicine USP for the kind assistance with diabetic patients' management and Fabíola Singaretti de Oliveira, Glaucete Trevisan and Natalia Torres from the Molecular Biology Laboratory of the University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Department of Oral Surgery and Periodontology.

The study had the financial support of the Foundation for Research Support of São Paulo grant 2007/08424-3 and 2008/11033-9.

References

- Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I. Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2378-84.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement). *Diabetes Care* 2009;32:S62-7.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- Beikler T, Peters U, Prior K, Eisenacher M, Flemming TF. Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Medical Genomics*. 2008 Jul 7;1:30.

Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R: Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Sep;28(9):840-7.

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

Duarte PM, Szeremeske de Miranda T, Lima JA, Dias Gonçalves TE, Santos VR, Bastos MF, et al. Expression of Immune-Inflammatory Markers in Sites of Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetic Subjects. *J Periodontol*. 2011 Aug 22. [Epub ahead of print].

Ekhlassi S, Scruggs LY, Garza T, Montufar-Solis D, Moretti AJ, Klein JR. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor- α and interleukin-6 secretion, and CCL25 gene expression, in mouse primary gingival cell lines: interleukin-6-driven activation of CCL2. *J Periodontal Res*. 2008 Aug;43(4):431-9.

Gamonal J, Bascones A, Jorge O, Silva A. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluido f adults patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):675-81.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W Jr, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res*. 2006 Dec;41(6):580-4.

Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Nov;9(6):472-81.

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

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

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*. 1983 May;10(3):298-310.

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(11):1863-70.

Hernandez M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Oct;90(10):1164-70.

Hugosan L, Laurell L. A prospective longitudinal study on periodontal bone height changes in a Swedish populations. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):665-74.

Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shitaka K, Makino H, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):774-8.

Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):545-51.

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

Lindhe J, Okamoto H, Yoneyama T, Haffajee A, Socransky S. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. *J Clin Periodontol*. 1989 Nov;16(10), 662-70.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8.

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

Malberg K, Molle A, Streuer D, Gangler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Clin Periodontol*. 1992 Mar;19(3):155-8.

Masihi KN, Schäfer H. Overview of biologic response modifiers in infectious disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2011 Dec;25(4):723-31.

Mir A, Minguez M, Tatay J, Pascual I, Pena A, Sanchiz V et al. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastro* 2002;97:1452-1457.

Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med*. 2011;17(7-8):840-5.

Motyl KJ, Raetz M, Tekalur SA, Schwartz RC, McCabe LR. CCAAT/enhancer binding protein β -deficiency enhances type 1 diabetic bone phenotype by increasing adiposity and bone resorption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 May;300(5):R1250-60.

Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1014-22.

O'Connell PA, Taba M Jr, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):774-83.

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

Okada H, Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect Immun*. 1983 Jul;41(1):365-74.

Queiroz AC, Taba M Jr, O'Connell PA, Nóbrega PB, Costa PP, Kawata VKS, et al. Inflammation markers in healthy and periodontitis patients. A preliminary data screening. *Braz Dent J*. 2008;19(1):3-8.

Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Longterm impact on microbial load. *J Periodontol*. 1999 Jun;70(6):646-56.

Reddy MS, Geurs NC, Jeffcoat RL, Proskin H, Jeffcoat MK. Periodontal disease progression. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1583-90.

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

Sato Y, Nishio Y, Sekine O, Kodama K, Nagai Y, Nakamura T, et al. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats.

Scarel-Caminaga RM, Curtis KM, Renzi R, Sogumo PM, Anovazzi G, Viana AC, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA. Variation in the CXCR1 gene (IL8RA) is not associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Negat Results Biomed*. 2011 Nov 3;10:14.

Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008 Mar;35(3):206-14.

Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease: *Periodontol 2000*. 2006;40:130-143.

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

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):369-74.

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 Apr;32(4), 383-9.

Vernal R, Dutzan N, Hernandez M, Chandia S, Puente J, Leon R, et al. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD41 T lymphocytes. *J Periodontol*. 2006 Oct;77(10):1772-80.

Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, et al: Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J Periodontal Res*. 2004 Jun, 39(3):158-67.

Zappa V, Reinking-Zappa M, Garf H, Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J Clin Periodontol*. 1991 Aug;18(7):508-15.

Tables

Table 1. Demographic, clinical and metabolic data from PD and PD+DM groups.

Parameters	PD	PD+DM	* <i>p</i> value
Age (years)	50.3 ± 5.7	52.0 ± 3.9	NS
Female	7 (77.8%)	6 (54.5%)	—
Male	2 (22.2%)	5 (45.5%)	—
Caucasian	7 (77.8%)	9 (81.8%)	—
Non-caucasian	2 (22.2%)	2 (18.2%)	—
n. teeth	24.4 ± 6.5	22.6 ± 5.4	NS
PPD (mm)			
Baseline	2.59 ± 0.53	2.49 ± 0.65	NS
2 months	2.18 ± 0.49	2.19 ± 0.34	NS
** <i>p</i> value	0.004	0.001	
rCAL (mm)			
Baseline	10.04 ± 1.41	10.50 ± 1.58	NS
2 months	9.62 ± 1.34	10.18 ± 1.51	NS
** <i>p</i> value	NS	NS	
PI (%)			
Baseline	56.92 ± 17.81	57.91 ± 16.75	NS
2 months	34.79 ± 17.01	29.58 ± 14.34	NS
** <i>p</i> value	0.008	0.001	
BOP (%)			
Baseline	43.86 ± 28.22	35.63 ± 12.55	NS
2 months	27.61 ± 24.51	13.85 ± 7.49	NS
** <i>p</i> value	0.004	0.001	
HbA1c (%)			
Baseline	—	10.39 ± 2.55	NS
2 months	—	9.19 ± 2.26	—
** <i>p</i> value		0.018	

Mean ± standard deviation

NS - non significant ($p > 0.05$).

* Wilcoxon test for intragroup comparisons.

** Mann-Whitney test for comparisons between two groups at baseline and at 2-month evaluation.

Figure legends

Figure 1. Clinical attachment loss in the active sites of PD and PD+DM groups.

*Unpaired t test, $p < 0.05$.

Figure 2. Gene expression profile of active sites of PD+DM group compared to active sites of PD group.

The bars located on the positive axis indicate up-regulated genes.

Others = other genes involved in inflammatory response.

Figures

Figure 1

Figure 2

7. Artigo III

No artigo III, foram considerados os seguintes procedimentos do material e métodos:

- exame clínico periodontal;
- controle metabólico;
- coleta de saliva;
- terapia periodontal básica;
- análise das proteínas salivares;
- análise estatística.

A população do artigo em questão foi composta por 56 indivíduos, sendo 15 periodontal e sistemicamente saudáveis (grupo controle), 21 portadores de periodontite crônica (grupo DP) e, 20 com periodontite crônica e Diabetes mellitus tipo 2 (grupo DP+DM).

7.1 Resultados

7.1.1 Parâmetros clínicos periodontais

Cinquenta e seis pacientes foram incluídos neste estudo, sendo que os dados demográficos de sua população estão presentes na Tabela 16. Houve uma maior prevalência de mulheres e de brancos no grupos controle e DP, enquanto que, no grupo DP+DM, a distribuição foi mais homogênea. As médias de idade dos grupos DP e DP+DM foram semelhantes; entretanto, a média do grupo controle foi menor.

Tabela 16. Dados demográficos dos grupos.

	sexo - n (%)		raça - n (%)		idade (anos)
	masculino	feminino	branco	não branco	média
Controle	3 (20%)	12 (80%)	14 (93,3%)	1 (6,7%)	32,5 ± 1,2
DP	7 (33,3%)	14 (66,7%)	19 (90,5%)	2 (9,5%)	51,6 ± 2,6
DP+DM	9 (60%)	6 (40%)	9 (60%)	6 (40%)	51,8 ± 1,4

Do início do estudo até o acompanhamento de dois meses, nenhum paciente diabético relatou ajustes na dieta e em medicações previamente prescritas pelo médico que realiza o acompanhamento do diabetes. Não houve relato de efeitos adversos com a doxíciclina e todos os pacientes diabéticos relataram ter utilizado a medicação da forma prescrita.

Os dados iniciais dos parâmetros clínicos periodontais demonstraram uma similaridade entre os grupos com periodontite crônica, ou seja, grupos DP e DP+DM. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos dados iniciais somente quando comparados os grupos doentes (DP e DP+DM) ao grupo controle como mostra a Tabela 17.

Após a terapia periodontal estipulada pelo protocolo da pesquisa, houve uma redução significativa dos parâmetros clínicos avaliados ($p < 0,05$). Somente no nível clínico de inserção relativo do grupo DP, não houve diferença estatisticamente significativa. As profundidades de sondagem foram divididas em três categorias: profundidade de sondagem ≤ 3 mm, 4 a 6 mm e ≥ 7 mm, não havendo diferença entre os grupos (Tabela 17).

Os níveis de hemoglobina glicada para avaliação do parâmetro metabólico, no grupo DP+DM, mostraram diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tempos inicial e dois meses, com uma redução de 1,18 na média, o que corresponde a uma porcentagem de 11,52% (Tabela 17).

Tabela 17. Parâmetros clínicos periodontais dos grupos e níveis de HbA1c do grupo DP+DM.

Parâmetros clínicos	Controle (n = 15)	DP (n = 21)	DP+DM (n = 20)	*Valor de <i>p</i>
PS (mm)				
Inicial	1,86 ± 0,21a,b	2,44 ± 0,43a	2,52 ± 0,51b	< 0,001
2 meses	—	2,08 ± 0,37	2,12 ± 0,32	NS
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	< 0,001	
NCIR (mm)				
Inicial	8,00 ± 0,24a,b	9,89 ± 1,28a	10,73 ± 1,55b	< 0,001
2 meses	—	9,65 ± 1,26	10,28 ± 1,38	NS
**Valor de <i>p</i>		NS	0,002	
IP (%)				
Inicial	18,22 ± 13,14a,b	53,94 ± 14,73a	58,79 ± 19,25b	< 0,001
2 meses	—	30,59 ± 17,21	29,60 ± 12,33	NS
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	< 0,001	
SS (%)				
Inicial	15,86 ± 7,82a,b	39,31 ± 20,94a	38,51 ± 14,55b	< 0,001
2 meses	—	23,05 ± 17,69	12,96 ± 7,01	NS
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	< 0,001	
PS ≤ 3 mm (n. sítios)				
Inicial	—	124,62 ± 31,11	108,95 ± 33,05	NS
2 meses	—	135,81 ± 30,02	119,70 ± 30,56	NS
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	< 0,001	
PS 4-6 mm (n. sítios)				
Inicial	—	20,19 ± 17,00	21,80 ± 14,37	NS
2 meses	—	11,33 ± 12,72	11,85 ± 9,55	NS
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	< 0,001	
PS ≥ 7 mm (n. sítios)				
Inicial	—	3,76 ± 4,18	1,85 ± 3,03	NS
2 meses	—	1,43 ± 1,89	0,15 ± 0,49	0,005
**Valor de <i>p</i>		< 0,001	0,001	
n. dentes				
Inicial	26, 27 ± 2,52a	24,76 ± 4,70	21,95 ± 4,98a	0,02
2 meses	—	23,84 ± 4,97	20,02 ± 4,22	NS
**Valor de <i>p</i>	—	NS	NS	
HbA1c (%)				
Inicial	—	—	10,24 ± 2,56	—
2 meses	—	—	9,06 ± 2,40	—
**Valor de <i>p</i>			< 0,001	

NS – não significativa (*p* < 0,05).

* Teste de Wilcoxon para comparações intragrupos (horizontal).

** Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações entre os grupos controle, DP e DP+DM no tempo inicial. E teste de Mann-Whitney para comparações entre os grupos DP e DP+DM no tempo de 2 meses (vertical).

Letras diferentes indicam que os grupos são estatisticamente diferentes.

7.1.2 Análise de proteínas salivares

Das proteínas salivares quantificadas, oito foram mais representativas do padrão de saúde e doença e estavam acima do limite de detecção (IL1b, IL17, IL1ra, IL8, IL10, TGFa, Eotaxin e MCP-3). A quantificação dessas proteínas está representada nas Figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30. As médias dos níveis de proteínas estão apresentados em picograma por mililitro (pg/ml) de saliva. Não houve diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das comparações intra e intergrupos. Contudo, numericamente, observou-se um padrão de diminuição dos níveis salivares, após terapia periodontal não-cirúrgica, no grupo DP próximo ao controle. Já no grupo DP+DM, houve uma diminuição nos níveis salivares das proteínas inflamatórias após a terapia periodontal, porém bem menor. Somente os níveis salivares de TGFa, no grupo DP+DM, mostraram um aumento após a terapia periodontal.

Figura 24. Níveis salivares de interleucina-1 beta (IL1b) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).
Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.
Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 25. Níveis salivares do receptor antagonista de interleucina-1 (IL1ra) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).

Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.

Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 26. Níveis salivares de interleucina-17 (IL17) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).

Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.

Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 27. Níveis salivares de interleucina-10 (IL10) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).
Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.
Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 28. Níveis salivares de interleucina-8 (IL8) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).
Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.
Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 29. Níveis salivares de fator de crescimento tumoral alfa (TGF α) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).
 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.
 Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

Figura 30. Níveis salivares de eotaxin e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-3) entre os grupos. Média $\pm$ erro padrão (pg/ml).
 Teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos, $p > 0,05$.
 Teste de Wilcoxon para comparação intragrupo, $p > 0,05$.

7.1.3 Correlações entre parâmetros clínicos e proteínas salivares

O coeficiente de correlação de Spearman revelou uma correlação fraca em alguns casos, mas estatisticamente significativa. Os parâmetros clínicos PS e NCIR foram correlacionados com os níveis de algumas proteínas salivares (Tabela 18). Positivas correlações foram encontradas entre profundidade de sondagem e níveis salivares de IL1b ($R = 0,414$; $p = 0,036$), IL17 ($R = 0,414$; $p = 0,036$), eotaxin ($R = 0,508$; $p = 0,008$) e MCP-3 ($R = 0,418$; $p = 0,034$). Adicionalmente, o nível de inserção clínico relativo foi correlacionado positivamente com os níveis salivares de eotaxin ($R = 0,411$; $p = 0,037$) e MCP-3 ($R = 0,420$; $p = 0,033$).

Tabela 18. Correlações entre os parâmetros clínicos e os níveis das proteínas salivares.

Proteínas salivares	PS		NCIR	
	R	valor de p	R	valor de p
IL1b	0,414	0,036	—	—
IL17	0,394	0,046	—	—
eotaxin	0,508	0,008	0,411	0,037
MCP-3	0,418	0,034	0,420	0,033

R representa o valor do coeficiente de correlação.

Para a correlação não paramétrica de Spearman, o valor de p é estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

7.2 Discussão e conclusão

Estudos anteriores mostraram que constituintes presentes na saliva podem fornecer informação complementar para o diagnóstico da periodontite (Malamud, 1992; Kaufman; Lamster, 2000; 2002; Giannobile *et al.*, 2009; Sexton *et al.*, 2011). Entretanto, poucos estudos monitoraram proteínas salivares em pacientes com periodontite e diabetes após a terapia periodontal (Dodds *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2008). Dessa forma, o presente estudo monitorou proteínas salivares de pacientes com periodontite crônica e diabetes tipo 2 (grupo DP+DM) e as comparou com as proteínas de pacientes apenas com periodontite (grupo DP) e pacientes

saudáveis (grupo controle), em dois tempos – inicial e após a terapia periodontal básica.

No presente estudo, ambos os pacientes dos grupos DP e DP+DM mostraram uma melhora nas condições clínicas, com redução de todos os parâmetros clínicos após a terapia periodontal básica. Os níveis de HbA1c também melhoraram nos pacientes diabéticos. As reduções observadas no parâmetro profundidade de sondagem e nos níveis de HbA1c estão em acordo com o estudo de O'Connell *et al.* (2008), que mostraram uma redução significativa nestes parâmetros após terapia periodontal com doxiciclina sistêmica. O uso de antibiótico combinado com a terapia periodontal básica em pacientes diabéticos pobremente controlados apresenta resultado superior como mostrado em estudos de nosso grupo (Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008) e em outro estudo da literatura recente (Grossi *et al.*, 1997; Sorsa *et al.*, 1992). Doxiciclina é um potente modulador da resposta do hospedeiro em indivíduos com diabetes, bem como um inibidor de metaloproteinase (Sorsa *et al.*, 1992). Este medicamento também inibe a glicação não enzimática de proteínas extracelulares, e pode ter um efeito semelhante na glicação da hemoglobina (Grossi *et al.*, 1997).

A resposta clínica e metabólica satisfatória à terapia periodontal básica foi acompanhada por uma redução de algumas proteínas inflamatórias na saliva de ambos os grupos doentes (grupos DP e DP+DM). Entretanto, não houve diferenças significantes nos níveis de nenhuma das dez proteínas avaliadas na saliva entre os grupos e entre os tempos de avaliação. Estes resultados estão em desacordo aos relatos de outros investigadores que mostraram diferenças significantes em proteínas salivares específicas tais como IL1b, IL6, MMP-8 e osteoprotegerina de pacientes com periodontite comparados aos pacientes com periodonto saudável e/ou pacientes com periodontite e diabetes (Miller *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Sexton *et al.*, 2011). Uma possível explicação para a discrepância entre estes resultados se deve ao fato do curto de avaliação, pois os primeiros três estudos eram transversais e o estudo de Sexton *et al.* (2011) acompanharam os pacientes por seis meses. Além disso, existe uma variabilidade alta na expressão de proteínas como relatado por Correa *et al.* (2010).

Embora este estudo não tenha mostrado diferenças significantes nos níveis das proteínas salivares (IL1b, IL17, IL1ra, IL8, IL10, TGFa, eotaxin e MCP-3), houve uma tendência para diferenciar os padrões de saúde e doença a partir destas

proteínas. Adicionalmente, houve correlação positiva entre a profundidade de sondagem e os níveis salivares de IL1b, IL17, eotaxin e MCP-3. O parâmetro NCIR também foi correlacionado positivamente com os níveis salivares de eotaxin e MCP-3. Estes dados sugerem que as proteínas salivares podem ser consideradas como biomarcadores potenciais da periodontite. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

As proteínas inflamatórias mediam os principais eventos da doença periodontal – inflamação, destruição tecidual e reabsorção óssea (Yucel-Lindberg *et al.*, 1999; Queiroz *et al.*, 2008). De acordo com Wozniak *et al.* (2002), citocinas e quimiocinas na saliva têm o potencial de predizer a susceptibilidade ou indicarem o estado da doença. As citocinas (IL1b, IL17, IL1ra, IL10, TGFa) e as quimiocinas IL8, MCP-3, eotaxin já foram detectadas na saliva humana (Sexton *et al.*, 2011; Ozçaka *et al.*, 2011; Dubost *et al.*, 1996; Teles *et al.*, 2010).

Neste estudo, foi possível verificar que o grupo DP+DM apresentava os níveis mais altos de proteínas inflamatórias, e o grupo DP tinha mais altos quando comparados ao grupo controle. E posterior à terapia periodontal, os níveis de proteínas salivares diminuíram nos pacientes com periodontite associada ou não ao diabetes (grupos DP e DP+DM). Estes achados são consistentes com a literatura atual. IL1b e IL17 são citocinas pró-inflamatórias que podem influenciar a resposta do hospedeiro na lesão periodontal (Ribeiro *et al.*, 2011). IL17 divide as funções biológicas com IL1b. IL17 está relacionada à destruição óssea via RANKL e na produção de outros marcadores inflamatórios, como IL6, IL8 e prostaglandinas (Sato *et al.*, 2006; Beklen *et al.*, 2007).

Pacientes com diabetes podem apresentar uma resposta exacerbada aos macrófagos, o que pode resultar em um aumento significativo na produção de proteínas inflamatórias (King, 2008). Isto explica a evidência de que indivíduos com periodontite e diabetes apresentam maiores quantidades de IL1b. Além disso, Ribeiro *et al.* (2011) mostraram que os níveis de IL17 foram maiores no fluido crevicular gengival de pacientes com diabetes, em comparação com pacientes saudáveis sistemicamente.

Quimiocinas, tais como IL8, eotaxin, MCP-3, têm um importante papel no desenvolvimento de desordens relacionadas à obesidade como o diabetes tipo 2 (O'Connell *et al.*, 2008). Eotaxin é também uma quimiocina com capacidade quimiotática preferencial para eosinófilos (Queiroz *et al.*, 2008). No presente estudo,

os níveis iniciais de eotaxin estavam aumentados nos pacientes periodontais (grupos DP e DP+DM). Este resultado está de acordo com os resultados observados por Queiroz *et al.* (2008). Entretanto, a relação entre doença periodontal e eotaxin não está bem estabelecida. Eotaxin tem mostrado certo grau de atividade quimiotática para células Th2, o que pode explicar a relação entre eotaxin e o processo inflamatório (Mir *et al.*, 2002). MCP-3 é outra quimiocina, mas com atividade quimiotática preferencial para monócitos. É expressa por células endoteliais e monócitos após indução por IL1b, TNFa, IFNy, lipolissacarídeos, fibroblastos e células mononucleares, interferindo na resposta do hospedeiro (Pype *et al.*, 1999).

Somente os níveis de TGFa, no grupo DP+DM, aumentaram após a terapia periodontal. Entretanto, não há relatos sobre a associação desta proteína com o diabetes. De acordo com Luetke; Lee (1991), TGFa está *upregulated* em alguns cânceres. É produzido em macrófagos e queratinócitos e induz o desenvolvimento epitelial. Está também relacionado ao fator de crescimento epidermal (Luetke; Lee, 1991).

Concluindo, as condições periodontite e diabetes levaram a maiores níveis médios de proteínas salivares. Os achados sugerem a utilização da saliva como instrumento de detecção de marcadores inflamatórios, servindo como base para futuras pesquisas de diagnóstico em saliva e kits para teste de diagnóstico.

7.3 Artigo em inglês

Salivary proteins in periodontitis associated or not with diabetes in response to non-surgical periodontal therapy

Running title: Salivary proteins detection in periodontitis

Priscila Paganini Costa¹, Viviane Casagrande Mariguela¹, Janine Montenegro Toscano Moura de Medeiros Vanderlei¹, Daniela Bazan Palioto¹, Márcio Fernando de Moraes Grisi¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹, Arthur Belém Novaes Júnior¹, Mario Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone number: 55 16 36024135. Fax number: 55 16 3602 4788

Corresponding author

Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: Saliva, Periodontitis, Type 2 Diabetes Mellitus, Biomarkers.

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no potential conflict of interest. This study was financially supported by FAPESP.

Abstract

Background: An important event in the association of diabetes-periodontitis is the disturbance in local and systemic production of inflammatory cytokines. Saliva may be used in the diagnosis of oral and systemic diseases. The aim of this study was to monitor the salivary inflammatory proteins levels of patients with chronic periodontitis associated or not with type 2 Diabetes mellitus (DM) after non-surgical periodontal therapy, and to identify candidate genes that may serve as targets for diagnosis.

Material and Methods: Fifty-six subjects were enrolled for this study, 21 with chronic periodontitis (PD group), 20 with chronic periodontitis and diabetes (PD+DM group) and 15 subjects that were periodontally and systemically healthy (control group). The patients underwent clinical examination and collection of saliva before and after non-surgical periodontal therapy. In PD+DM group, the glycated hemoglobin (HbA1c) levels were monitored. Samples of whole saliva were collected for assessment of thirty-seven salivary inflammatory proteins using the Multiplex Cytokine Profiling Assay.

Results: After periodontal therapy, there was a significant reduction in all evaluated clinical parameters and HbA1c levels ($p < 0.05$), accompanied by reduction of eight salivary proteins levels, but no significant differences were found between groups ($p > 0.05$). PPD and rCAL parameters were positively correlated with some inflammatory proteins levels ($p < 0.05$).

Conclusions: Periodontitis and diabetes conditions led to higher average levels of salivary proteins. The findings suggest the use of saliva as a tool for detection of inflammatory markers, serving as a basis for future research in saliva and diagnostic test kits.

Introduction

Periodontitis is characterized by a destruction of periodontal tissues initiated by oral pathogens that induce an inflammatory cascade (Scannapieco, 1998). Diabetes may modulate periodontal tissue destruction mainly by formation of advanced glycation end products (AGEs). AGEs may stimulate monocytes/macrophages recruitment to the periodontal site, and the interaction with the receptors for AGEs (RAGEs) may increase the production of proinflammatory cytokines (Duarte *et al.*, 2007). Therefore, patients with diabetes can present hyperresponsiveness to these cells that might result in a significantly increased production of inflammatory cytokines (O'Connell *et al.*, 2008). This explains the evidence that subjects with Diabetes mellitus present higher amounts of inflammatory proteins in saliva than non-diabetics (Costa *et al.*, 2010).

In affected tissues, there is biochemical signaling involving three biological phases (inflammation, connective tissue degradation, and alveolar bone turnover) (Sexton *et al.*, 2011). Circulating molecules in these biological phases have been detected at elevated levels in whole saliva of patients who have periodontitis, thus making them putative biomarkers of the disease (Taba *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2006; Scannapieco *et al.*, 2007). Specifically, interleukin (IL)-1b, C reactive protein, human macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, matrix metalloproteinase (MMP)-8 and -9, osteoprotegerin (OPG), tumour necrosis factor (TNF)-a, and receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL) (Ingman *et al.*, 1994; Pederson *et al.*, 1995; Christodoulides *et al.*, 2005; 2007; Gorska and Nedzi-Gora, 2006; Miller *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007; Scannapieco *et al.*, 2007; Frodge *et al.*, 2008; Sexton *et al.*, 2011) show promise for aiding in the recognition of some aspects of periodontitis. In addition, data are accumulating in patients with type 2 diabetes (Costa *et al.*, 2010) as to the utility of these biomarkers for monitoring periodontal disease (Sexton *et al.*, 2011). Furthermore, O'Connell *et al.* (2008) and Correa *et al.* (2010) showed a tendency towards a decrease of the measured circulating biomarkers after periodontal therapy.

Saliva is a valuable source for clinically relevant information because it contains biomarkers specific for the unique physiological aspects of periodontal disease, and qualitative changes in the composition of these biomarkers could have diagnostic value by identifying patients with enhanced disease susceptibility,

identifying sites with active disease, predicting sites that will have active disease in the future and/ or serving as surrogate end points for monitoring the effectiveness of therapy (Giannobile *et al.*, 2009). However, few studies have monitored salivary proteins in periodontal patients with or without diabetes after periodontal therapy (Dodds *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2008).

Taking into account the accumulated evidence and the necessity of further investigations of the salivary proteins into the relationship between diabetes and periodontitis, the aim of this study was to monitor the levels of salivary inflammatory proteins after two months of non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis and type 2 Diabetes mellitus.

Material and Methods

Study population

This study was performed at the University of São Paulo between March 2009 and June 2011 as a joint collaboration of the Department of Oral Surgery and Periodontology and the Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism. It was reviewed and approved by the Institutional Human Research Committee of the University of São Paulo (n. 2007.1.104.58.0). All subjects were informed about the nature of the proposed study and informed consent forms were signed.

Subjects underwent anamnesis, clinical and radiographic examination. According to their periodontal condition and general health status, they were invited to participate in the study if they fulfilled the entry criteria.

Inclusion criteria were: (i) presence of at least 14 teeth and, 10 of which should be posterior teeth; (ii) subjects with periodontitis should present at least five teeth with a probing pocket depth (PPD) of ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm (Hernandez *et al.*, 2006); (iii) to be 35 to 65 years. Exclusion criteria were: (i) use of antibiotics or periodontal therapy in the previous six months; (ii) smoking within the past 5 years; (iii) pregnancy or lactancy; (iv) concomitant medical therapy, except for a diabetic condition; (v) other inflammatory conditions; (vi) major diabetic complications (retinopathy, nephropathy, neuropathy, and atherosclerosis). Patients with diabetes had type 2 DM diagnosed for at least 5 years and current metabolic control above the normal range (glycated hemoglobin, HbA1c $> 7\%$) (American

Diabetes Association, 2009). The patients were under the supervision of an endocrinologist advised to communicate any change in medicine intake or diet. All patients with diabetes were receiving oral hypoglycemic agents, insulin therapy, or a combination of insulin and oral hypoglycemic agents.

Fifty-six subjects were divided in three groups: 1) control group (n = 15) – periodontal and systemically healthy subjects; 2) PD group (n = 21) – subjects who were systemically healthy and clinically diagnosed with untreated chronic periodontitis (Armitage, 1999); 3) PD + DM group (n = 20) – subjects with type 2 diabetes and clinically diagnosed with untreated chronic periodontitis (Armitage, 1999).

Clinical parameters

Clinical examination was performed by a single experienced and calibrated operator before and two months after non-surgical periodontal therapy. Intra-examiner calibration was performed in three patients with a 20-minute interval between the exams in the same patient. Intra-class correlation coefficient of > 0.90 was obtained in probing pocket depth. The probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (rCAL) and bleeding on probing (BOP) were recorded at six sites per tooth with the aid of a computerized periodontal probe (Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA). The presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index - PI) were also recorded (O’Leary *et al.*, 1972). Radiographs were performed as a complementary test to the diagnosis.

Saliva Sample Collection

Non-stimulated whole expectorated saliva was collected (~ 3 ml) from each subject into sterile tubes according to the method described by Navazesh (1993) before and after non-surgical periodontal therapy. Subjects were refrained from eating, drinking, and oral hygiene for 2 hours prior to saliva collection. Saliva samples were placed on ice immediately and aliquoted prior to freezing at -80° C. Samples were thawed and analyzed within 6 months of collection.

Glycated hemoglobin (HbA1c) measurement

For the metabolic control assessment, the HbA1c levels were analyzed in patients before and two months after non-surgical periodontal therapy. The data were

measured by ion exchange chromatography HPLC (high-performance liquid chromatography) and is expressed in percentage.

Non-surgical periodontal therapy

The scaling and root planning sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24 to 36 hours (Quirynen *et al.*, 1999) using hand instruments (Gracey curets, Hu-Friedy Instruments, Chicago, IL, USA) and an ultrasonic device (Cavitron, Dentsply, York, PA, USA) while the subjects were under local anesthesia. In diabetic patients, the adjunctive antibiotic therapy, doxycycline (Vibramicina, Pfizer, São Paulo, SP, Brazil) 100 mg/ day, for 2 weeks after an initial dose of 200 mg, started on the day before the non-surgical periodontal therapy (O'Connell *et al.*, 2008).

Teeth presenting periapic radiolucencies and severe periodontal destruction were extracted. The patients returned a week later for new oral hygiene instruction, and to begin biofilm control process through monthly prophylaxis.

Salivary proteins analysis

The salivary inflammatory proteins levels were identified simultaneously using Multiplex Cytokine Profiling Assay, in the Luminex platform (Luminex™ xMAP, Luminex Corporation, Austin, TX, USA), which allows the simultaneous detection of multiple analytes in small sample size (~ 50 µl). The following proteins were analyzed: eotaxin, eotaxin-2 and -3; interferon alpha 2 (IFN α 2) and gamma (INF γ); IL1b, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15 and 17; IL1 receptor antagonist (IL-1ra); soluble IL2 receptor alpha (sIL2Ra); interferon-inducible protein (IP-10); MIP1a, 1b, 3a (CCL20), 3b (CCL19); monocyte chemoattractant protein (MCP)- 1, 2 and 3; soluble CD 40 ligand (sCD40L); transforming growth factor alpha (TGFa); TNFa and TNFb; epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78); B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1/ CXCL13); chemokine C-C motif ligand 1 (CCL1/I-309); thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17); 6Ckine (CCL21); monokine induced by interferon gamma (MIG/CXCL9); IFN-inducible T-cell-chemoattractant (ITAC/CXCL11). The assay was used according to the manufacturer's protocol.

Briefly, standard mediators were solubilized in assay diluent. Ten microliters of the diluted sample (standards or test) were added to a 50 µl cocktail of capture beads and detector antibodies, and the mixture was incubated for 4 hours at room

temperature in the dark. Excess unbound detector antibody was washed off before data acquisition. Two-color flow cytometric analyses were performed using a flow cytometer (FACSCanto, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). A total of 2,000 events were acquired following the supplied protocol. Analysis was performed using the appropriate CMA analysis software (FCap Array, Becton Dickinson, CA, USA).

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard error and the experimental unit was the subject. Because data were not normally distributed, nonparametric tests were applied. The changes in the clinical and diabetic parameters and in the salivary levels of inflammatory proteins between baseline and 2-month evaluation were tested using Wilcoxon rank-sum test. The comparison between the groups was performed by Kruskal-Wallis test. Correlations between all parameters were measured by the non-parametric Spearman's correlation. Statistical significance was considered at level of 5% ($p < 0.05$). SPSS Statistics 17.0 software package (SPSS Statistics 17.0, IBM Corporation, New York, NY, USA) was used for statistical analysis.

Results

Clinical parameters

Fifty-six patients were included in this study, 21 patients with chronic periodontitis, 20 patients with chronic periodontitis and diabetes and 15 patients were periodontal and systemically healthy. Five patients were eliminated because they did not finish the treatment, and two patients, because they had cancer. Healing was uneventful on all cases. No adverse effects were reported by any of the subjects.

Demographics data are displayed in Table 1. There was a higher prevalence in women and Caucasians in the PD and control groups, while in PD+DM group, the distribution was more homogeneous. The average age of the PD and PD+DM groups were similar; however, the average was lower in the control group. At baseline, both diseased groups (PD and PD+DM groups) had similar mean values for age and clinical parameters (Table 1).

After periodontal therapy, there was a significant reduction in the clinical parameters that were evaluated ($p < 0.05$). Only in the relative clinical attachment level parameter of the PD group, there was no statistically significant difference. The

probing pocket depth was divided into three categories: PPD $\leq$ 3 mm, 4-6 mm and $\geq$ 7 mm, with no difference between the groups (Table 1).

The glycated hemoglobin levels in PD+DM group showed statistically significant differences ($p < 0.05$) between baseline and two-month evaluation, with an average reduction of 1.18 that corresponds to a percentage of 11.52 (Table 1).

Salivary proteins

From thirty-seven salivary proteins quantified, the eight most representative of the standard of health and disease and which were above the detection limit for the assay were selected (IL1b, IL17, IL1ra, IL8, IL10, TGFa, eotaxin and MCP-3). The quantification of these proteins is shown in Figures 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. The mean levels of cytokines are presented in picogram per milliliter (pg/ml) of saliva. There were no statistically significant differences in any of the intra-and intergroup comparisons. However, numerically, there was a pattern of decreased salivary levels after non-surgical periodontal therapy in the DP group next to the control. In the PD+DM group, there was a decrease in salivary levels of inflammatory proteins after therapy, but much smaller. Only the salivary levels of TGFa in the PD+DM group showed an increase after therapy.

Correlations

The Spearman correlation coefficient revealed a weak correlation in some cases, but statistically significant. The clinical parameters (PPD and rCAL) were correlated with the salivary levels of some proteins (Table 2). Positive correlations were found between PPD and salivary levels of IL1b ($R = 0.414$; $p = 0.036$), IL17 ($R = 0.414$; $p = 0.036$), eotaxin ($R = 0.508$; $p = 0.008$) and MCP-3 ($R = 0.418$; $p = 0.034$). Furthermore, rCAL was positively correlated with salivary levels of eotaxin ($R = 0.411$; $p = 0.037$) and MCP-3 ($R = 0.420$; $p = 0.033$).

Discussion

Previous studies have shown that constituents present in saliva can provide important complimentary diagnostic information for periodontitis (Malamud, 1992; Kaufman; Lamster, 2000; 2002; Giannobile *et al.*, 2009; Sexton *et al.*, 2011). However, few studies have monitored salivary proteins in periodontal patients with

diabetes after periodontal therapy (Dodds *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2008). Therefore, the present study monitored salivary proteins of patients with diabetes (PD+DM group) and compared them with salivary proteins of periodontal patients (PD group) and periodontal and systemically healthy patients (control group), in two evaluation times – baseline and after non-surgical periodontal therapy.

In the present study, both periodontal (PD group) and diabetic patients (PD+DM group) showed an improvement in clinical conditions, with reduction of all clinical parameters after non-surgical periodontal therapy. The HbA1c levels were also improved in the diabetic patients. The reductions in probing pocket depth and in HbA1c levels observed are in agreement with the O'Connell *et al.* (2008) study that showed a significant reduction in these parameters after periodontal therapy with systemic doxycycline. The use of systemic antibiotic combined with non-surgical periodontal therapy in poorly controlled diabetic patients is well established in the literature and present superior results (Grossi *et al.*, 1997; Sorsa *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2008). Doxycycline is a potent modulator of the host response in the subject with diabetes, as well as being a metalloproteinase inhibitor (Sorsa *et al.*, 1992). It also inhibits non-enzymatic glycation of extracellular proteins, and it may have a similar effect on the glycation of hemoglobin (Grossi *et al.*, 1997).

In the present study, the satisfactory clinical and metabolic response to non-surgical periodontal therapy was followed by a reduction of some inflammatory proteins in saliva of both diseased groups (PD and PD+DM groups). However, there were no significant differences in the levels of any of the ten proteins evaluated in saliva between the groups and between baseline and after two months. The present results are in contrast to reports by other investigators that have described significant differences in specific salivary proteins such as IL1b, IL6, MMP-8 and osteoprotegerin of patients with periodontitis compared with periodontally healthy patients and/or diabetic patients (Miller *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Sexton *et al.*, 2011). A possible explanation for the discrepancy between these results might reside in the short-term follow-up evaluation. Indeed, this investigation set out to monitor the salivary proteins levels in a short reevaluation period to verify the effect of therapy and also the repair. The first three studies were cross-sectional studies, whereas the Sexton *et al.* (2011) study followed the patients for six months.

In addition, there is high individual variability in proteins expression as was reported by Correa *et al.* (2010).

Although this study did not show significant differences in the levels of salivary proteins (IL1b, IL17, IL1ra, IL8, IL10, TGF α , eotaxin and MCP-3), there is a tendency to differentiate the standard of health and illness from these proteins. Additionally, there were positive correlations between probing pocket depth and salivary levels of IL1b, IL17, eotaxin and MCP-3. The parameter rCAL was positively correlated with salivary levels of eotaxin and MCP-3. These data suggest that salivary proteins may be considered as potential biomarkers of periodontitis. However, more studies should be performed to confirm this hypothesis.

The inflammatory proteins mediate the major events of the periodontal disease – inflammation, tissue destruction and bone resorption (Yucel-Lindberg *et al.*, 1999; Queiroz *et al.*, 2008). According to Wozniak *et al.* (2002), cytokines and chemokines in saliva have the potential to be predictive of susceptibility/ resistance to infection or an indicator of disease status. The cytokines (IL1b, IL17, IL1ra and IL10) and the chemokine IL-8 have been detected in human saliva (Sexton *et al.*, 2011; Ozçaka *et al.*, 2011; Dubost *et al.*, 1996; Teles *et al.*, 2010).

In this study, it was possible to check that the PD+DM group had the highest levels of inflammatory proteins, and the PD group had higher levels than the control group. In addition, following periodontal therapy, lower levels of salivary proteins were found in periodontal patients (group PD and PD+DM). These findings and the correlations observed are consistent with the current literature. IL1b and IL17 are proinflammatory cytokines that can influence the host response in the periodontal lesion (Ribeiro *et al.*, 2011). IL17 shares biologic functions with IL1b. IL17 is implicated in bone destruction via RANKL and in the production of other inflammatory markers, such as IL6, IL8, and prostaglandins (Sato *et al.*, 2006; Beklen *et al.*, 2007). IFN γ is also a proinflammatory cytokine that has been associated with the progression of periodontitis (Dutzan *et al.*, 2009). Thus, after periodontal therapy, decreased levels of the cited proteins are expected.

Patients with diabetes can present a hyperresponsiveness to macrophages, and it might result in a significant increased production of inflammatory proteins (King, 2008). This explains the evidence that subjects with periodontitis and diabetes present higher amounts of IL1b. Additionally, Ribeiro *et al.* (2011) showed that levels

of IL-17 were higher in the gingival crevicular fluid of patients with diabetes as a whole, compared to systemically healthy control patients.

Chemokines as IL8 play an important role in the development of obesity-related disorders, such as type 2 diabetes (O'Connell *et al.*, 2008). Eotaxin is also a chemokine with preferential chemotactic capacity for eosinophils (Queiroz *et al.*, 2008). In the present study, the pretreatment levels of eotaxin in periodontal patients (DP and DP+DM groups) were increased. This data is accordance with the results observed by Queiroz *et al.* (2008). However, the relationship between periodontal disease and eotaxin is not well established. Eotaxin has been shown certain degree of chemotactic activity towards Th2 cells, which may explain the relationship between eotaxin and inflammatory process (Mir *et al.*, 2002). MCP-3 is another chemokine with preferential chemotactic capacity for monocytes. It is expressed by endothelial cells and monocytes after induction by IL1b, TNFa and lipopolysaccharide and by fibroblasts and mononuclear cells, interfering with the host response (Pype *et al.*, 1999).

Only TGFa levels, in the PD+DM group, increased after periodontal therapy. However, there are no reports about the association of this protein with diabetes. According to Luetke; Lee (1991), TGFa is up-regulated in some human cancers. It is produced in macrophages and keratinocytes, and induces epithelial development. Besides, it is closely related to epidermal growth factor (Luetke; Lee, 1991).

In conclusion, periodontitis and diabetes conditions led to higher average levels of salivary proteins. The findings suggest the use of saliva as potential diagnostic tool, thus serving as a basis for future salivary research and diagnostic test kits.

Acknowledgements

We applied the first-last-author-emphasis approach for the sequence of authors.

Authors thank Maria Cristina Foss Freitas from Division of Endocrinology and Metabolism of Ribeirão Preto School of Medicine USP for the kind assistance with diabetic patients' management.

The study had the financial support of the Foundation for Research Support of São Paulo grant 2007/08424-3 and 2008/11033-9.

References

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement). *Diabetes Care* 2009;32:S62-7.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.
- Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):347-51.
- Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, *et al*. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip*. 2005 Mar;5(3):261-9.
- Christodoulides N, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Mohanty S, Dharshan P, *et al*. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad of Sci*. 2007 Mar;1098:411-28.
- Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SR. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2010 Jan;37(1):53-8.
- Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, *et al*. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol*. 2010 Mar;81(3):384-91.
- Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000 Oct;28(5):373-81.
- Duarte PM, Neto JBC, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2007 Nov;13(6):594-9.
- Dubost JJ, Perrier S, Afane M, Viallard JL, Roux-Lombard P, Baudet-Pommel M, *et al*. IL-1 receptor antagonist in saliva; characterization in normal saliva and reduced concentration in Sjögren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol*. 1996 Nov;106(2):237-42.
- Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, *et al*. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6.
- Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1913-9.
- Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2000. 2009;50:52-64.

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

Górska R, Nedzi-Góra M. The effects of the initial treatment phase and of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and MMP-8, MMP-9, and TIMP-1 levels in the saliva and peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Nov-Dec;54(6):419-26.

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

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, *et al*. Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(11):1863-70.

Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Kontinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1994 Jan;21(1):26-31.

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

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212.

King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1527-34.

Luetke NC, Lee DC. Transforming growth factor alpha: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin Cancer Biol*. 1990 Aug;1(4):265-75.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *BMJ*. 1992 Jul 25;305(6847):207-8.

Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc*. 2006 Mar;137(3):322-9.

Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc*. 2006 Mar;137(3):322-9.

Mir A, Minguez M, Tatay J, Pascual I, Pena A, Sanchiz V *et al*. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastro* 2002;97:1452-1457.

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

Ng PY, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando EF, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Mar;49(2):252-60.

O'Connell PA, Taba M Jr, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, *et al.* Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol.* 2008 May;79(5):774-83.

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

Ozaçaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011 Oct;46(5):592-8.

Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, Turner DW. Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 1995 Dec;40(12):1151-5.

Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, *et al.* Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Oct;21(4):528-36.

Queiroz AC, Taba M Jr, O'Connell PA, Nóbrega PB, Costa PP, Kawata VKS, *et al.* Inflammation markers in healthy and periodontitis patients. A preliminary data screening. *Braz Dent J.* 2008;19(1):3-8.

Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Longterm impact on microbial load. *J Periodontol.* 1999 Jun;70(6):646-56.

Ribeiro FV, Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2011 Aug;82(8):1187-96.

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

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadano Y, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2673-82.

Scannapieco FA. Position paper of the American Academy of Periodontology; periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol.* 1998 Jul;69(7):841-50.

Scannapieco FA, Ng P, Hovey K, Hausmann E, Hutson A, Wactawski-Wende J. Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:496-7.

Sexton WM, Lim Y, Kryscio RJ, Dawson III DR, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol.* 2011 May;38(5):434-41.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, *et al.* Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992 Feb;19(2):146-9.

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

Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodont Res.* 2009 Jun;44(3):411-7.

Yucel-Lindberg T, Nilsson S, Modeer T. Signal transduction pathways in-volved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1b and tumor necrosis factor a in human gingival fibroblast. *J Dental Res.* 1999 Jan;78(1):61-8.

Tables

Table 1. Demographic, clinical and metabolic data between groups.

Parameters	Control	PD	PD+DM	*p value
Age	32.5 ± 1.2a,b	51.6 ± 2.6a	51.8 ± 1.4b	< 0.001
Female	12 (80%)	14 (66.7%)	6 (40%)	—
Male	3 (20%)	7 (33.3%)	9 (60%)	—
Caucasian	14 (93.3%)	19 (90.5%)	9 (60%)	—
Non-caucasian	1 (6.7%)	2 (9.5%)	6 (40%)	—
PPD (mm)				
Baseline	1.86 ± 0.21a,b	2.44 ± 0.43a	2.52 ± 0.51b	< 0.001
2 months	—	2.08 ± 0.37	2.12 ± 0.32	NS
** p value		< 0.001	< 0.001	
rCAL (mm)				
Baseline	8.00 ± 0.24a,b	9.89 ± 1.28a	10.73 ± 1.55b	< 0.001
2 months	—	9.65 ± 1.26	10.28 ± 1.38	NS
** p value		NS	0.002	
PI (%)				
Baseline	18.22 ± 13.14a,b	53.94 ± 14.73a	58.79 ± 19.25b	< 0.001
2 months	—	30.59 ± 17.21	29.60 ± 12.33	NS
** p value		< 0.001	< 0.001	
BOP (%)				
Baseline	15.86 ± 7.82a,b	39.31 ± 20.94a	38.51 ± 14.55b	< 0.001
2 months	—	23.05 ± 17.69	12.96 ± 7.01	NS
** p value		< 0.001	< 0.001	
PPD ≤ 3 mm (n. sites)				
Baseline	—	124.62 ± 31.11	108.95 ± 33.05	NS
2 months	—	135.81 ± 30.02	119.70 ± 30.56	NS
** p value		< 0.001	< 0.001	
PPD 4-6 mm (n. sites)				
Baseline	—	20.19 ± 17.00	21.80 ± 14.37	NS
2 months	—	11.33 ± 12.72	11.85 ± 9.55	NS
** p value		< 0.001	< 0.001	
PPD ≥ 7 mm (n. sites)				
Baseline	—	3.76 ± 4.18	1.85 ± 3.03	NS
2 months	—	1.43 ± 1.89	0.15 ± 0.49	0.005
** p value		< 0.001	0.001	
n. teeth				
Baseline	26.27 ± 2.52a	24.76 ± 4.70	21.95 ± 4.98a	0.02

Parameters	Control	PD	PD+DM	* <i>p</i> value
2 months	—	23.84 ± 4.97	20.02 ± 4.22	NS
** <i>p</i> value	—	NS	NS	
HbA1c (%)				
Baseline	—	—	10.24 ± 2.56	—
2 months	—	—	9.06 ± 2.40	—
** <i>p</i> value			< 0.001	

NS - non significant ($p > 0.05$).

* Wilcoxon test for intragroup comparisons.

** Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison Test for comparisons between all groups at baseline. Mann-Whitney test for comparisons between the PD and PD+DM groups at 2-month evaluation.

Different letters indicate that groups are statistically different.

Table 2. Correlations between clinical parameters and salivary proteins levels.

Salivary protein	PPD		rCAL	
	R	<i>p</i> value	R	<i>p</i> value
IL1b	0.414	0.036	—	—
IL17	0.394	0.046	—	—
eotaxin	0.508	0.008	0.411	0.037
MCP-3	0.418	0.034	0.420	0.033

R represents the correlation coefficient value.

For the non-parametric Spearman's correlation, *p* value are statistically significant when $p < 0.05$.

Figure legends

Figure 1. Mean levels ($\pm$ standard error) of interleukin-1 beta (IL1b) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 2. Mean levels ($\pm$ standard error) of interleukin-1 receptor antagonist (IL1ra) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 3. Mean levels ($\pm$ standard error) of interleukin-17 (IL17) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 4. Mean levels ($\pm$ standard error) of interleukin-10 (IL10) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after 2 months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after 2 months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 5. Mean levels ($\pm$ standard error) of interleukin-8 (IL8) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 6. Mean levels ($\pm$ standard error) of transforming growth factor alpha (TGF α) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figure 7. Mean levels ($\pm$ standard error) of eotaxin and monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) in patients of control group, PD group at baseline, PD group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD 2 m), PD+DM group at baseline, and PD+DM group after two months of non-surgical periodontal therapy (PD+DM 2 m). Whiskers indicate standard error of the mean. The levels of each cytokine were determined (in pg/ml). The significance of differences between the groups was determined using Kruskal-Wallis test, and the Wilcoxon test was used for intragroup comparison. None of the differences were statistically significant ($p > 0.05$).

Figures

Figure 1. Salivary levels of interleukin-1 beta (IL1b) between the groups.

Figure 2. Salivary levels of interleukin-1 receptor antagonist (IL1ra) between the groups.

Figure 3. Salivary levels of interleukin-17 (IL17) between the groups.

Figure 4. Salivary levels of interleukin-10 (IL10) between the groups.

Figure 5. Salivary levels of interleukin-8 (IL8) between the groups.

Figure 6. Salivary levels of transforming growth factor alpha (TGFa) between the groups.

Figure 7. Salivary levels of eotaxin and monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) between the groups.

8. Conclusões da Tese

Dentro das limitações da metodologia empregada no presente estudo e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- este estudo foi capaz de identificar e monitorar a atividade da doença periodontal em pacientes diabéticos mesmo após a terapia periodontal, observando uma correlação entre a perda de inserção clínica de sítios ativos com sua respectiva área radiolúcida na subtração radiográfica;
- a perda de inserção clínica foi mais severa nos pacientes diabéticos; entretanto, não foi possível identificar diferenças significantes na atividade da doença periodontal entre os grupos DP e DP+DM;
- em sítios periodontais ativos de ambos os grupos, o perfil de expressão gênica foi predominantemente *up-regulated* em comparação aos sítios inativos. Tais genes diferencialmente expressos podem ser considerados úteis na indicação de potenciais biomarcadores para diagnóstico da doença periodontal ativa; no entanto, mais estudos devem investigá-los nesta condição;
- as condições periodontite e diabetes levaram a maiores níveis médios de proteínas salivares. Os achados sugerem a utilização da saliva como instrumento de detecção de marcadores inflamatórios, servindo como base para futuras pesquisas de diagnóstico em saliva e kits para teste de diagnóstico.

Referências Bibliográficas^{####}

^{####}De acordo com o Estilo Vancouver:

US National Library of Medicine. Bibliographic Services Division. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: sample references. Estados Unidos, 1978 [cited 2006 Oct 25].

Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I. Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2378-84.

Ainamo J, Bay I. Periodontal indexes for and in practice. *Tandlaegebladet*. 1976 Mar;80(5):149-52.

Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000*. 2002;29:31-69.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (position statement). *Diabetes Care* 2009;32:S62-7.

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

Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000*. 2004;34: 22-33.

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3167-72.

Beikler T, Peters U, Prior K, Eisenacher M, Flemming TF. Gene expression in periodontal tissues following treatment. *BMC Medical Genomics*. 2008 Jul 7;1:30.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Grgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):347-51.

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature*. 1986 Feb 6-12;319(6053):516-8.

Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R: Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Sep;28(9):840-7.

Bittar-Cortez JA, Passeri LA, Boscolo FN, Haiter-Neto F. Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clinical Oral Implants Res*. 2006 Oct;17(5):560-4.

Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, *et al.* Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol.* 2000 Jun;2(6):346-51.

Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid markers as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2003;31:167-80.

Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, *et al.* Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip.* 2005 Mar;5(3):261-9.

Christodoulides N, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Mohanty S, Dharshan P, *et al.* Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad of Sci.* 2007 Mar;1098:411-28.

Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SR. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2010 Jan;37(1):53-8.

Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, *et al.* Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* 2010 Mar;81(3):384-91.

Danesh-Meyer MJ, Chen ST, Rams TE. Digital subtraction radiographic analysis of GTR in human intrabony defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002 Oct;22(5):441-9.

Datta SK, Kalled SL. CD40eCD40 ligand interaction in autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 1997 Oct;40(10):1735-45.

Dezerega A, Pozo P, Hernández M, Oyarzún A, Rivera O, Dutzan N, *et al.* Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):267-76.

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

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

Duarte PM, Szeremeske de Miranda T, Lima JA, Dias Gonçalves TE, Santos VR, Bastos MF, *et al.* Expression of Immune-Inflammatory Markers in Sites of Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetic Subjects. *J Periodontol.* 2011 Aug 22. [Epub ahead of print].

Dubost JJ, Perrier S, Afane M, Viallard JL, Roux-Lombard P, Baudet-Pommel M, *et al.* IL-1 receptor antagonist in saliva; characterization in normal saliva and reduced concentration in Sjögren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol.* 1996 Nov;106(2):237-42.

Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, *et al.* Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Feb;80(2):290-6.

Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 1997 Feb;107(2):347-52.

Ekhlassi S, Scruggs LY, Garza T, Montufar-Solis D, Moretti AJ, Klein JR. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 secretion, and CCL25 gene expression, in mouse primary gingival cell lines: interleukin-6-driven activation of CCL2. *J Periodontal Res.* 2008 Aug;43(4):431-9.

Emingil G, Atilla G, Huseyinov A. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct;31(10):829-34.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991 Feb;62(2):123-31.

Engelbreton SP, Vossughi F, Hey-Hadavi J, Emingil G, Grbic JT. The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol.* 2006 Nov;33(11):784-90.

Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003 Apr;38(2):111-4.

Fokkema SJ, Loos BG, van der Velden U. Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. *Clin Exp Immunol.* 2003 Mar;131(3):477-83.

Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1913-9.

Gamonal J, Bascones A, Jorge O, Silva A. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluido f adults patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):675-81.

Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in di erent forms of human periodontal disease. *J Periodont Res*. 2003 Apr;38(2):210-7.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W Jr, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res*. 2006 Dec;41(6):580-4.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:112-43.

Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2000. 2009;50:52-64.

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

Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, *et al*. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics*. 2010 May 7;73(7):1334-41.

Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Nov;9(6):472-81.

Goodson JM. Diagnosis of periodontitis by physical measurement: interpretation from episodic disease hypothesis. *J Periodontol*. 1992 Apr;63(4 Suppl):373-82.

Górska R, Nedzi-Góra M. The effects of the initial treatment phase and of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and MMP-8, MMP-9, and TIMP-1 levels in the saliva and peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Nov-Dec;54(6):419-26.

Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis*. 1999 Mar;28(3):482-90.

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

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

Gursoy UK, Kononen E, Uitto VJ, Pussinen PJ, Hyvarinen K, Suominen-Taipale L, *et al*. Salivary interleukin-1beta concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Nov;36(11):922-7.

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*. 1983 May;10(3):298-310.

Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, *et al*. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003 Mar 20;348(12):1104-11.

Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, *et al*. Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(11):1863-70.

Hernandez M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega A, Silva N, *et al*. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Oct;90(10):1164-70.

Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol*. 2001 May;72(5):590-7.

Hugoson L, Laurell L. A prospective longitudinal study on periodontal bone height changes in a Swedish populations. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):665-74.

Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1994 Jan;21(1):26-31.

Ishikawa I. Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontol 2000*. 2007;43:9-13.

Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shitaka K, Makino H, *et al.* The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2001 Jun;72(6):774-8.

Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of probing attachment loss on adult periodontitis. *J Periodontol.* 1991 Mar;62(3):185-9.

Jones BC, Logsdon NJ, Walter MR. Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure.* 2008 Sep;16(9):1333-44.

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

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.

Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood.* 2003 Jan 15;101(2):545-51.

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

King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1527-34.

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

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

Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Ann Periodontol.* 1997 Mar;2(1):123-37.

Lamster IB, Grbic JT. Diagnosis of periodontal disease based on analysis of the host response. *Periodontol* 2000. 1995 Feb;7:83-99.

Lamster IB, Kaufman E, Grbic JT, Winston LJ, Singer RE. Beta-glucuronidase activity in saliva: relationship to clinical periodontal parameters. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):353-9.

Lindhe J, Okamoto H, Yoneyama T, Haffajee A, Socransky S. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. *J Clin Periodontol*. 1989 Nov;16(10), 662-70.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.

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

Luetteke NC, Lee DC. Transforming growth factor alpha: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin Cancer Biol*. 1990 Aug;1 (4):265-75.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *BMJ*. 1992 Jul 25;305(6847):207-8.

Malberg K, Molle A, Streuer D, Gangler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Clin Periodontol*. 1992 Mar;19(3):155-8.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MCP, 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 Apr;80(4):594-602.

Masihi KN, Schäfer H. Overview of biologic response modifiers in infectious disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2011 Dec;25(4):723-31.

Mengel R, Bacher M, Flores-de-Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1 β , interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. *J Clin Periodontol*. 2002 Nov;29(11):1012-22.

Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):322-9.

Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campbell CL, Humphries RL, Christodoulides N, *et al.* Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine* 2010;4:1-18.

Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc.* 2006 Mar;137(3):322-9.

Mir A, Minguez M, Tatay J, Pascual I, Pena A, Sanchiz V *et al.* Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastro* 2002;97:1452-1457.

Mirrielees J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR III, Ebersole JL, *et al.* Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2010 Dec;37(12):1068-74.

Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med.* 2011;17(7-8):840-5.

Motyl KJ, Raetz M, Tekalur SA, Schwartz RC, McCabe LR. CCAAT/enhancer binding protein β -deficiency enhances type 1 diabetic bone phenotype by increasing adiposity and bone resorption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 May;300(5):R1250-60.

Nakashima K, Giannopoulou C, Andersen E, Roehrich N, Brochut P, Dubrez B, *et al.* A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *J Clin Periodontol.* 1996 Sep;23(9):832-8.

Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of nonsurgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007 Oct;34(10):835-43.

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

Ng PY, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando EF, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Mar;49(2):252-60.

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

Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1014-22.

Novaes AB Jr, Silva MAP, Batista EL Jr, Anjos BA, Novaes AB, Pereira ALA. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of Young Brazilian patients. *J Periodontol*. 1991 Feb;62(2):116-22.

Novaes AB Jr, Silva MAP, Batista EL Jr, Anjos BA, Novaes AB, Pereira ALA. Manifestations of insulin-depedent diabetes mellitus in the periodontium of Young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol*. 1997 Apr;68(4):328-34.

O'Connell PA, Taba M Jr, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, *et al*. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):774-83.

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

Okada H, Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect Immun*. 1983 Jul;41(1):365-74.

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

Ota M, Katsuyama Y, Hamano H, Umemura T, Kimura A, Yoshizawa K, *et al*. Two critical genes (HLA-DRB1 and ABCF1) in the HLA region are associated with the susceptibility to autoimmune pancreatitis. *Immunogenetics*. 2007 Jan;59(1):45-52.

Ozaçaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Oct;46(5):592-8.

Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta*. 2004 May;343(1-2):1-16.

Pederson ED, Stanke SR, Whitener SJ, Sebastiani PT, Lamberts BL, Turner DW. Salivary levels of alpha 2-macroglobulin, alpha 1-antitrypsin, C-reactive protein,

cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. Arch Oral Biol. 1995 Dec;40(12):1151-5.

Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, *et al.* Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Oct;21(4):528-36.

Queiroz AC, Taba M Jr, O'Connell PA, Nóbrega PB, Costa PP, Kawata VKS, *et al.* Inflammation markers in healthy and periodontitis patients. A preliminary data screening. Braz Dent J. 2008;19(1):3-8.

Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Longterm impact on microbial load. J Periodontol. 1999 Jun;70(6):646-56.

Reddy MS, Geurs NC, Jeffcoat RL, Proskin H, Jeffcoat MK. Periodontal disease progression. J Periodontol. 2000 Oct;71(10):1583-90.

Ribeiro FV, Mendonça AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. J Periodontol. 2011 Aug;82(8):1187-96.

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

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadano Y, *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. J Exp Med. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.

Scannapieco FA. Position paper of the American Academy of Periodontology; periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. J Periodontol. 1998 Jul;69(7):841-50.

Scannapieco FA, Ng P, Hovey K, Hausmann E, Hutson A, Wactawski-Wende J. Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1098:496-7.

Scarel-Caminaga RM, Curtis KM, Renzi R, Sogumo PM, Anovazzi G, Viana AC, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA. Variation in the CXCR1 gene (IL8RA) is not associated with susceptibility to chronic periodontitis. J Negat Results Biomed. 2011 Nov 3;10:14.

Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. 2001. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001 Oct;28(10):910-6.

Sexton WM, Lim Y, Kryscio RJ, Dawson III DR, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol*. 2011 May;38(5):434-41.

Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, *et al*. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008 Mar;35(3):206-14.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):306-19.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992 Apr;63(4Suppl): 322-31.

Sjöholm A, Nyström T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Jan-Feb;22(1):4-10.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, *et al*. Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1992 Feb;19(2):146-9.

Sorsa T, Ding Y, Salo T, Lauhio A, Teronen O, Ingman T, *et al*. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Sep 6;732:112-31.

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

Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease: *Periodontol 2000*. 2006;40:130-143.

Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr;28(4):306-10.

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

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):369-74.

Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodont Res*. 2009 Jun;44(3):411-7.

Tobon-Arroyave SI, Jaramillo-Gonzalez PE, Isaza-Guzman DM. Correlation between salivary IL-1 β levels and periodontal clinical status. *Arch Oral Biol*. 2008 Apr;53(4):346-52.

Tsai CC, Ho Y, Chen CC. Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1995 Oct;66(10):852-9.

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

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 Apr;32(4), 383-9.

Vernal R, Dutzan N, Hernandez M, Chandia S, Puente J, Leon R, *et al*. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD41 T lymphocytes. *J Periodontol*. 2006 Oct;77(10):1772-80.

Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, *et al*. Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J Periodontal Res*. 2004 Jun, 39(3):158-67.

Yucel-Lindberg T, Nilsson S, Modeer T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in human gingival fibroblast. *J Dental Res*. 1999 Jan;78(1):61-8.

Zappa V, Reinking-Zappa M, Garf H, Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J Clin Periodontol*. 1991 Aug;18(7):508-15.

Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7059-65.

Anexos

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

GDR/gdr

OF.CEP/115/FORP

Ribeirão Preto, 23 de março de 2009.

Senhor Professor,

Ref.: Processo nº 2009.1.88.58.7
CAAE nº 0008.0.138.000-09

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 96ª Sessão, realizada em 23 de março de 2009, **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado: **"Biomarcadores Diagnósticos Relacionados à Atividade da Doença Periodontal em Diabéticos"**.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, os **Relatórios Parciais** nos dias **30 de março de 2010, 30 de março de 2011** e o **Relatório Final** no dia **30 de março de 2012**.

Atenciosamente,

Glaucia Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Termo de consentimento

Eu, _____, RG _____, CPF _____, fui convidado a participar deste projeto e assino este Termo de Consentimento com a finalidade de autorizar minha participação como sujeito da pesquisa “Biomarcadores Diagnósticos Relacionados à Atividade da Doença Periodontal em Diabéticos”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Taba Júnior e da doutoranda Priscila Paganini Costa. Afirmo que todas as implicações abaixo relacionadas me foram devidamente esclarecidas, inclusive verbalmente, através de questões levantadas junto aos pesquisadores, não restando qualquer dúvida que possa sugerir que tal consentimento não tenha sido feito de livre e espontânea vontade. Tenho a garantia de que terei esclarecimentos antes, durante ou após a realização da pesquisa. Estou ainda ciente de que:

1. Justificativa do projeto: O diagnóstico convencional da doença periodontal é realizado apenas com dados clínicos e não abrange a avaliação de marcadores em laboratório, relacionados à atividade da doença periodontal. E o diabetes está diretamente relacionado com o aparecimento da doença periodontal.
2. O objetivo desta pesquisa é realizar uma análise da atividade da doença periodontal por meio de avaliação clínica dos dados periodontais em pacientes portadores de periodontite crônica (um tipo de doença que destrói rapidamente o osso em volta dos dentes) e/ou diabetes, e verificar se há marcadores laboratoriais da doença na saliva e na biópsia da gengiva inflamada.
3. O paciente será submetido a um exame clínico computadorizado para a obtenção dos dados clínicos, coleta de saliva e biópsia da gengiva inflamada.
4. O paciente receberá o tratamento periodontal básico composto por raspagem do tártaro e placa subgengival em uma única sessão.
5. Os procedimentos que poderão causar desconforto para o paciente são os do exame clínico, coleta da saliva e coleta da gengiva inflamada. Não há risco previsível.
6. Sei que tenho liberdade de me recusar a participar ou de me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma represália ou negligência em meu tratamento.
7. Sei também que todos os dados que forem relatados ao pesquisador em confidência serão mantidos sigilosos, garantindo minha privacidade.
8. Tenho consciência de que qualquer dano à minha saúde que seja decorrente da minha participação nesta pesquisa será reparado sem que eu necessite fazer qualquer despesa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Paciente ou responsável

Prof. Dr. Mario Taba Júnior
CPF 070562408-01

Doutoranda Priscila Paganini Costa
CPF 713572201-97
Tel. 8114.2620