



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



JULIANA RICO PIRES

*Influência do estado diabético na doença
periodontal induzida em ratos. Análise metabólica,
genética e radiográfica*

ARARAQUARA
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



JULIANA RICO PIRES

*Influência do estado diabético na doença periodontal
induzida em ratos. Análise metabólica, genética e radiográfica*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Doutor em Periodontia.

***Orientadora:** Prof^a Dr^a Denise M. Palomari Spolidorio*

***Co-orientador:** Prof. Dr. Carlos Rossa Junior*

ARARAQUARA
2008

Pires, Juliana Rico

Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise metabólica, genética e radiográfica / Juliana Rico Pires. – Araraquara : [s.n.], 2008.

97 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Diabetes Melittus 2. Doenças periodontais 3. Peroxidase 4. Citocinas 5. Reabsorção óssea I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

JULIANA RICO PIRES

**INFLUÊNCIA DO ESTADO DIABÉTICO NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.
ANÁLISE METABÓLICA, GENÉTICA E RADIOGRÁFICA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

**Presidente e Orientador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari
Spolidorio**

2º Examinador: Profa. Dra. Marinella Holzhausen

3º Examinador: Profa. Dra. Solange Alonso Vergani

4º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

5º Examinador: Prof. Dr. Benedicto Egbert Correa de Toledo

Araraquara, 29 de fevereiro de 2008.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de fevereiro de 2008.

JULIANA RICO PIRES

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Juliana Rico Pires

Filiação: Osvaldo Gomes Pires Filho

Vera Helena Rico Pires

1997 - 2000 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2002 - 2004 Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

2005 - 2008 Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

SUMÁRIO

Resumo.....	12
Abstract.....	15
1 Introdução.....	18
2 Revisão da literatura.....	21
3 Proposição.....	33
4 Material e método.....	35
4.1 Indução do diabetes	38
4.2 Indução da doença periodontal.....	39
4.3 Análise sérica de cálcio e fósforo.....	40
4.4 Análise sérica de fosfatase alcalina.....	40
4.5 Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	40
4.6 Análise da alteração morfológica.....	41
4.7 Análise radiográfica.....	41
4.8 Obtenção amostras RNA tecidual e análise gênica.....	42
4.9 Análise estatística.....	45
5 Resultado.....	46
6. Discussão.....	71
7 Conclusão.....	84
8 Referências	86
9 Anexos.....	101

Pires J R. Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise metabólica, genética e radiográfica [tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

Evidências sugerem existir correlação positiva entre diabetes mellitus e destruição periodontal. Com intuito de estudar a influência do Diabetes Mellitus sobre a evolução da doença periodontal induzida, o presente estudo apresenta como objetivos, avaliar alterações metabólicas como, peso corporal, níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, alterações macroscópicas e óssea, e a expressão tecidual de mieloperoxidase e das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ . Foram utilizados ratos machos Wistar divididos em 4 grupos de 24 ratos, sendo: Grupo I controle; Grupo II diabético; Grupo III controle com doença periodontal induzida e Grupo IV diabético com doença periodontal induzida. Após dois dias da confirmação do estado diabético induzido por estreptozotocina, foi realizada a colocação da ligadura. Oito animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias após colocação da ligadura. Foi utilizado testes bioquímicos para avaliação das enzimas séricas, lupa estereoscópica para análise macroscópica, programa analisador de imagens digital para mensuração da perda óssea, leito de ELISA para determinar a concentração de MPO e Real-time PCR para expressão das citocinas. Os resultados demonstraram que o estado diabético perdurou até o final do experimento nos grupos II e IV, com níveis glicêmicos elevados. Dentre os marcadores bioquímicos, somente a ALP apresentou-se estatisticamente maior nos grupos diabéticos (II e IV). Macroscopicamente, houve diferença somente entre os grupos com e sem doença periodontal, independente da presença do diabetes, com maior alteração tecidual,

caracterizada por migração apical da gengiva marginal, perda de contorno marginal e de tecido interdental, nos períodos tardios de periodontite (15 e 30 dias). Os níveis gengivais de MPO foram estatisticamente maiores ($p < 0.05$) nos grupos com doença periodontal induzida (III e IV). O grupo IV apresentou maior perda óssea significativa se comparada aos demais grupos ($p < 0,05$). As citocinas IL-6 e IFN- γ encontraram-se elevadas nos grupos III e IV no 30º dia. Enquanto a citocina IL-1 β encontrou-se reduzida no grupo II. Nos limites deste estudo, pode-se concluir que a doença periodontal induzida não alterou o estado hiperglicêmico, no entanto, sugere-se que o diabetes acentue a severidade da perda óssea alveolar no processo evolutivo da doença periodontal, estando associado com uma resposta predominante Th2, com intensa expressão de citocinas pró-inflamatórias e do tipo Th1 durante a periodontite experimental.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; doenças periodontais; peroxidase; citocinas; reabsorção óssea.

Pires J R. Influence of Diabetes mellitus in induced periodontal disease in rats. Metabolic, genetic and radiographic analyses [tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

Evidences suggest the existence of a positive correlation between diabetes mellitus and periodontal collapse. In order to evaluate the influence of Diabetes Mellitus on the progression of periodontal disease induced in rats, the objective of the present study was to verify glycemic, calcium, phosphorus and alkaline phosphatase serum levels, to evaluate tissue and alveolar bone loss, myeloperoxidase (MPO) gingival levels, as IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ tissue expression. Wistar male rats were used in this study. They were divided into 4 groups of 24 rats each, as follows: Group I – control; Group II – diabetic; Group III – control with periodontal disease induced; and Group IV – diabetic with periodontal disease induced. After streptozotocin diabetic state was confirmed, a ligature was placed on the mandibular first molar teeth of Groups III and IV rats. Eight animals of each group were killed at the experimental periods of 3, 7, 15 and 30 days after the ligature placement. Was used biochemical tests for evaluation of serum enzymes, magnifying glass to macroscopic analysis, digital image analyzer program for measurement of bone loss, ELISA to determine the concentration of MPO and Real-time PCR for expression of cytokines. Results demonstrated that the diabetic state lasted up to the end of the experiment at groups II and IV. Significant increases in serum alkaline phosphatase were observed at diabetic groups (II and IV). Macroscopically, in the groups where periodontal disease was induced, it was possible to observe more tissue alterations

and it was higher in the 30-day experimental period. The MPO levels were significantly higher in induced periodontitis groups (III and IV) ($p < 0.05$). The Group IV showed higher bone loss significantly when compared to the other groups ($p < 0.05$). The cytokines IL-6 and IFN- γ were elevated in groups III and IV at 30 ° day. The cytokine IL-1 β was reduced at group II. Within the limits of this study, it was concluded that periodontal disease induced not changed the over-glycemic state however, suggests that the diabetes accentuates the severity of alveolar bone loss in the development of periodontal disease, being associated with a Th2 response predominant and maintenance of Th1 cytokines expression during the course of experimental periodontitis.

Key words: Diabetes mellitus; periodontal disease; peroxidase; cytokines; bone resorption.

1 Introdução

A doença periodontal é caracterizada como um processo inflamatório que pode atingir ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar, tendo como fator etiológico primário o biofilme bacteriano. Este biofilme e as respostas associadas ao hospedeiro estão envolvidos na patogênese da doença periodontal (Offenbacher, 1996).

A manutenção da integridade dos tecidos periodontais depende do equilíbrio dinâmico entre uma agressão microbiana e/ ou traumática e a resposta do organismo. O desequilíbrio neste mecanismo associado a um comprometimento sistêmico pode exacerbar uma reação inflamatória prévia, levando a uma severa destruição tecidual (Taylor et al., 1998).

Estudos epidemiológicos revelam que pacientes diabéticos exibem uma maior tendência para o desenvolvimento de doenças periodontais. Apresentando alta prevalência de doença periodontal severa, com abscessos periodontais recorrentes e aumento da predisposição a infecções (Løe, 1993; Nishimura et al., 1998; Lalla et al., 2000).

Diversos fatores têm sido associados à maior severidade das alterações periodontais observadas em diabéticos, incluindo modificações na composição do biofilme bacteriano subgengival e alterações no metabolismo das fibras colágenas dos tecidos causando prejuízo funcional das células de defesa, sugerindo existir correlação positiva entre diabetes mellitus e destruição periodontal (Løe, 1993; Taylor et al., 1998; Lalla et al., 2000; Holzhausen et al., 2004).

Numerosos fatores tem sido associados a essa massiva destruição incluindo, defeito na função e quimiotaxia dos PMNs, alteração no metabolismo do colágeno e estimulada secreção de mediadores inflamatórios e destrutivos como as citocinas, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{IFN-}\gamma$ e PGE_2 , em resposta a um estímulo de endotoxina bacteriana (Lalla et al., 1998; Nishimura et al., 1998; American Academy of Periodontology, 2000; Salvi et al., 1998). Contudo, o papel individual das diversas citocinas potencialmente envolvidas na patogênese da doença periodontal, os mecanismos moleculares envolvidos em sua função e sua relevância para progressão da doença são pobremente conhecidos.

Tendo em vista a importância do diabetes mellitus como fator debilitante e predisponente para a ocorrência de numerosas patologias de natureza infecciosa, deve-se dar importância à evolução da doença periodontal em pacientes com Diabetes mellitus para melhor entendimento da correlação das duas patologias (diabetes e periodontite) .

Levando-se em consideração a dificuldade de estudar a doença periodontal e o diabetes mellitus em humanos, a utilização de modelos animais pode ser considerada uma alternativa para o estudo de tais patologias, a fim de avaliar expressão gênica de citocinas liberadas durante o desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos diabéticos.

2 Revisão da Literatura

O diabetes mellitus é um transtorno metabólico complexo e primário dos carboidratos, que envolve secundariamente, porém de forma importante, lipídeos e proteínas. A doença associa-se a resistência à insulina e/ ou a sua deficiência, absoluta ou relativa. As alterações se devem à uma disfunção das ilhotas de Langerhans, também conhecidas como ilhotas pancreáticas, que consistem em um aglomerado de células do pâncreas, constituído por quatro tipos de células diferentes, as células β , α , δ e PP (polipeptídio pancreático) (Crawford, Cotran, 2000).

As células β representam cerca de 68% da população de células das ilhotas dos adultos e são responsáveis pela produção e armazenamento da insulina, sendo que o estímulo mais importante que deflagra sua síntese e liberação é a glicose. A ocorrência da elevação dos níveis de glicemia resulta em captação de glicose pelas células β e liberação imediata de insulina. No caso do Diabetes mellitus, como a síntese de insulina é deficiente, em casos de elevação de glicemia persistente, ocorre uma estimulação constante da liberação de insulina, mas não sua síntese, o que resulta em hiperglicemia (Crawford, Cotran, 2000).

Qualquer que seja a etiopatogênese da doença, a expressão fenotípica da deficiência da insulina manifesta-se por ampla e variada ordem de distúrbios metabólicos. Existem 2 tipos principais de diabetes primário: a) diabetes tipo 1 (diabetes insulino-dependente), conhecido também como diabetes juvenil e b) diabetes tipo 2 (diabetes não-insulino-dependente) ou tardio. Esses dois tipos se diferem na apresentação clínica, origem genética, patogênese, lesões das ilhotas pancreáticas e resposta à insulina (Report of expert committee, 2003).

A frequência e a gravidade das lesões extra-pancreáticas em geral são proporcionais à gravidade e duração da doença, havendo paralelismo com distúrbios metabólicos, principalmente a hiperglicemia. Nenhuma dessas lesões é característica e exclusiva do diabetes, que apenas antecipa, precipita ou agrava seu aparecimento e evolução. Resultante desse quadro relata-se: retinopatia, nefropatia, neuropatia, alterações macrovasculares podendo levar à amputação de membros inferiores e alterações microvasculares como prejuízo no processo de cicatrização de feridas (Mealey, 1999). Dentre as manifestações orais importantes do diabetes, pode-se destacar a ocorrência e aumento da severidade da doença periodontal crônica, abscessos periodontais recorrentes e aumento da predisposição a infecções (Lalla et al., 2000; Loe, 1993; Nishimura et al., 1998).

A alta porcentagem da glicose nos tecidos moles, além de proporcionar baixa resistência destes tecidos ao estresse, podem resultar em necrose da gengiva marginal como resultado da circulação sanguínea deficiente. E ainda, a falta de resistência do osso alveolar ao estresse, aumenta a perda das estruturas de suporte e mobilidade dos dentes (Bennatti et al., 2003; Rosenthal, 1970; Taylor et al., 1998). Lalla et al. (2000) considera um dos maiores responsáveis pelas complicações do diabetes a formação de AGEs (produtos finais da glicosilação avançada) e sua interação com os RAGEs (receptores de AGEs), inclusive nos tecidos periodontais.

Os AGEs são proteínas e ou lipídios ligados irreversivelmente à glicose. Essas moléculas ligam-se na parede celular de determinadas células alterando suas funções e as possíveis interações celulares. No tecido periodontal as células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, que participam ativamente do processo imunológico e cicatricial apresentam RAGEs em sua superfície. Na presença da interação AGEs-RAGEs apresentam metabolismo alterado e reduzida eficiência imunológica (Lalla et al., 2001).

A destruição tecidual e conseqüente perda de inserção periodontal ocorrem freqüentemente e em maior extensão em diabéticos não controlados ou descompensados (Safkan-Seppala, Ainamo, 1992; Tervonen, Oliver, 1993; Tervonen et al., 1994). Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença periodontal em diabéticos, como defeito na função e quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), alteração de síntese e metabolismo do colágeno, aumento da atividade de collagenases, acúmulo de produtos finais da glicosilação (AGES) que atuam sobre receptores de macrófagos e monócitos resultando em aumento na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e prostaglandina (PGE₂) (Lalla et al., 1998; Nishimura et al., 1998; Salvi et al., 1998, American Academy of Periodontology, 2000; Nishimura et al., 2006), mudança vascular patológica, comprometimento do potencial de cicatrização de feridas e desequilíbrio microbiológico (American Academy of Periodontology, 1996; Grossi, 2001; Iacopino, 2001; Zambon et al., 1988).

A periodontite é uma resposta inflamatória destrutiva dos tecidos periodontais frente à presença de uma microbiota subgengival específica e composta por distintas espécies microbianas, sendo que a combinação dessas bactérias, favorece o crescimento do biofilme subgengival e o conseqüente desenvolvimento da doença periodontal (Darveau et al., 1997). Acredita-se que freqüentes mudanças da microbiota subgengival são capazes de alterar a composição dos subprodutos bacterianos liberados e originar alteração na resposta do hospedeiro.

No entanto, a presença de patógenos de maior virulência, tais como, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* proporcionam aceleração significativa no desenvolvimento da doença periodontal (Mandell et al., 1992; Haffajee, Socransky, 1994).

Alguns trabalhos (Mandell et al., 1992; Haffajee, Socransky, 1994; Thorstensson et al., 1995), verificaram não haver diferenças significativas na prevalência e quantidade da microbiota subgengival entre diabéticos e não diabéticos portadores de doença periodontal crônica. Por outro lado, Zambon et al. (1988) e Christgau et al. (1998), sugerem predominância de *Capnocytophaga* sp, *Porphyromonas gingivalis* e *Campylobacter rectus* nos sítios com doença periodontal dos pacientes diabéticos.

Vários fatores podem influenciar a relação parasita/ hospedeiro em infecções causadas por microrganismos anfíbios na microbiota residente bucal. Dentre esses fatores, merece destaque a susceptibilidade ao soro, o qual participa dos mecanismos de defesa contra a invasão microbiana nos tecidos (Sundqvist, Johansson, 1982) e sua disseminação sistêmica (Okuda et al., 1986).

A utilização de modelos animais na elucidação da patogênese do diabetes e da doença periodontal explica-se pela grande dificuldade de estudar a doença periodontal em humanos.

Na literatura diferentes metodologias tem sido proposta para indução do diabetes em animais, como a utilização de aloxana (McMillan, 1970), pancreatectomia parcial (Grandini, 1978) e indução pela estreptozotocina após injeção endovenosa de prolina triada [H] (Pepato et al., 1996). Entretanto, um dos modelos de diabetes mellitus experimental mais utilizado atualmente, é a administração do antibiótico estreptozotocina (STZ), por causar a degranulação das células betas do pâncreas produtoras de insulina, promovendo conseqüentemente, o aparecimento do diabetes (Goodner, Russel, 1965; Pepato et al., 1993; Mattar-Mori et al., 2003).

Segundo Scott et al. (1984), pode-se observar mudanças enzimáticas no soro dos indivíduos com o desenvolvimento do diabetes, sendo que as mudanças podem ocorrer devido à própria doença ou como conseqüência de suas complicações, e estas

atividades alteradas, possivelmente podem refletir alterações nos mecanismos de síntese, degradação, estoque e excreção de enzimas, tais como as fosfatases alcalinas (ALP), aspartato aminotransferase (AST), creatina cinase (CK), a Lactato Desidrogenase (LD).

As fosfatases alcalinas são um grupo de enzimas localizadas nas membranas das células dos canalículos biliares do fígado, mas também são sintetizadas pelas células osteoclásticas do tecido ósseo e de outros tecidos como o epitélio intestinal, túbulos renais e placenta. Porém as formas encontradas no soro originam-se em sua grande maioria do fígado ou provém do esqueleto. Dessa forma, a ALP sérica e isoenzimas são provavelmente um reflexo de disfunção hepática e/ ou óssea (Bowers, McComb, 1975; Koyama et al., 1998).

Alguns estudos (Koyama et al., 1998; Gonzales, Fevery, 1992) demonstraram que em pacientes diabéticos não insulino-dependentes a atividade da ALP sérica é elevada no estágio inicial da doença, e este aumento também foi observado em ratos diabéticos, induzido tanto pela STZ como pela aloxana (ALX).

Estudos da correlação de enzimas séricas e diabetes são consideravelmente reduzidos na literatura e assim, faz-se necessário tal avaliação para que estas enzimas sejam utilizadas ou descartadas como marcadores do efeito tóxico “tecido-específico” no diabetes experimental. Para tanto, é necessário utilizarmos modelo experimental adequado, que reproduza o quadro diabético. Tais condições podem ser indiscutivelmente obtidas pela avaliação temporal dos parâmetros alterados no diabetes como por exemplo, peso corporal e glicemia.

Há uma variedade muito grande de espécies microbianas no biofilme subgengival do periodonto humano e, a destruição tecidual proveniente das respostas imunoinflamatórias do hospedeiro frente a esta complexa microbiota, é estudada, quase sempre, de maneira retrospectiva. O modelo animal mais freqüentemente utilizado em

estudos de periodontite experimental é o rato (*Rattus norvegicus*) por ser considerado um grupo de custo baixo e de fácil manipulação (Klausen, 1991)

Dentre os métodos para indução de doença periodontal, Nyman et al. (1979) utilizaram como modelo de doença periodontal, o método de indução por ligadura que consiste na colocação de um fio nylon, de seda ou de algodão ao redor da cervical de um molar. Entretanto, este modelo experimental têm sido muito questionado pelo fato de invariavelmente levar a uma injúria traumática e, apenas secundariamente, agir como fator retentivo de placa.

A doença periodontal crônica é caracterizada por um processo dinâmico de complexas reações responsáveis por modificações morfológicas com o decorrer do tempo da agressão. No sítio infectado, o processo inflamatório é capaz de carrear numerosos componentes do sistema complemento, os quais, ativados por via clássica e/ ou alternativa podem liberar fatores quimiotáticos para leucócitos e elementos vasoativos, potencializando a resposta inflamatória que pode estar alterada no indivíduo diabético.

No ano de 2002, Buchmann et al. caracterizaram a atividade de neutrófilos como componente crítico na patogenicidade da doença periodontal. A atividade leucocitária na periodontite agressiva comparado a periodontite crônica, através de análise de mieloperoxidase no fluido crevicular mostrou atividade leucocitária significativamente maior na periodontite agressiva em relação a periodontite crônica antes e após a terapia. Entretanto, parâmetros clínicos também observados não mostraram diferenças entre os dois tipos de periodontites.

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína de aproximadamente 150KDa, tetramétrica, altamente glicada. É abundante em neutrófilos e monócitos, constituindo 5% e 1-2%, respectivamente, do peso seco total dessas células. Está estocada nos grânulos azurófilos primários desses leucócitos e é secretada no meio extracelular e no

compartimento fagolisossomal após ativação do fagócito por uma variedade de estímulos, sendo eficiente na morte de microrganismos (Zipfel et al., 1997; Buchmann et al., 2002).

Alguns estudos Yamalik et al. (2000), avaliando os níveis de mieloperoxidase do fluido gengival de pacientes com Periodontite agressiva, Periodontite crônica e Saúde periodontal, observaram que os níveis de mieloperoxidase foram mais baixo no grupo de saúde periodontal quando comparados aos grupos com periodontite agressiva e periodontite crônica. Sugerindo que a utilização da expressão de MPO tecidual pode ser utilizada como marcador inflamatório, por estimar o acúmulo de neutrófilos (Yamalik et al., 2000; Buchmann et al., 2002; Liskmann et al., 2004; Wei et al., 2004).

Uma das possíveis vias de regulação da resposta inflamatória nas doenças periodontais seria a produção de citocinas pelas diferentes sub-populações de linfócitos T auxiliares (ou T “helper”: Th), que atuariam atenuando ou potencializando a reação inflamatória nos tecidos periodontais, e desta forma, determinando a atividade ou latência das doenças periodontais (Yamazaki et al., 2003; Teng, 2003; Gemmel, Seymour, 2006). As respostas mediadas por linfócitos Th podem exibir um padrão Th1, que consiste predominantemente de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, ou um padrão do tipo Th2, com características anti-inflamatórias e de resposta imune predominantemente humoral. Tal polarização é determinada por citocinas típicas de cada padrão, envolve a participação de quimiocinas e tipos celulares característicos, e determina o prognóstico e o curso de diversas doenças infecciosas, inflamatórias e auto-imunes (Mosmann, Coffman, 1989; Abbas et al., 1996; Jankovic et al., 2001). Esses relatos servem de base para a hipótese de que as células Th1 estão associadas com lesões estáveis, e de uma resposta Th2, com a doença em progressão (Gemmell, Seymour, 2006). Entretanto, outros estudos têm relatado resultados inconsistentes com a predominância de células do

tipo Th1, ou resposta reduzida da Th2 em tecidos doentes (Salvi et al., 1998; Baker, 2000; Teng, 2003).

Nos estudos de Iwasaki et al. (1998) e Garlet (2004), os autores relataram que durante a fase inicial da doença periodontal experimental predomina nos tecidos periodontais uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias e do tipo Th1: TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-12. Por outro lado, a fase tardia da doença se caracteriza pela intensa expressão de mediadores Th2, como IL-4 e IL-6, além da persistência da expressão de mediadores Th1, porém em níveis menores que os verificados anteriormente.

Fatores associados às alterações metabólicas do diabetes como hiperglicemia, a hiperlipidemia e acúmulo dos AGEs, podem levar à uma excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos como PGE₂, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Schmidt et al., 1993; Miyata et al., 1996; Salvi et al., 1998), diminuindo a produção de colágeno tipo I (Owen et al., 1998), contribuindo assim, com a destruição tecidual (Iacopino, 1995). Entretanto, alguns estudos em ratos (Doxey et al., 1995, 1998) sugerem que o estado diabético pode induzir uma hipofunção generalizada de macrófagos, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) e de fatores de crescimento (PDGF), o que pode levar à falha no processo de cicatrização e favorecer o desenvolvimento de periodontite.

Estudos in vitro, demonstraram que os fibroblastos, componente celular mais predominante no tecido conjuntivo e ligamento periodontal, além de serem células responsáveis pela integridade do periodonto (Koka, Reinhardt, 1997), são células que quando estimuladas pelo lipopolissacarídeo bacteriano aumentam a liberação, dentre outras citocinas, da interleucina 6 (IL-6), (Komatsu et al., 2001) capaz de intensificar as reações inflamatórias levando ao dano tecidual e maior destruição óssea.

A produção de citocinas como IL-6 em tecidos gengivais inflamados tem sido observada em associação com outras citocinas como IL-1 β e TNF- α , sendo encontrada em elevados níveis em sítios com destruição periodontal (Okada, Murakami, 1998; McCauley, Nohutcu, 2002; Moreira et al., 2007).

A interleucina -1 β (IL-1 β) é uma citocina diretamente envolvida na reabsorção óssea sendo responsável pela maior parte da atividade do chamado fator de atividade osteoclástica (OAF). É produzida em larga escala por macrófagos e monócitos, em resposta a uma grande variedade de estímulos, incluindo os constituintes bacterianos, tais como os lipopolissacarídeos (LPS) (Page, 1991).

A IL-1 β exerce outras atividades, podendo atuar como mediador de destruição tecidual na periodontite humana. Essas atividades incluem: a inibição da formação óssea, a estimulação da síntese de prostaglandinas e tromboxano, a estimulação da produção de collagenases e proteases, a potencialização da degranulação de neutrófilos e produção de superóxido, além do aumento da adesão leucocitária de células endoteliais e a estimulação da proliferação de fibroblastos e queratinócitos (Stashenko et al., 1991).

Estudo de Duarte et al., (2007) demonstrou que níveis elevados de IL-1 β estão associados de forma significativa com sítios comprometidos periodontalmente. Adicionalmente, os autores demonstraram que pacientes com diabetes tipo 2 apresentam produção tecidual excessiva de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 em sítios com doença periodontal. Resultados similares foram encontrados em pacientes com diabetes tipo 1 (Salvi et al., 1998).

Um dos efeitos pró-inflamatórios da IL-1 é a indução de síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) por macrófagos e fibroblastos gengivais. A PGE₂ é vasodilatadora e um co-fator envolvido no aumento da permeabilidade vascular que ocorre em sítios com inflamação, e um mediador de desmineralização óssea.

Possivelmente, o fator mais importante da PGE_2 na destruição dos tecidos periodontais não está relacionado ao seu envolvimento na reabsorção óssea, e sim em sua capacidade de atuar sobre outros processos, pela supressão da produção de IL-1 e TNF- α , alterando o controle de iniciação e perpetuação do processo inflamatório.

A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem sido encontrada de forma exacerbada em pacientes obesos portadores de diabetes tipo 2 (Dandona et al., 1998; Fernandez-Real et al., 2001; Nishimura et al., 2006). O fato desta citocina ser encontrada em níveis elevados no soro de diabéticos pode ser hipoteticamente explicada pela produção de TNF no tecido adiposo (Hotamisligil et al., 1995), pela atividade dos AGES e/ ou aumento da produção de citocinas causada indiretamente por efeitos da hiperinsulinemia ou hiperglicemia (Soop et al., 2002; Vlassara, Palace, 2002).

Acredita-se que o TNF- α pode estar associado com maior severidade da doença periodontal por várias vias como estimulando fibroblastos a sintetizar enzimas que participam da degradação celular e tecidual (Brenner et al., 1989) e por estimular osteoclastos a ativar a reabsorção óssea (Kobayashi et al., 2000).

Estudos relatam que a resposta local à infecção microbiana em diabéticos é caracterizada por inflamação prolongada, sendo que esta pode ser revertida com uso de inibidores de TNF (Naguib et al., 2004; Wetzler et al., 2000). Sugerindo que o diabetes modula a resposta inflamatória por prolongar a duração da expressão de TNF- α , sendo que esta, por sua vez, altera a expressão de citocinas levando à persistência de inflamação e de dano tecidual.

Dentre as citocinas relacionadas com a modulação da resposta inflamatória, pode-se destacar ainda o IFN- γ , citocina considerada a principal ativadora de macrófagos. Além disso, apresenta diversos efeitos no sistema imune, como: estimulação da

fagocitose, captação e apresentação de antígenos, produção de citocinas inflamatórias e mediadores antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO) (O'Garra, 1989; Bogdan et al., 2000; Bogdan, 2001; Szabo et al., 2003).

O IFN- γ parece ser a principal citocina produzida por células T na doença periodontal, e diversos estudos têm demonstrado uma associação entre IFN- γ e lesões progressivas ou formas mais severas de doença periodontal (Ebersole, Taubman, 1994; Roberts et al., 1997; Salvi et al., 1998; Sigusch et al., 1998; Kawai et al., 2000; Takeichi et al., 2000; Ukai et al., 2001; Gorska et al., 2003).

Além de atuar na determinação da severidade da doença periodontal, o IFN- γ está envolvido no controle da infecção periodontal, uma vez que tal citocina estimula fibroblastos gengivais a produzirem NO (Kendall et al., 2000; Daghigh et al., 2002), potencialmente envolvido no controle de microrganismos no microambiente periodontal (Kendall et al., 2001; Rausch-Fan et al., 2001).

A produção de IFN- γ deveria aumentar a atividade fagocitária, tanto de neutrófilos quanto de macrófago, e dessa maneira conter a infecção. No entanto, a lesão, hipoteticamente, persiste, dentre outros mecanismos, devido a contínua formação do biofilme bacteriano e conseqüente manutenção da resposta imune e inflamatória (Gemmell, Seymour, 1994).

Apesar das evidências sugestivas da participação de IFN- γ na patogênese das doenças periodontais, seu real papel na modulação da severidade da doença e no controle da infecção periodontal, assim como os mecanismos envolvidos em tais funções, permanecem desconhecidos.

Tendo em vista a importância do diabetes mellitus como fator debilitante e predisponente para a ocorrência de numerosas patologias de natureza infecciosa, deve-

se dar importância à resposta desse hospedeiro frente à agressão microbiana para melhor entendimento da patogênese da doença periodontal.

3 Proposição

Com intuito de avaliar a influência do Diabetes Mellitus sobre a evolução da doença periodontal induzida, o presente estudo apresentou como objetivos avaliar em animais submetidos ou não à doença periodontal:

- √ Taxa glicêmica e níveis séricos de cálcio, fósforo e da enzima fosfatase alcalina;
- √ Atividade de mieloperoxidase (MPO) nas biópsias teciduais;
- √ Perda óssea alveolar radiográfica e alteração morfológica dos tecidos gengivais;
- √ Expressão das citocinas: IL-6; IL-1 β ; TNF- α e INF- γ ; nas amostras de tecido gengival dos animais, submetidos ou não à periodontite experimental.

4 Material e método

✓Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, processo: 28/2003 (Anexo 1).

✓Animais

No presente trabalho foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, jovens com peso inicial de aproximadamente 150g, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas, separados de acordo com o grupo experimental, em sala com temperatura ambiente controlada, com ciclos de luz-escuro de 12 horas e, alimentados com ração normal e água ad libitum.

Foram divididos aleatoriamente, em 4 grupos experimentais:

- I. Grupo Controle (n=24)
- II. Grupo Diabético induzido (n=24)
- III. Grupo Doença Periodontal induzida por ligadura (n=24)
- IV. Grupo Diabético induzido e com Doença Periodontal induzida por ligadura (n=24)

Os animais receberam diariamente água ad libitum e foram sacrificados em grupos de seis animais aos 3, 7, 15 e 30 dias após o baseline.

4.1 Indução do Diabetes

Após um período de 16 horas de jejum, exceto água ad libitum, os animais dos Grupos II e IV receberam, por via endovenosa (jugular), uma dose única de estreptozotocina (STZ) dissolvida em tampão citrato (0,01M pH 4,5), na concentração de 50-60mg/Kg do animal (Pepato et al., 1996; Mattar-Mori et al., 2003). A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga.

✓Nível de Glicose Plasmática

A determinação da glicemia foi realizada por meio de coleta de sangue após corte com tesoura a cerca de 2mm da extremidade distal da cauda de cada animal. As amostras de sangue foram coletadas em Eppendorf (1mL), contendo liquemine (Roche, São Paulo, Brasil). Após centrifugação do sangue para obtenção de plasma foi realizado o teste de glicemia pelo método enzimático da glicose-oxidase (AUTOANALYSER TECHNCON RA-XT, Bayer) no laboratório da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Bergmeyer, Bernt, 1974; Mattar-Mori et al., 2003). A taxa glicêmica foi avaliada após jejum de 16 horas, no período da manhã, em todos períodos experimentais.

Para critérios de inclusão, foram aceitos animais com glicemia inicialmente superior a 350mg/dL, visto que a taxa glicêmica de ratos com diabetes induzido varia de 250 a 600mg/dL e de ratos não diabéticos, varia de 126 a 150mg/dL (Pepato et al., 1996; Pepato et al., 2001).

4.2 Indução da Doença Periodontal

Até 2 dias após comprovação do quadro diabético por meio de análise da taxa glicêmica, foi realizada a indução da doença periodontal.

✓Anestesia

Os animais receberam anestesia geral para indução da doença periodontal. A anestesia foi obtida com injeção intraperitoneal de 0,08mL/100g por peso corporal de Ketamina 10% (Ketamina, Agener União Ind. e Com. LTDA) e 0,04mL/100g por peso corporal de cloridrato de xilazina (Virbaxyl 2%, Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA).

✓ Indução da Doença Periodontal por ligadura

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permite a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Animais em que a doença periodontal não foi induzida, com a mesma idade dos demais grupos, foram utilizados como grupo controle.

A metodologia para indução de doença periodontal por ligadura foi descrita por Holzhausen et al. (2002).

Com auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 24, marca Corrente, ao redor dos primeiros molares inferiores bilateralmente.

4.3 Análise sérica de cálcio e fósforo

A determinação dos níveis séricos de cálcio e fósforo foram realizadas por meio de uma reação de ponto final (FÓSFORO e CÁLCIO Liquiform – LABTEST).

4.4 Análise sérica de fosfatase alcalina

Para dosagem da fosfatase alcalina foi coletado o soro para análise por meio do método colorimétrico. Este método utiliza a reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato, pela ALP, com formação do produto colorido p-nitrofenóxido (Kit Reagente Ames). Para as leituras espectrofotométricas das análises das enzimas foi utilizado um Autanalyser Technicon RA-XT (Mattar-Mori et al., 2003).

4.5 Análise da atividade de mieloperoxidase

Uma porção de tecido gengival ao redor de dentes submetidos ou não a colocação de ligadura dos animais diabéticos induzidos ou não, foi removida e utilizada para análise da atividade de mieloperoxidase (MPO) por meio da técnica espectrofotométrica empregando leitor de ELISA, um marcador de infiltrado neutrofílico (Bradley et al., 1982). O tecido foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador Polytron (Fisher Scientific) em hexadecyltrimethyl-ammonium bromide 10% em 50 mmol/L de fosfato de potássio tamponado (pH 7.0). O homogenato foi então centrifugado por 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante (35 µL) foram adicionadas a 3 mL de tampão (100 mmol/L de guaiacol, 0.17% H₂O₂, e 50 mmol/L de fosfato de potássio tamponado, pH

7.0). A alteração na absorbância a 460nm foi medida com um espectrofotômetro Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Uma unidade de atividade de MPO foi definida como 1 μ mol de peróxido degradado por minuto a 25 °C.

4.6 Análise Macroscópica das alterações morfológicas

As análises macroscópicas de cada hemimandíbula foram realizadas com auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss com aumento 20x, por um examinador cego e calibrado para realizar análise descritiva das modificações observadas no tecido gengival dos primeiros molares inferiores, como: modificações de contorno, volume e posição da gengiva.

4.7 Análise Radiográfica

Foram realizadas tomadas radiográficas das hemimandíbulas (direita e esquerda) através do uso de um sistema de imagem digital computadorizado, CDR (Computed Digital Radiograph for Microsoft Windows, Shick Technologies, Inc. Dialom Dental Products) que utiliza um sensor eletrônico ao invés de filme radiográfico. Os sensores eletrônicos foram expostos a 65KVvp e 10mA com tempo de exposição de 12 impulsos/ segundo, utilizando um aparelho de R-X (GE 1000). A distância foco/ filme foi padronizada em 50cm. Após as tomadas radiográficas, as radiografias digitais foram analisadas com auxílio de um software pertencente ao próprio sistema CDR. Para cada radiografia foram realizadas 3 mensurações da medida linear (em mm) da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial dos primeiros molares

inferiores de cada animal. As análises foram realizadas por único examinador cego e treinado.

4.8 Obtenção das amostras para extração de RNA total para as citocinas

As amostras de tecido gengival ao redor do primeiro molar inferior foram removidas dos animais e imediatamente congeladas e mantidas a -70°C até o processamento das amostras.

O protocolo para extração de RNA com o reagente Trizol para quantificação das citocinas, seguindo orientações do fabricante (Gibco BRL, USA).

✓Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Gibco BRL, USA). Brevemente, para cada amostra, em um tubo tipo “eppendorf”, foi adicionado o reagente Trizol (1 ml para 50 mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma) e centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em “vortex” e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado em etanol 100%, sendo então seco a temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel de filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNAase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C.

Uma alíquota de 5 μ l foi utilizada para a obtenção concentração de RNA/ μ l nas amostras, determinada usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia, USA) ,

✓ *Reação de RT-PCR*

O DNA complementar (cDNA) sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript II, Gibco Life Tech.) utilizando 5 μ g de RNA, de acordo com as especificações do fabricante.

✓ *Reações de Real Time PCR*

A expressão quantitativa de genes de citocinas e quimiocinas foram analisada através de reações de RealTimePCR, utilizando-se os sistemas SYBR Green e Taq-Man em um aparelho GeneAmp 5700 (Applied Biosystems – USA). Primers adequados para tal reação foram criados a partir do programa Primer Express, específico para tal tarefa. Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green e Taq-Man Master Mix, como determinado pelo fabricante. A reação compreende 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Nas reações com o SYBR Green, um ciclo final de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C, foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os

resultados foram analisados com base no valor de TC (threshold cycle) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

Os primers foram desenvolvidos a partir das seqüências de bases das citocinas pré-determinadas, sendo que as citocinas estão listadas abaixo com suas respectivas seqüências de bases:

Nome: IL6 rattus.txt-36F Tm 80 Pb 102 Ta 59

Sequência: TCAACTCCATCTGCCCTTCAG

Nome: IL6 rattus.txt-137R

Sequência: AGGCAGTGGCTGTCAACAACA

Nome: IFN rattus.txt-182F Tm 78 Pb 125 Ta 57

Sequência: GGCAAAAGGACGGTAACACGA

Nome: IFN rattus.txt-306R

Sequência: CAGGTGCGATTTCGATGACACT

Nome: IL1b rattus.txt-855F Tm 82 Pb 162 Ta 60

Sequência: ACTTCACCATGGAACCCGTGT

Nome: IL1b rattus.txt-1016R

Sequência: GCCACGGTTTTCTTATG GCTC

Nome: TNF rattus.txt-43F Tm 84 Pb 128 Ta 62

Sequência: GAGGCTCTCCCCAAAAGATG

Nome: TNF rattus.txt-170R

Sequência: CCAATCACCCCGAAGTTCAGT

4.9 Análise Estatística

Para comparação dos valores médios de peso, glicemia, níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, mieloperoxidase e expressão gênica durante evolução da periodontite experimental foi utilizado teste ANOVA, enquanto para comparação dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste ANOVA (Tukey).

Foi obtido valor médio de perda óssea para os 3 exames de cada radiografia do primeiro molar mandibular. O teste não-paramétrico Kruskal Wallis foi utilizado para comparar a diferença de perda óssea ocorrida entre os grupos experimentais em cada período de avaliação (3º dia, 7º dia, 15º dia e 30º dia), e para comparar as diferenças entre os períodos de avaliação em um mesmo grupo.

5 Resultado

5.1 Análises dos parâmetros fisiológicos e metabólicos dos ratos

Considerando o estudo da influência do estado diabético na doença periodontal induzida por ligadura em ratos que ingeriram água pode-se observar que os parâmetros fisiológicos e metabólicos são importantes para conhecimento do padrão comportamental desses animais.

5.1.1 Peso corporal

O peso corporal dos animais apresentaram médias apresentaram média de peso corporal de $143 \pm 14,5$ gramas no dia em que foi realizada a indução do diabetes (dia -4). No momento de confirmação do estado diabético (dia -2 ou dia da glicemia), os animais apresentaram média de peso de $163,1 \pm 11,5$ gramas. Observou-se que os animais apresentavam homogeneidade em relação ao peso corporal e tal fato mostrou-se importante no pareamento do peso corporal dos ratos para realização da indução da doença periodontal (baseline).

Pode-se observar um aumento gradual do peso corporal nos grupos I e III nos períodos experimentais tardios de 15 e 30 dias, em relação ao peso medido após confirmação do estado diabético (dia -2). Em relação aos grupos diabéticos (II e IV), pode-se observar que não houve alteração significativa do peso corporal durante os períodos

experimentais 3, 7 e 15 dias, mas apresentaram aumento na média do peso corporal aos 30 dias em relação a todos os outros períodos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Peso corporal em gramas (média $\pm$ DP) dos grupos estudados nos períodos experimentais

Grupos	Períodos				
	Dia -2	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	158 $\pm$ 16.7 ^{aξ}	166 $\pm$ 42 ^{aα}	240.1 $\pm$ 20.3 ^{bβ}	238.2 $\pm$ 44.6 ^{bc}	346.3 $\pm$ 32.9 ^{dμ}
II	148 $\pm$ 27.1 ^{eξ}	161 $\pm$ 35.2 ^{eα}	160.6 $\pm$ 32.5 ^{eχ}	164.4 $\pm$ 38.1 ^{eφ}	182 $\pm$ 45.8 ^{fv}
III	163.1 $\pm$ 11.5 ^{eξ}	187 $\pm$ 17.4 ^{gα}	201.5 $\pm$ 36.2 ^{hβχ}	249 $\pm$ 32.8 ^{ic}	359 $\pm$ 39.7 ^{jμ}
IV	150.4 $\pm$ 16.9 ^{kξ}	153.3 $\pm$ 27 ^{kα}	157 $\pm$ 25.4 ^{kδχ}	158.7 $\pm$ 24 ^{kφ}	240 $\pm$ 100.2 ^{lπ}

^a Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

^α Médias seguidas de símbolos iguais, nas colunas, não diferem entre si em cada período correspondente, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

5.1.2 Glicemia sérica

Todos os animais foram analisados quanto à taxa glicêmica no dia da confirmação do estado diabético (dia -2 ou glicemia) e no dia do sacrifício em todos os períodos estudados (3º, 7º, 15º e 30º dia), mesmo nos ratos dos grupos I e III, os quais sofreram uma simulação da técnica de indução do diabetes.

Considerando-se diabéticos os animais com taxa glicêmica acima de 280mg/dL, pode-se dizer que, os animais dos grupos diabéticos (II e IV) independente da presença de doença periodontal induzida, apresentaram nível glicêmico de 350mg/ dL, sendo que esses animais apresentaram perpetuação desta condição sistêmica por todos períodos. O grupo com diabetes (II) apresentou maior taxa glicêmica estatisticamente significativa ($p<0.05$) quando comparado ao grupo diabetes com doença periodontal (IV), aos 3 e 30 após indução de periodontite (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de glicemia em mg/dL (média $\pm$ DP) em todos períodos experimentais de todos os grupos

Grupos	Períodos				
	Dia -2	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	165 $\pm$ 12,7 ^a	138,3 $\pm$ 14,8 ^b	140,2 $\pm$ 13,9 ^b	143,4 $\pm$ 43,6 ^b	155,4 $\pm$ 17,5 ^b
II	528,1 $\pm$ 110,7 ^c	605,9 $\pm$ 171,6 ^{c*}	327,1 $\pm$ 95 ^d	673 $\pm$ 86,6 ^c	1166 $\pm$ 332,5 ^{e*}
III	160,7 $\pm$ 7,3 ^f	139 $\pm$ 15,3 ^g	135,1 $\pm$ 10,2 ^g	139 $\pm$ 15,3 ^g	149 $\pm$ 21,9 ^f
IV	536,1 $\pm$ 102,6 ^h	468,7 $\pm$ 164,4 ^h	321,7 $\pm$ 112,5 ⁱ	640,2 $\pm$ 102 ^k	923,6 $\pm$ 285,2 ⁿ

^a Letras diferentes, nas linhas, representam diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos de cada grupo, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

^{*} Médias seguidas de símbolos, nas colunas, diferem entre os grupos correspondentes, em cada período, pelo teste Anova (Tukey) ao nível de 5%.

5.1.3 Cálcio sérico

Em relação aos níveis séricos de cálcio, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de cálcio entre os grupos e períodos estudados ($p < 0,05$). Tais resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração sérica de cálcio em mg/dL (média $\pm$ DP) nos períodos e fases experimentais estudados

Grupos	Períodos				
	Dia -2	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	9,2 $\pm$ 0,6 ^a	9,0 $\pm$ 1,3 ^a	8,3 $\pm$ 0,8 ^a	8,7 $\pm$ 0,7 ^a	9,5 $\pm$ 0,3 ^a
II	9,3 $\pm$ 1,9 ^b	9,1 $\pm$ 0,9 ^b	8,5 $\pm$ 0,7 ^b	8,8 $\pm$ 0,6 ^b	9,1 $\pm$ 0,7 ^b
III	9,1 $\pm$ 0,6 ^c	9,1 $\pm$ 0,3 ^c	8,4 $\pm$ 0,6 ^c	8,9 $\pm$ 0,9 ^c	8,9 $\pm$ 0,6 ^c
IV	9,0 $\pm$ 0,9 ^d	9,2 $\pm$ 1,6 ^d	8,8 $\pm$ 1,1 ^d	9,0 $\pm$ 1,2 ^d	9,2 $\pm$ 0,6 ^d

^a Letras diferentes, nas linhas, representam diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos de cada grupo, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

5.1.4 Fósforo sérico

Em relação à concentração de fósforo sérico, os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos e períodos estudados ($p < 0.05$). Esses resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração sérica de fósforo em mg/dL (média $\pm$ DP) nos períodos e fases experimentais estudados

Grupos	Períodos				
	Dia -2	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	8,7 $\pm$ 1,3 ^a	7,5 $\pm$ 0,8 ^a	8,3 $\pm$ 0,5 ^a	7,3 $\pm$ 0,8 ^a	7,3 $\pm$ 0,6 ^a
II	7,5 $\pm$ 1,7 ^b	7,5 $\pm$ 1,1 ^b	7,6 $\pm$ 1,3 ^b	6,9 $\pm$ 1,1 ^b	7,3 $\pm$ 2,9 ^b
III	8,1 $\pm$ 1,4 ^c	7,9 $\pm$ 0,1 ^c	7,7 $\pm$ 0,9 ^c	7,6 $\pm$ 1,4 ^c	7,6 $\pm$ 0,8 ^c
IV	7,7 $\pm$ 1,4 ^d	7,4 $\pm$ 0,8 ^d	7,1 $\pm$ 0,9 ^d	7,4 $\pm$ 1,1 ^d	7,7 $\pm$ 0,9 ^d

^a Letras diferentes, nas linhas, representam diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos de cada grupo, pelo teste Anova (t-Student) ao nível de 5%

5.1.5 Fosfatase alcalina

Em relação a fosfatase alcalina, os grupos de ratos diabéticos (II e IV) apresentaram concentração sérica de fosfatase alcalina estatisticamente maior que grupos não-diabéticos no dia da glicemia (Dia -2) ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração sérica de fosfatase alcalina em U/dL (média±DP) nos períodos e fases experimentais estudadas

Grupos	Períodos				
	Dia -2	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	346,78±51,93 ^{aα}	237,7±39,5 ^{aδ}	268,1±60,3 ^{aξ}	236,4±58,7 ^{aγ}	427,4±132,9 ^{aφ}
II	517,4±46,39 ^{bβ}	844,6±124,5 ^{bθ}	779,9±218,6 ^{bμ}	510,5±213,5 ^{bπ}	818,2±495,1 ^{bκ}
III	330,2±92,58 ^{cα}	226,6±37,1 ^{cδ}	238,8±43,6 ^{cξ}	155,5±19,6 ^{cη}	359,7±232,4 ^{cφ}
IV	601,3±107,9 ^{dβ}	647,2±270,8 ^{dθ}	546,5±148,1 ^{dμ}	641,2±115,4 ^{dπ}	1414,9±1409,1 ^{eλ}

^{a, b, ...} Letras diferentes, nas linhas, representam diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos experimentais nos grupos, pelo teste ANOVA (Tukey) ao nível de 5%.

^α Símbolos diferentes, nas colunas, representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo teste ANOVA (Tukey) ao nível de 5 %.

O grupo diabético com doença periodontal, (IV), apresentou aumento na concentração sérica de fosfatase alcalina estatisticamente significativa que os demais grupos aos 30 dias ($p<0,05$) (Figura 1).

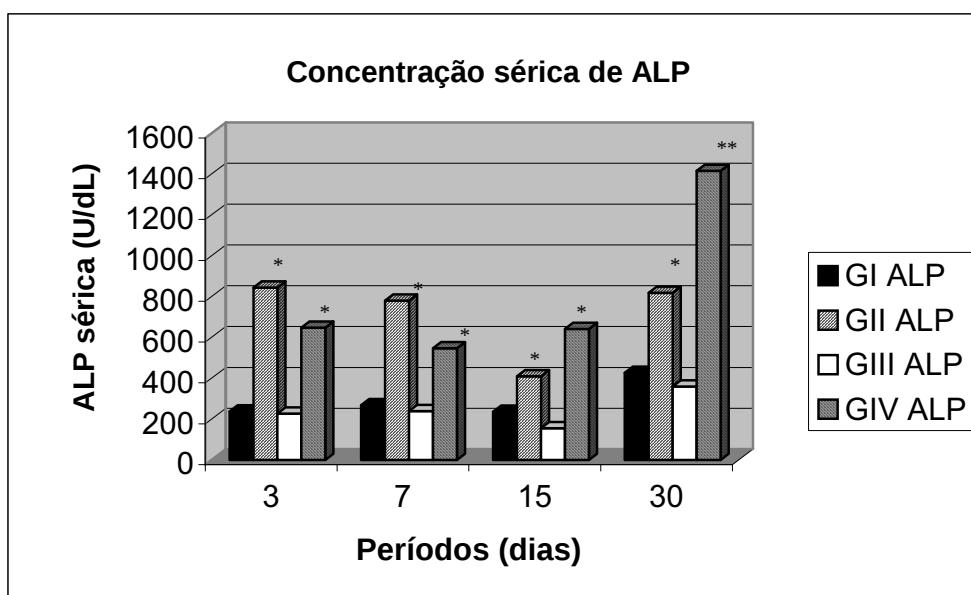


FIGURA 1 - Concentração sérica de fosfatase alcalina (ALP).

* $p<0,05$; ** $p<0,01$

5.1.6 Níveis da atividade da mieloperoxidase tecidual

A quantidade de MPO (mieloperoxidase) liberada nos tecidos gengivais nos diferentes grupos durante os períodos experimentais pode ser observada na Tabela 7. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que os grupos com doença

periodontal induzida (III e IV) apresentaram aumento nos níveis de MPO estatisticamente significativa ($p < 0,05$) se comparados com os demais grupos, em todos os períodos experimentais.

O nível de MPO liberado aos 7 dias foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos demais períodos e apresentaram maior liberação tecidual de MPO aos 30 dias, se comparados aos períodos de 3 e 15 dias. Considerando ainda esses grupos, observou-se que a liberação tecidual de MPO foi estatisticamente significativa nos grupos com periodontite induzida (III e IV) ($p < 0,01$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Média (desvio-padrão) da atividade de mieloperoxidase no tecido gengival (U/mg) durante a periodontite experimental

Grupos	Níveis de Mieloperoxidase (U/mg)			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	100±13,4 ^{aα}	1295±370,6 ^{bε}	128,9±90,9 ^{cι}	857,5±148,3 ^{dλ}
II	44,4±3,7 ^{eβ}	1704,34±551,7 ^{fϕ}	120,4±101 ^{gι}	1258,3±460 ^{hμ}
III	419,8±172,9 ^{ix}	3518,1±1365,4 ^{jγ}	1645,4±764,7 ^{kφ}	2401,7±705,6 ^{lv}
IV	541,4±184,2 ^{mδ}	3704,2±1271,8 ^{nη}	234,2±177,4 ^{οκ}	2519,9±1378,7 ^{pπ}

^{a,b,c}... Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si dentro de cada grupo, considerando os diferentes períodos experimentais, pelo teste Anova (Tukey) ao nível de 5%

^α Médias seguidas de símbolos diferentes, nas colunas, representam diferença significativa entre os grupos, em cada período, pelo teste Mann-Whitney, ao nível de 5%

5.1.7 Análise Macroscópica das alterações morfológicas

Pode-se observar que não houve diferença nas alterações da gengiva entre os grupos não-diabéticos (I) e diabéticos (II) em todos os períodos experimentais, entretanto, observou-se modificações de presença e ou ausência de papila interproximal e contorno ou posição da gengiva entre os grupos com doença periodontal (III e IV) e sem doença periodontal (I e II). Deve-se salientar que todas as ligaduras permaneceram até o final de cada período experimental.

As alterações morfológicas gengivais são exemplificadas por fotos representativas de cada grupo de animais no período experimental de 3 dias. As gengivas dos primeiros molares inferiores, nas regiões vestibular, lingual e interproximal dos animais dos grupos I e II (sem ligadura) tinham aspectos clínicos semelhantes (Figuras 2 e 3). A gengiva contornava a porção cervical dos dentes, terminando em forma afilada como borda de faca, com papilas interdentais nítidas assumindo formas triangulares. Já nos grupos III e IV (com ligadura) as gengivas da região dos primeiros molares inferiores, apresentavam-se com migração apical da margem gengival e ausência de papilas interdentais, tanto na face vestibular como na face lingual (Figuras 4 e 5).

Durante o processo de desenvolvimento da periodontite experimental nos grupos III e IV, macroscopicamente, pode-se observar a perda de inserção, caracterizada pelo afastamento entre a gengiva marginal e o dente a partir do 3º dia de colocação da ligadura, se comparado aos grupos I e II (Figuras 6 e 7). No 7º dia de permanência da ligadura, pode-se observar maior migração apical e perda do contorno da gengiva

marginal nos grupos com periodontite induzida (III e IV), se comparado aos grupos sem periodontite induzida (I e II) (Figuras 8 e 9). Essas características mostraram-se acentuadas nos períodos experimentais tardios de 15 e 30 dias. No 15º dia, observou-se exposição radicular, perda tecidual e óssea nas faces livres (Figuras 10 e 11). Enquanto que no 30º dia, observou-se perda tecidual e óssea com maior acometimento das faces livres e interdental e, em alguns casos, envolvimento da região de furca (Figuras 12 e 13).



FIGURA 2 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato não-diabético sem doença periodontal – Grupo I (3 dias).

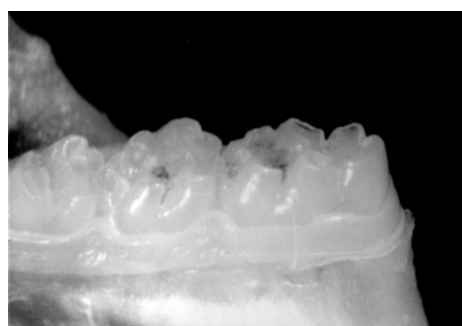


FIGURA 3 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato diabético sem doença periodontal – Grupo II (3 dias).



FIGURA 4 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato não-diabético com doença periodontal – Grupo III (3 dias).



FIGURA 5 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato diabético com doença periodontal – Grupo IV (3 dias).

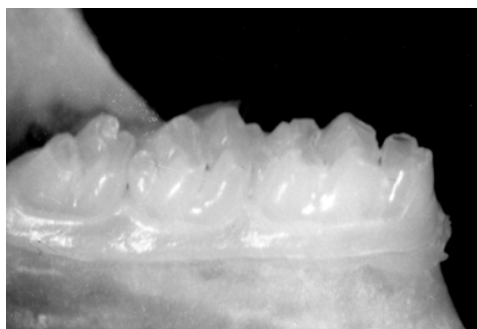


FIGURA 6 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (3 dias).

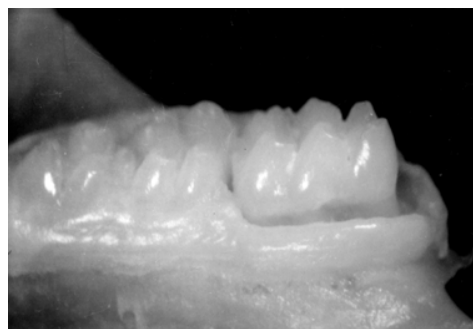


FIGURA 7 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (3 dias).



FIGURA 8 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (7 dias).

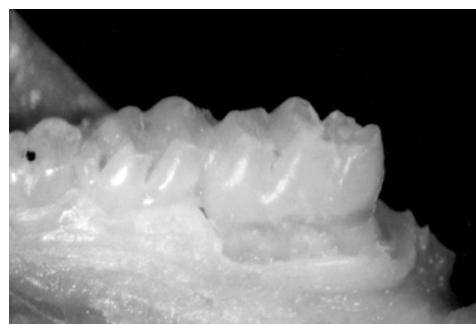


FIGURA 9 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (7 dias).

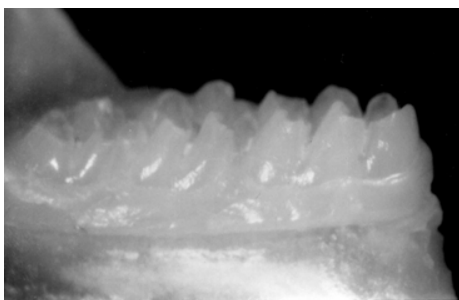


FIGURA 10 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (15 dias).

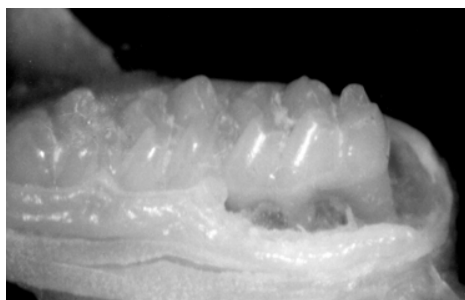


FIGURA 11 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (15 dias).

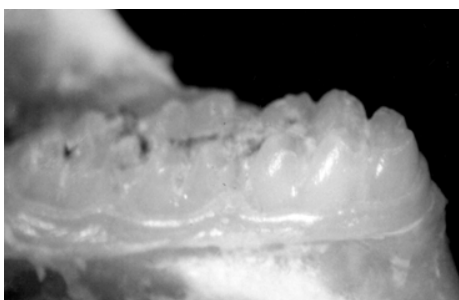


FIGURA 12 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato sem doença periodontal (30 dias).

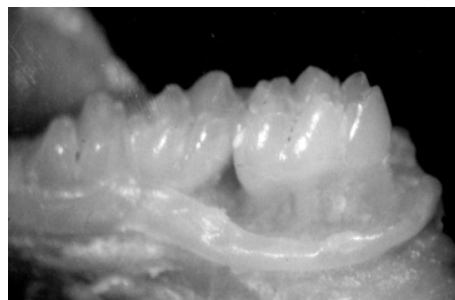


FIGURA 13 - Aspecto macroscópico de hemimandíbula de rato com doença periodontal (30 dias).

5.1.8 Perda óssea alveolar

A distância em milímetros da JCE à crista óssea dos grupos estudados obtida radiograficamente foi utilizada como indicativa da perda óssea. Pode-se dizer que nos grupos sem doença periodontal (I e II), o grupo diabético (II) apresentou maior perda óssea, medida em milímetros, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo I nos períodos tardios de 15 e 30 dias. Os grupos com doença periodontal induzida (III e IV) apresentaram maior perda óssea quando comparados aos grupos I e II, sendo significativa no 3º dia ($p < 0,05$). Além disso, observou-se que o grupo diabético com doença periodontal induzida, (IV), apresentou maior reabsorção da crista alveolar, se comparado aos demais grupos, sendo significativa no 15º e 30º dias ($p < 0,05$). Os grupos II e III apresentaram perda óssea semelhante no 7º, 15º e 30º dias (Tabela 8).

Tabela 8 - Média e desvio-padrão (DP) da perda óssea alveolar (mm) medido em análise radiográfica da distância entre JCE à crista óssea dos grupos estudados nos períodos experimentais

Groups	Perda óssea alveolar (mm)			
	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
I	1,63±0,5 ^{a α}	2,30±0,8 ^{b φ}	2,57±0,4 ^{b δ}	2,97±0,4 ^{b γ}
II	1,81±0,5 ^{c α}	2,41±1,4 ^{d φ}	3,20±0,5 ^{e ε}	3,43±0,5 ^{e η}
III	2,30±0,2 ^{f ι}	2,87±1,1 ^{g φ}	3,37±0,2 ^{g ε}	3,56±0,4 ^{g η}
IV	2,75±0,3 ^{h ι}	3,10±1,3 ^{i φ}	4,35±0,2 ^{i φ}	4,70±0,2 ^{i β}

^a Médias seguidas de letras diferentes, nas linhas, diferem entre si pelo teste Anova (Tukey) ao nível de 5%

^α Médias seguidas de símbolos iguais, nas colunas, não diferem entre si em cada período correspondente, pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5%.

5.1.9 Citocinas

Cinética da expressão de IL-6 nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental

Avaliando o padrão comportamental dos grupos em cada período experimental, os resultados demonstram que no período inicial de 3 dias da indução da periodontite experimental, o grupo diabetes com periodontite induzida (IV), apresentou significativa expressão de IL-6 se comparado aos demais grupos (I, II e III) ($p<0,01$). No 7º dia foi observada expressão de IL-6, significativamente menor no grupo II, quando comparado aos demais grupos ($p<0,05$). Enquanto que, o grupo IV apresentou expressão de IL-6 estatisticamente superior aos demais grupos ($p<0,01$). Aos 15 dias houve uma elevação dos níveis de IL-6 tecidual, sendo que os grupos I, II e III apresentaram níveis semelhantes entre si. Diferente do grupo IV, o qual apresentou significativo nível de IL-6 em relação aos demais grupos ($p<0,05$). Aos 30 dias, o grupo IV continuou apresentando significativo nível de IL-6 em relação aos demais grupos (I, II e III). Em relação ao grupo com diabetes induzida (II), pode-se observar que durante os períodos experimentais iniciais de 3 e 7 dias, estes apresentaram níveis inferiores de IL-6 quando comparados aos grupos com periodontite induzida (III e IV) e controle (I) e níveis semelhantes ao do grupo controle (I) nos períodos de 15 e 30 dias (Figura 14).

Durante a evolução da periodontite experimental (3º, 7º, 15º e 30º dia), o grupo controle (I), apresentou manutenção nos níveis de expressão de IL-6. Enquanto os grupos II, III e IV, apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da expressão de IL-6 no 30º dia do início do desenvolvimento da periodontite experimental (Figura 15).

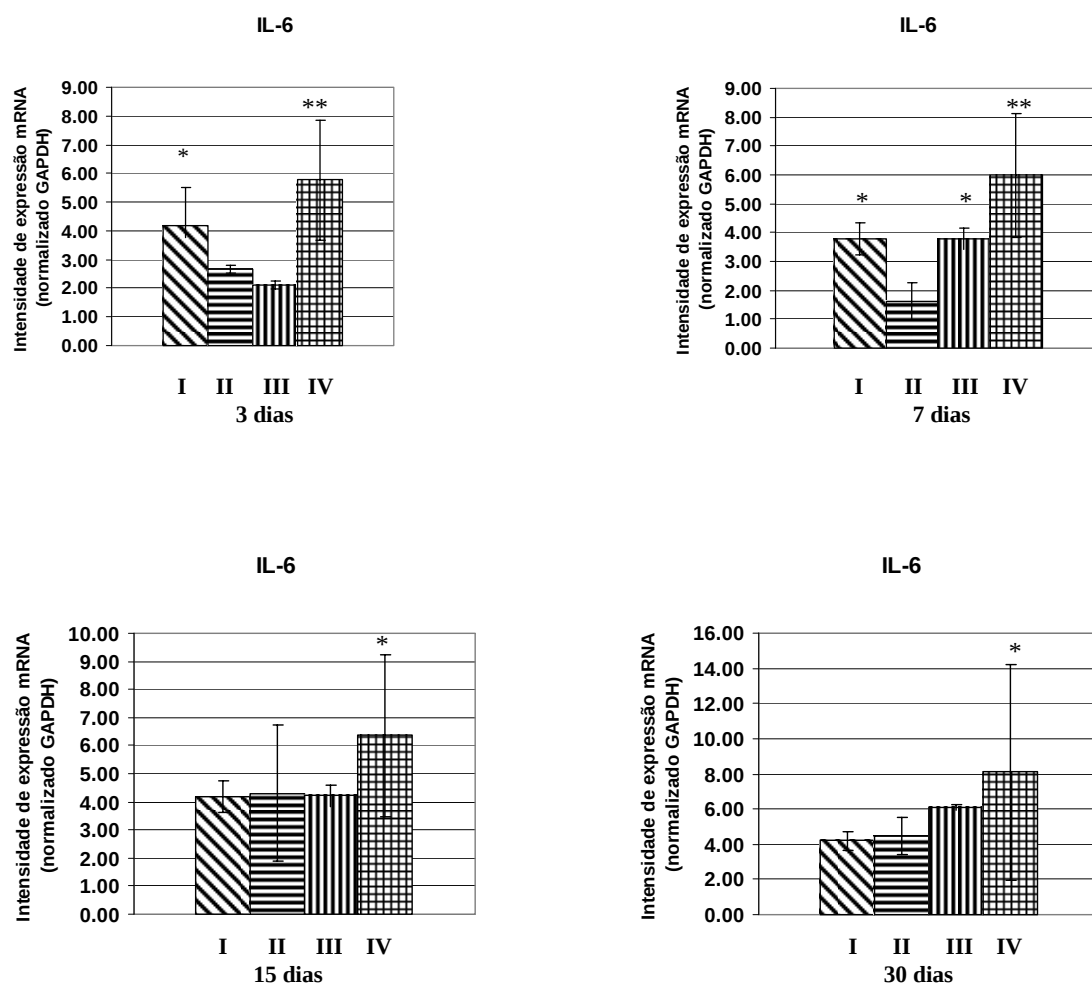


FIGURA 14 - Cinética da expressão de IL-6 nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-6 foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, representam diferença significativa entre os grupos, em cada período.

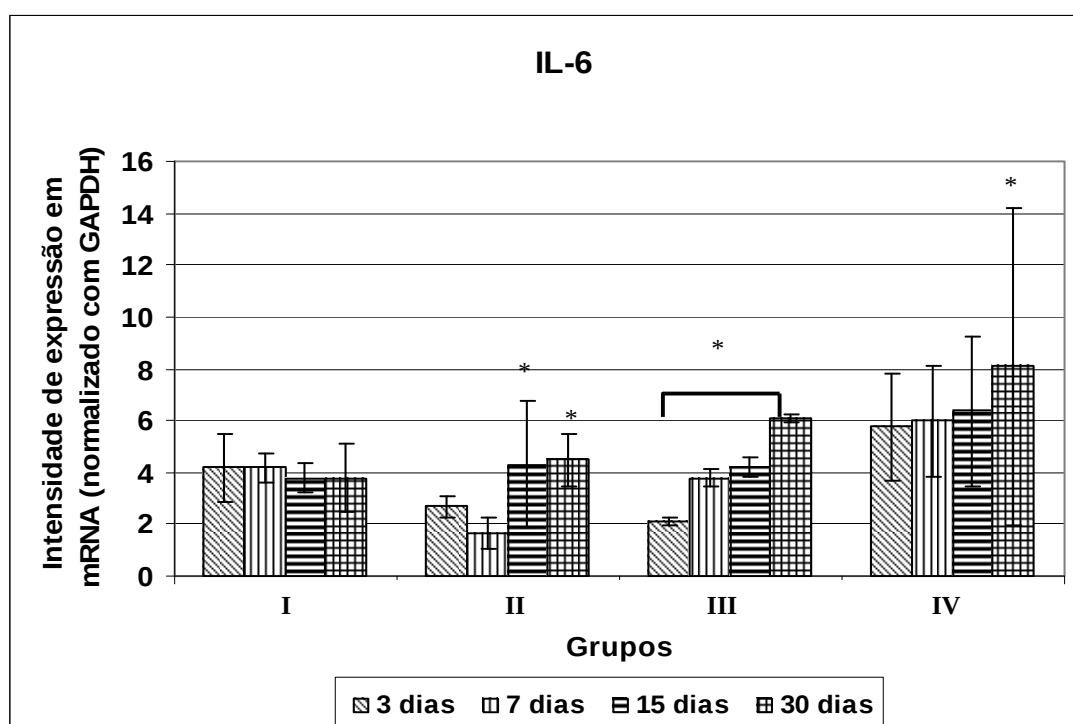


FIGURA 15 - Cinética da expressão de IL-6 nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-6 foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0.05$, representam diferença significativa entre os períodos de evolução da periodontite experimental em cada grupo.

Cinética da expressão de IL-1 β nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental

Avaliando o padrão comportamental dos grupos em cada período experimental, pode-se dizer que no período inicial de 3 dias da indução da periodontite experimental, o grupo controle (I), apresentou significativa expressão de IL-1 β se comparado aos demais grupos (II, III e IV) ($p < 0,05$). No 7º dia foi observada, significativa expressão de IL-1 β , nos grupos I, III e IV, quando comparado ao grupo com diabetes (II) que continuou com reduzida expressão de IL-1 β ($p < 0,05$). Aos 15 dias houve uma elevação dos níveis de IL-1 β tecidual, sendo que os grupos II, III e IV apresentaram níveis semelhantes, enquanto o grupo I, apresentou-se estatisticamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$). Aos 30 dias, os grupos II e III apresentaram elevação no nível de IL-1 β tecidual, entretanto, o grupo III, apresentou-se significativo se comparado ao grupo IV (Figura 16).

Durante a evolução da periodontite experimental (3º, 7º, 15º e 30º dia), o grupo controle (I), apresentou manutenção nos níveis elevados de expressão de IL-1 β . Enquanto os grupos II e III apresentaram aumento significativo da expressão de IL-1 β no 30º se comparado aos períodos iniciais (3º e 7º). O grupo IV apresentou elevação da expressão de IL-1 β no 7º dia se comparado ao 3º dia, no entanto, este nível de expressão foi mantido sem significantes alterações durante os períodos subsequentes (15 e 30 dias) (Figura 17).

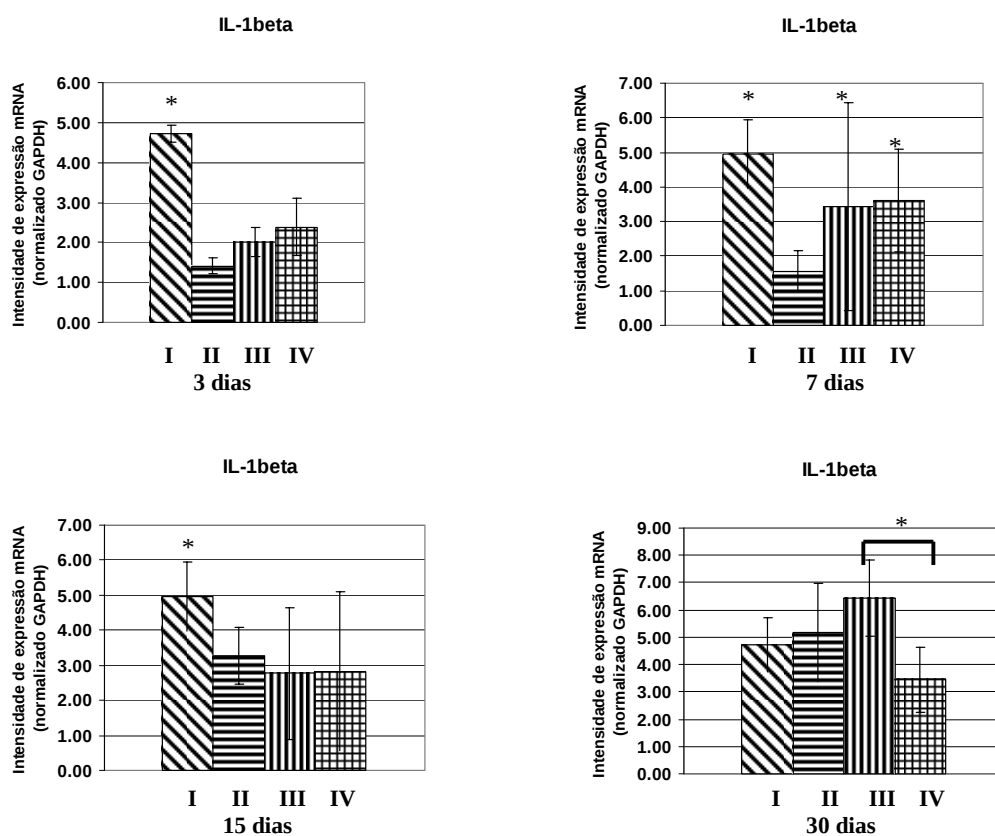


FIGURA 16 - Cinética da expressão de IL-1 beta nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 beta foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0,05$, representam diferença significativa entre os grupos, em cada período.

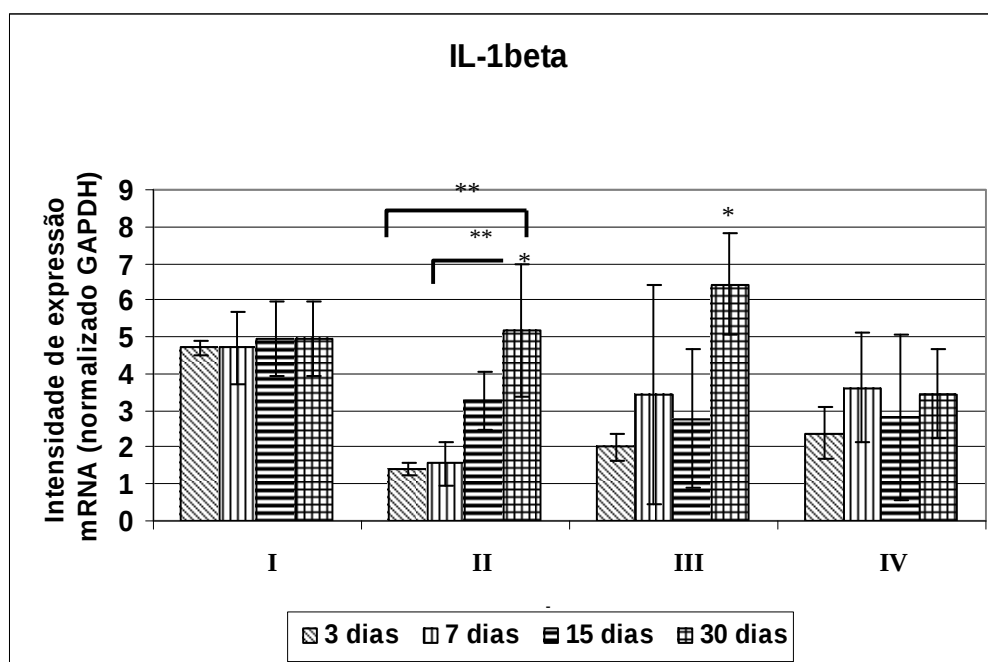


FIGURA 17 - Cinética da expressão de IL-1 beta nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-1 beta foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0.05$, representam diferença significativa entre os períodos de evolução da periodontite experimental em cada grupo.

Cinética da expressão de TNF- α nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental

Avaliando o padrão comportamental dos grupos em cada período experimental, pode-se dizer que no período inicial de 3 dias da indução da periodontite experimental, o grupo diabetes com periodontite induzida (IV), apresentou significativa expressão de TNF- α se comparado aos grupos II e III ($p<0,05$), enquanto que o grupo I (controle), apresentou significativa expressão de TNF- α se comparado a todos os grupos (II, III e IV) ($p<0,01$). No 7º dia foi observada significativa expressão de TNF- α nos grupos: controle (I) e periodontite induzida (III) ($p<0,05$). Aos 15 dias houve uma elevação dos níveis de TNF- α tecidual nos grupos II e IV, sendo que os grupos I e IV apresentaram significativa expressão de TNF- α se comparado aos demais grupos (II e III) ($p<0,05$). Aos 30 dias, o grupo I apresentou expressão de TNF- α estatisticamente significativa ($p<0,05$), se comparado aos demais grupos (II, III e IV) (Figura 18).

Durante a evolução da periodontite experimental (3º, 7º, 15º e 30º dia), o grupo controle (I), apresentou manutenção dos níveis elevados de expressão de TNF- α . Enquanto os grupos II e IV apresentaram aumento significativo da expressão de TNF- α a partir do 15º dia em relação aos outros períodos. O grupo III apresentou elevação da expressão de TNF- α no 7º dia se comparado ao 3º dia. Esta expressão sofreu redução nos períodos subsequentes (15 e 30 dias) (Figura 19).

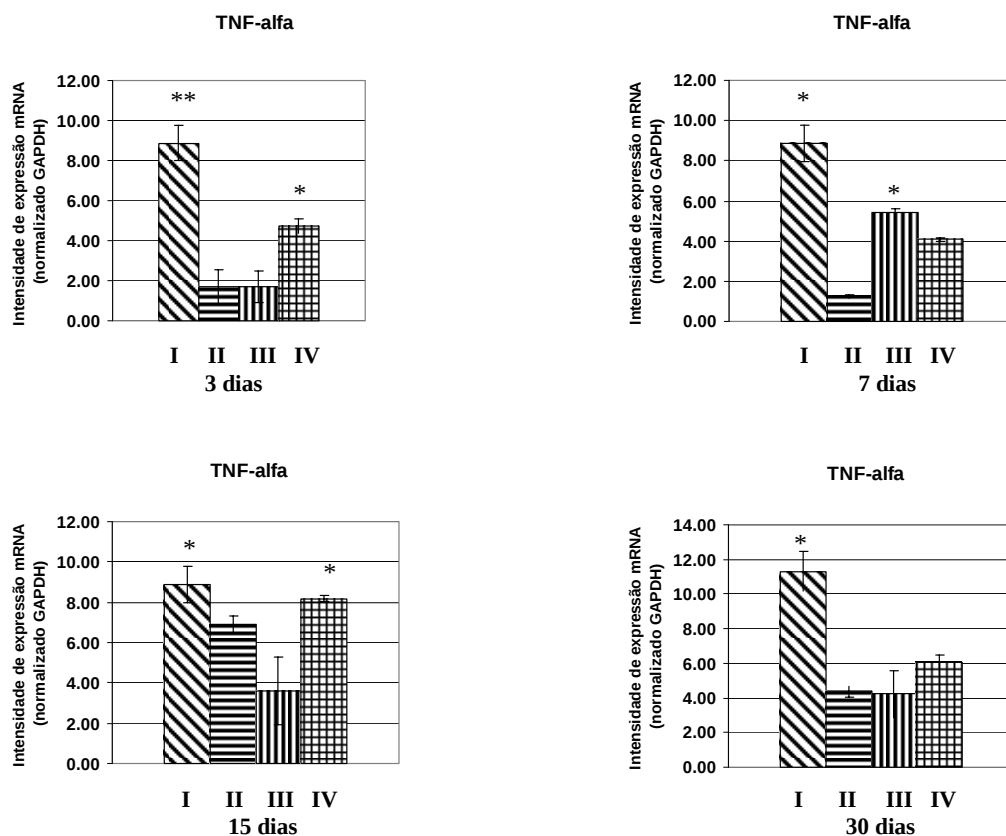


FIGURA 18 - Cinética da expressão de TNF- alfa nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de TNF- alfa foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0,05$, representam diferença significativa entre os grupos, em cada período.

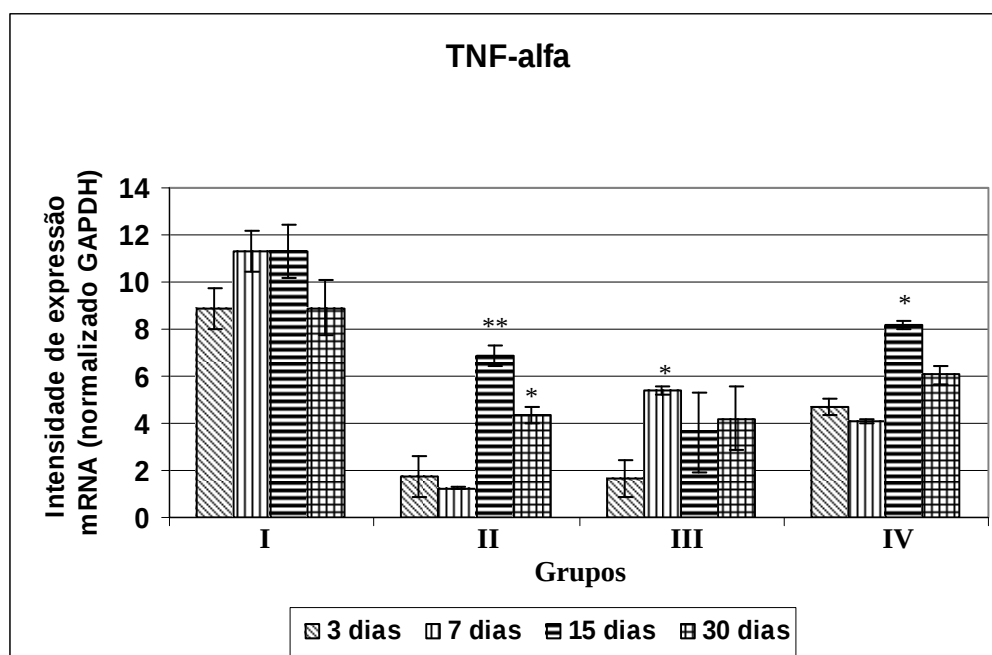


FIGURA 19 - Cinética da expressão de TNF- alfa nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de TNF- alfa foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0.05$, representam diferença significativa entre os períodos de evolução da periodontite experimental em cada grupo.

Cinética da expressão de IFN- γ nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental

Avaliando o padrão comportamental dos grupos em cada período experimental, pode-se dizer que no período inicial de 3 dias da indução da periodontite experimental, o grupo controle (I), apresentou significativa expressão de IFN- γ se comparado aos demais grupos (II, III e IV) ($p<0,05$). No 7º dia foi observada, significativa expressão de IFN- γ no grupo IV quando comparados a todos os grupos, incluindo o grupo I, que também encontrava-se elevado ($p<0,01$). Aos 15 dias os níveis de TNF- α tecidual nos grupos I e IV eram significantes aos demais grupos (II e III) ($p<0,05$). Aos 30 dias, os grupos I, III e IV apresentaram expressão de IFN- γ significativa se comparado ao grupo II ($p<0,05$) (Figura 20).

Durante a evolução da periodontite experimental (3º, 7º, 15º e 30º dia), o grupo controle (I), apresentou elevação dos níveis de expressão de IFN- γ a partir do 15º dia, mas sem diferença estatística. Os grupos II e IV apresentaram significativo aumento na expressão de IFN- γ a partir do 7º dia em relação aos outros períodos. Entretanto, no grupo II houve uma redução dos níveis nos períodos de 15 e 30 dias. Enquanto no grupo IV houve um aumento nos níveis de expressão de IFN- γ nos períodos subsequentes. O grupo III apresentou significativa expressão de IFN- γ somente aos 30 dias (Figura 21).

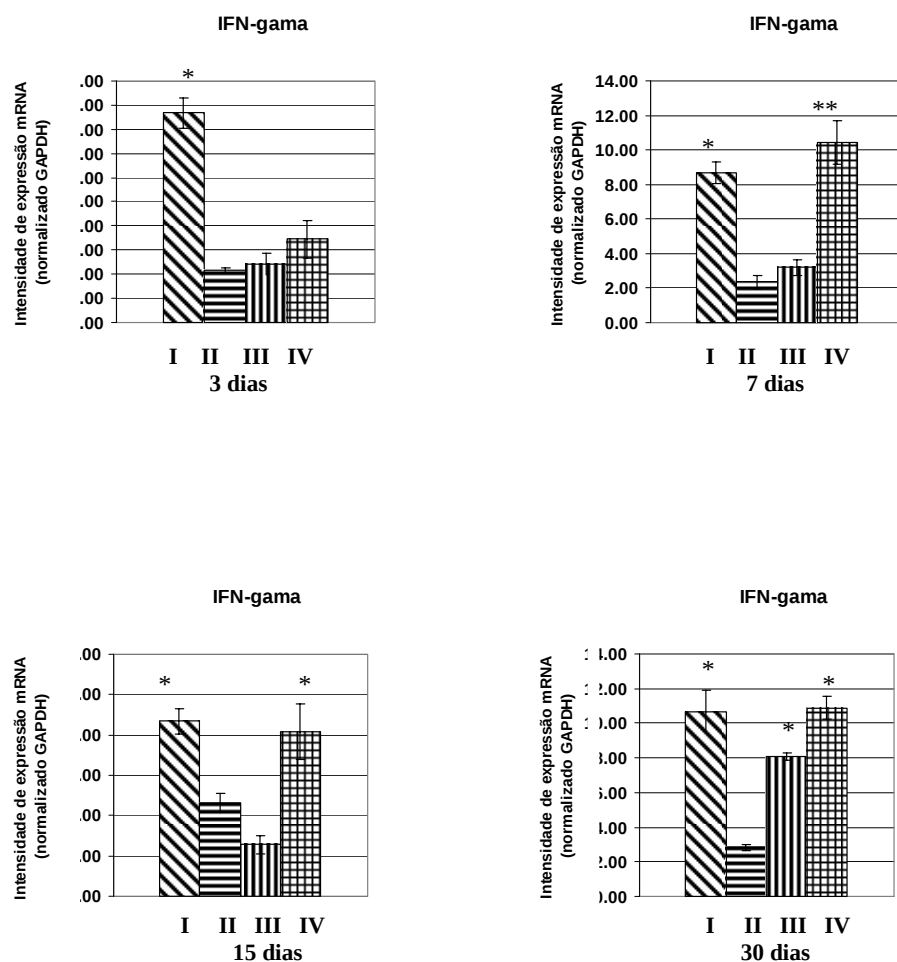


FIGURA 20 - Cinética da expressão de IFN-gama nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IFN-gama foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0,05$, representam diferença significativa entre os grupos, em cada período.

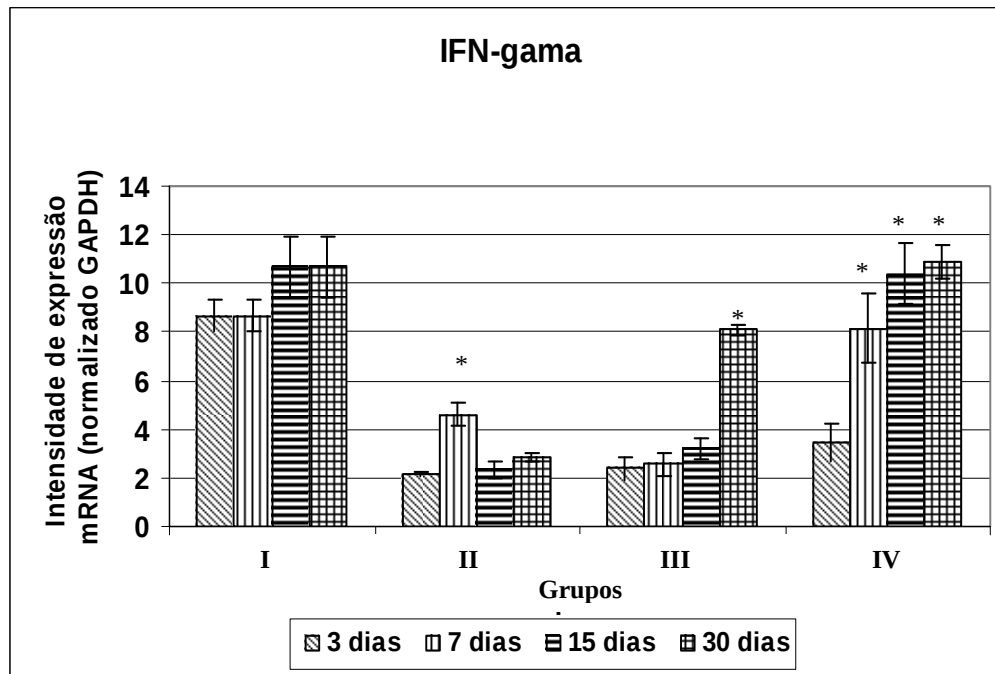


FIGURA 21 - Cinética da expressão de IFN-gama nos tecidos periodontais dos grupos em todos os períodos de evolução da periodontite experimental. Amostras de tecidos gengivais, foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IFN-gama foram analisados por Real-Time PCR. Os resultados representam os valores da média $\pm$ desvio-padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão de GAPDH, obtido de 3 animais em cada grupo e período. * $p < 0.05$, representam diferença significativa entre os períodos de evolução da periodontite experimental em cada grupo.

6 Discussão

A análise da literatura disponível, demonstra uma preocupação constante dos pesquisadores em ampliar os conhecimentos a respeito do estudo da patogênese da doença periodontal e do diabetes. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação positiva entre diabetes, prevalência e severidade da doença periodontal (Grossi, 2001; Benatti et al., 2003; Holzhausen et al., 2004).

Levando em consideração os resultados metabólicos, pode-se dizer quanto aos parâmetros peso corporal (Tabela 2) e glicemia (Tabela 3), que o experimento da indução de doença periodontal foi iniciado com adequado pareamento dos animais em todos os grupos e períodos. Desta maneira, os grupos II e IV apresentavam-se com um quadro diabético semelhante e um nível glicêmico considerado de diabetes severo. Além disso, pode-se dizer que todos os ratos com diabetes induzido mantiveram esta condição até o final do experimento, independente do grupo ou período analisado.

Para a indução do diabetes foi utilizado a droga estreptozotocina. Antibiótico este, capaz de promover destruição seletiva das células β do pâncreas e conseqüente diminuição da secreção de insulina, ocasionando assim, um acúmulo de glicose no sangue (Pepato et al., 1996; 2002), fato este que justifica a metodologia empregada.

Segundo alguns autores (Hough et al., 1981; Lassila, Virtanen, 1989) um dos efeitos do diabetes induzido por estreptozotocina é a perda de peso corporal. Fato este que possivelmente pode explicar o equilíbrio de peso corporal e estatisticamente não significativo dos grupos diabéticos (II e IV) nos períodos experimentais de 3, 7, e 15 dias, independente da presença da doença periodontal (Tabela 2). Os resultados

do presente estudo não concordam com os resultados obtidos no estudo de Mishima et al. (2002) no qual ao comparar os pesos corporais entre os grupos de ratos diabéticos e não-diabéticos, em um período experimental de 24 dias, observaram uma perda de peso nos animais diabéticos enquanto nos não-diabéticos, houve um ganho de peso.

Outro fator que possivelmente pode ter afetado o peso corporal dos animais diabéticos foi a hiperglicemia, que apresentou variação entre 321,7 e 1166mg/dL de soro durante o experimento (Tabela 3), sendo considerado diabetes severo acima de 280mg/dL. Evidências suportam a idéia de que a hiperglicemia é um dos possíveis fatores responsáveis pelo desencadeamento das complicações diabéticas, como por exemplo, a perda de peso (Lalla et al., 2000).

O modelo experimental de doença periodontal associado ao diabetes tem sido foco de estudos em animais com intuito de elucidar o efeito do diabetes sobre o periodonto (Doxey et al., 1998; Lalla et al., 2000). Tal fato justifica o interesse do presente estudo em conhecer alguns parâmetros fisiológicos e metabólicos e seus padrões comportamentais em ratos diabéticos com doença periodontal induzida.

Muitos distúrbios endocrinológicos como, por exemplo, o diabetes apresentam como determinantes bioquímicos de alterações metabólicas e ósseas, a análise sérica de cálcio, fósforo e atividade da fosfatase alcalina (Lassila, Virtanen, 1989).

Os resultados do presente trabalho mostraram níveis séricos de cálcio similares entre os grupos estudados em todos os períodos (Tabela 4), e estão de acordo com os estudos de Lassila, Virtanen (1989), que em suas investigações bioquímicas, observaram que os valores séricos de cálcio entre os grupos diabéticos e não-diabéticos estudados, eram semelhantes. Entretanto, diferem dos achados de

Hough et al. (1981) e, Pepato et al. (2002) que relataram que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina exibem hipercalcemia, hiperfosfatemia, hipercalcúria e fosfatúria. Entretanto, no presente estudo, não foi realizada coleta de urina para análise da concentração de íons na mesma.

Além disso, tais íons (cálcio e fósforo) apresentam-se associados ao metabolismo ósseo, participando do processo de mineralização (Arana, Katchburian, 1999).

Acredita-se que em situações fisiológicas normais, a formação óssea e a progressão de reabsorção estão em equilíbrio, reguladas de modo que, a reabsorção óssea pelos osteoclastos precede uma nova formação óssea por osteoblastos (Cueto-Manzano et al., 1999). A presença do diabetes, entretanto, induz a um desequilíbrio neste dinâmico ciclo de remodelação, com a reabsorção excedendo a formação óssea.

A similaridade de resultado entre os grupos e períodos também foi observada em relação aos níveis séricos de fósforo (Tabela 5), os quais apresentaram-se semelhantes independente da presença do diabetes, da presença de doença periodontal ou até mesmo do tempo de evolução da mesma. Dessa forma, tais resultados podem ser hipoteticamente explicados por aumento da excreção urinária de cálcio e fósforo geralmente encontrada nos animais diabéticos, apesar de não ter sido realizado esta análise no presente estudo. Um possível comprometimento do fígado pode também participar do processo, uma vez que em condições fisiológicas, este mineral é excretado por este órgão que apresenta suas funções metabólicas alteradas pelo diabetes (Lalla et al., 2000).

A fosfatase alcalina (ALP) é caracterizada como um marcador de fenótipos de osteoblastos, contribuindo assim para formação óssea no processo de

remodelação, sendo excretada na fase de maturação dos osteoblastos (Wong et al., 1999). Como no diabetes o “turn-over” ósseo está desequilibrado, ocorre maior reabsorção óssea. Pode-se dizer que o estímulo para migração osteoblástica continua, sugerindo a elevada taxa de ALP sérica expressa nesses animais diabéticos com doença periodontal induzida (Owen et al., 1998).

A atividade sérica de ALP encontrada neste estudo (Tabela 6 e Figura 1) é condizente com achados da literatura como no estudo de Gonzalez, Fevery (1992), no qual os autores afirmam ocorrer uma elevação sérica da enzima (ALP) em ratas com 2 semanas de diabetes. Nos estudos de Koyama et al. (1998), o aumento sérico de ALP também foi observado em ratos diabéticos, induzido tanto pela estreptozotocina como por aloxana.

Alguns autores (Nishimura et al., 1998; Salvi et al., 1998; Lalla et al., 2000) acreditam que no diabetes além do defeito na função e quimiotaxia dos leucócitos (PMNs) e da alteração de síntese e metabolismo do colágeno, a destruição periodontal pode ser explicada como resultado indireto do estado hiperglicêmico (Lalla et al., 2000), que pode afetar a resistência do hospedeiro frente ao biofilme.

Autores como Holzhausen et al. (2004) utilizaram a medição da atividade de mieloperoxidase (MPO) como parâmetro inflamatório da migração de granulócitos nos tecidos. No presente estudo pode-se observar um pico de elevação de atividade de mieloperoxidase aos 7 dias após colocação da ligadura nos grupos com doença periodontal induzida (III e IV), independente da presença do diabetes (Tabela 7). Este fato pode ser explicado devido aos neutrófilos constituírem as células representativas da primeira linha de defesa do organismo frente a estímulos inflamatórios. Além disso no estudo de Dennison, Van Dyke (1997) os autores relatam que a MPO e PGE_2 representam a resposta inflamatória aguda do hospedeiro, e sugerem a participação

das mesmas no desequilíbrio do metabolismo ósseo. Quando os neutrófilos migram para os sítios inflamados, são liberados componentes celulares e enzimas que atuam nos tecidos adjacentes sobre outras células e microrganismos na tentativa de controlar a inflamação (Bradley et al., 1982). A mieloperoxidase (MPO) é uma dessas enzimas liberadas principalmente pelos neutrófilos que tem demonstrado propriedades antimicrobianas e citotóxicas, bem como habilidade de inativar fatores quimiotáticos que podem limitar a migração de neutrófilos (Klebanoff, 1968). Este fato pode explicar a diminuição da quantidade de neutrófilos após os períodos iniciais da inflamação e conseqüente migração de outras células de defesa como monócitos e macrófagos (Bradley et al., 1982).

Nos períodos tardios (15 e 30 dias), os níveis teciduais de MPO apresentaram um aumento progressivo que pode ser explicado pela crescente migração de monócitos e macrófagos, que apresentam considerável atividade de peroxidases (Bradley et al., 1982). Entretanto, no grupo diabético com doença periodontal induzida (IV), observa-se menor expressão de MPO, provavelmente pelo fato de apresentar alteração na síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias devido possivelmente, ao acúmulo de AGEs, à falhas no processo de ativação das células Th1 e Th2 e conseqüente, deficiência na interação entre células T e monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, fato este, ainda não esclarecido.

Além da atuação das peroxidases, o infiltrado neutrofilico pode desencadear a liberação de numerosos mediadores inflamatórios incluindo citocinas e prostaglandinas que além de perpetuarem a inflamação, promovem um desequilíbrio no metabolismo ósseo, estimulando a liberação de osteoclastos (Dennison, Van Dyke, 1997) o que pode justificar a presença de reabsorção óssea, vista radiograficamente, nos grupos com periodontite induzida (III e IV) (Tabela 8).

No presente estudo, o modelo de doença periodontal induzida desenvolvido por meio da técnica de colocação de ligadura ao redor do dente foi utilizado devido à facilidade de realização, padronização da técnica e maior confiabilidade no desenvolvimento da doença periodontal (Johnson, 1975; Nassar et al., 2003; 2004). Este modelo de indução de doença periodontal é caracterizado por um acúmulo progressivo de biofilme bacteriano na ligadura e conseqüente aumento do infiltrado inflamatório, ocasionando assim, destruição dos tecidos periodontais (tecido conjuntivo e ósseo).

O desenvolvimento da periodontite experimental foi confirmado pela presença de perda óssea, vista radiograficamente no grupo com doença periodontal induzida (III e IV) (Tabela 8). Nossos resultados podem ser confirmados pelos estudos de outros autores (Nassar et al., 2003; 2004) que observaram perda óssea alveolar nos grupos com doença periodontal induzida, sendo maior aos 30 dias.

A análise radiográfica demonstrou perda óssea semelhante entre os grupos diabético sem doença periodontal (II) e não-diabético com doença periodontal (III) em todos os períodos estudados (Tabela 8). Esses resultados estão de acordo Hough et al., 1981; Goodman, Hori, 1984; Mishima et al., 2002 que sugerem que a própria indução do diabetes além de causar alterações ósseas, pode promover uma redução no número de osteoblastos, levando ao comprometimento do metabolismo ósseo, reduzindo ou até impedindo uma neoformação óssea.

Mishima et al. (2002), observaram histomorfometricamente que a indução do diabetes por estreptozotocina leva a uma redução nos níveis de formação óssea, sugerindo redução do metabolismo ósseo. Os autores ainda relataram que após tratamento com insulina, os ratos diabéticos apresentaram normalização das medições do “turn-over” do osso alveolar. Segundo Wilson, Kornman, 1996, é estabelecido que

nem todo acúmulo de biofilme leva ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal, pois é conhecido cientificamente, que outros fatores apresentam um importante papel na maior susceptibilidade de alguns indivíduos à doença periodontal, justificando assim a perda óssea no grupo de ratos diabéticos com doença periodontal (IV).

O conhecimento e entendimento da resposta do hospedeiro no processo inflamatório da doença periodontal se mostram importante, tanto nos processos biológicos básicos, quanto na aplicabilidade clínica, aprimorando o diagnóstico, fatores desencadeantes e/ ou agravantes e possíveis opções de tratamento das doenças periodontais inflamatórias.

Em um estudo com ratos de 5 semanas de vida, Klausen (1991) demonstrou que estes apresentavam todos os molares erupcionados e esses dentes sofriam com a idade, erupção passiva e contínua remodelação do osso alveolar. Desse modo, a distância entre a junção cimento-esmalte (J.C.E.) e a crista óssea alveolar pode apresentar um aumento fisiológico dependente da idade. Tal fato pode justificar a presença de perda óssea observada radiograficamente no grupo controle (I), visto que os animais utilizados no presente estudo possuíam tempo de vida semelhante.

Apesar do sucesso da indução de doença periodontal por ligadura, este modelo experimental ainda é questionado. Nyman et al. (1979), sugerem que a colocação de ligadura leva invariavelmente a uma injúria traumática e, que apenas secundariamente, atua como fator retentivo de biofilme bacteriano. Dessa forma, explicaria os resultados macroscópicos obtidos no presente estudo, no 3º dia de colocação da ligadura, onde observou-se alteração tecidual caracterizada por afastamento da gengiva marginal do dente (Figura 7). Esses resultados podem ser

confirmados por outros autores (Sallay et al., 1982), que avaliando a destruição periodontal decorrente da colocação de ligadura juntamente com a administração de antibióticos e clorexidina para o controle do biofilme bacteriano, observaram inibição da perda óssea alveolar, demonstrando o caráter infeccioso da periodontite experimental.

Ainda assim, os resultados macroscópicos apresentados no presente estudo, sugerem que a colocação da ligadura ao redor do dente do animal provocou alterações significantes nas características macroscópicas da gengiva, independente do estado diabético (Figuras 4 e 5). Os achados do presente estudo concordam com o estudo de Holzhausen et al. (2002), no qual os autores afirmaram que no desenvolvimento da doença periodontal inflamatória induzida, o acúmulo de biofilme nas superfícies dentais próximas à gengiva, é a causa direta da inflamação periodontal. Entretanto, no presente estudo, o acúmulo de biofilme bacteriano não foi avaliado quantitativa e nem qualitativamente. Dessa forma, a severidade da destruição tecidual observada macroscopicamente (Figuras 11 e 13) nos períodos tardios dos grupos com doença periodontal induzida (III e IV) pode ser causada pelo contínuo estímulo infeccioso.

A alta susceptibilidade do diabetes à infecções pode estar relacionada aos mecanismos de defesa deste tipo de hospedeiro, que é reconhecidamente deficiente. Segundo Nassar et al., 2006; Ishikawa, 2007, demonstraram que a atividade biológica de uma variedade de citocinas pode afetar diretamente a destruição periodontal em indivíduos diabéticos, entretanto, os mecanismos ainda não são totalmente conhecidos.

Em pacientes diabéticos a progressão da periodontite severa com perda das estruturas de suporte tem sido observada com frequência. Numerosos fatores tem

sido associados a essa massiva destruição incluindo, defeito na função e quimiotaxia dos PMNs, alteração no metabolismo do colágeno e estimulada secreção de mediadores inflamatórios e destrutivos como as citocinas, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e PGE₂, em resposta a um estímulo de endotoxina bacteriana (Lalla et al., 1998; Nishimura et al., 1998; American Academy of Periodontology, 2000; Salvi et al., 1998).

Sjöström et al. (2000) demonstraram que a patogênese da doença periodontal é mediada pela liberação local de citocinas inflamatórias, como IL-1 e IL-6, dentre outras substâncias capazes de estimular a reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo*. Recentemente outros autores (Lin et al., 2005) mostraram que a produção de IL-6 está positivamente correlacionada com a severidade da doença periodontal, sugerindo sua participação na modulação da cascata inflamatória da periodontite crônica. Takahashi et al. (1994) demonstraram um aumento notável, nos níveis de IL-6 em cultura de fibroblastos e macrófagos e sugeriu existir forte associação entre a presença de IL-6, inflamação periodontal e perda óssea alveolar. Salvi et al. (1998) demonstraram que a alta concentração de AGEs (produtos finais da glicosilação) estimulam a migração e imobilização de macrófagos nas áreas inflamadas, levando a maior liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α). Sugerindo uma alteração na capacidade dos macrófagos de realizar uma renovação tecidual normal. Esses achados podem justificar os resultados apresentados no presente estudo, onde a expressão de IL-6 nas biópsias gengivais dos animais submetidos à indução de periodontite experimental, encontravam-se elevadas nos períodos tardios de indução da doença (15º e 30º) e exacerbadas no grupo (IV). Confirmando uma possível associação dos achados gênicos com significativa perda tecidual e óssea.

Nos estudos de Araya et al. (2003) comparando os níveis de IL-6 secretados por monócitos do sangue após estímulo com LPS, os autores observaram

expressão significativa de IL-6 nas culturas dos pacientes diabéticos, independente da presença de periodontite. Sugerindo que a elevada expressão de IL-6 observada em pacientes com diabetes, pode ser hipoteticamente explicada pelo próprio processo auto-imune do diabetes tipo 1. Este relato é questionável visto que é uma hipótese contrária aos estudos de Pickup et al. (2000), os quais apresentaram resultados relacionando o diabetes com baixos níveis de IL-6. Reforçando ainda esta idéia, pode-se sugerir no presente estudo, que os elevados níveis de expressão de IL-6 estavam associados à presença do processo inflamatório e destrutivo da periodontite e não à alteração sistêmica ocasionada pelo diabetes induzido por streptozotocina. No presente estudo, nos grupos com diabetes induzido foi observado uma menor expressão nos níveis de IL-6.

Duarte et al. (2007) observaram em estudo com pacientes portadores de diabetes tipo 1 e doença periodontal crônica, baixos níveis tecidual e no fluido gengival de IL-1 β . Os autores sugerem que a modulação da doença periodontal associada ao diabetes, provavelmente não envolve IL-1 β . No presente estudo os resultados apresentados estão de acordo com o autor, já que os níveis de mRNA para IL-1 β foram encontrados em níveis baixos nos animais com diabetes e periodontite induzida (grupo IV), se comparado aos animais dos demais grupos (I, II e III), principalmente nos períodos de perpetuação da periodontite experimental (15° e 30°) (Figura 17).

No estudo de Iacopino (2001) foi observado uma elevada expressão sérica e no fluido gengival de TNF- α em pacientes com periodontite. Resultados similares foram encontrados em pacientes com diabetes do tipo 1 e periodontite, nos quais a concentração sérica de TNF- α foi aproximadamente 3 vezes maior que no grupo controle, enquanto, pacientes com diabetes sem periodontite, apresentavam depressão dos valores de TNF- α em comparação com o controle (Araya et al., 2003).

Estes resultados estão em concordância com os achados do presente estudo, no qual os grupos com diabetes (II) apresentaram expressão de TNF- α estatisticamente menor que o grupo controle (I). A expressão tecidual encontrada no grupo de animais diabéticos (II e IV), apresentou aumento significativo a partir do 15º dia de indução da periodontite se comparado aos períodos iniciais. Tal fato pode ser hipoteticamente justificado pela perpetuação do estímulo inflamatório, no caso do grupo II, o diabetes e no grupo IV a ligadura. Reforçando essa idéia, Nishimura et al. (2006) destaca o aumento da produção e liberação de TNF- α na presença de LPS. Enquanto, Iwamoto et al (2001) relata que a infecção periodontal pode ser capaz de afetar o diabetes, visto que o TNF- α parece ter importante papel na indução de resistência à insulina.

No estudo clínico de Duarte et al. (2007), os níveis de mRNA de IFN- γ em sítios acometidos com doença periodontal de pacientes com diabetes e sem diabetes encontravam-se elevados (0,57 e 0,46 mRNA/ GAPDH, respectivamente), sendo significantes se comparados aos níveis de mRNA encontrados nos pacientes sem diabetes e sem periodontite (0,20 mRNA/ GAPDH). Duarte et al. 2007; Wang et al., 2003; Mogi et al., 2004 sugerem ainda que a elevada concentração da citocina pró-inflamatória IFN- γ está associada à presença de periodontite destrutiva. Estando em concordância com os resultados do presente estudo, nos quais os grupos com periodontite (III e IV) apresentaram significativo nível de expressão de IFN- γ no período de 30 dias após colocação de ligadura. É importante ressaltar, que o grupo de diabetes com periodontite (IV) apresentou a partir do 7º dia, significativa expressão de IFN- γ se comparado ao 3º dia.

Apesar de alguns estudos clínicos (Ebersole, Taubman, 1994) encontrarem elevada expressão tecidual de mRNA de IFN- γ , associada a doença

periodontal, outros autores (Gomes et al., 2006) encontraram falha na produção de IFN- γ em pacientes com doença periodontal crônica moderada. Sigusch et al., (1998) sugerem que a falha na secreção desta citocina, é devida a supressão da resposta Th1 na doença periodontal crônica moderada. Entretanto, em pacientes com doença periodontal crônica severa os níveis de mRNA encontraram-se exacerbados, possivelmente devido a resposta Th1 (Gomes et al., 2006).

Diferenças com relação à composição da microbiota periodontal relacionada à doença, época de estabelecimento, severidade e progressão da doença, além das características inerentes à resposta do indivíduo, influenciadas por seu background genético e condições sistêmicas, tornam o estudo da etiologia e imunopatogênese das doenças periodontais um enorme e intrincado quebra cabeça, do qual muitas peças permanecem desconhecidas. Para que se possa estabelecer uma relação da causa e efeito entre, por exemplo, a presença de uma quimiocina e a polarização da resposta imune local, ou de sua influência direta na patogênese da doença, é necessário que tais variáveis sejam controladas ou restringidas.

Dessa forma, mecanismos de controle da expressão de citocinas e de seus efeitos biológicos têm gerado grande interesse recentemente não apenas pela elucidação do mecanismo de regulação da expressão gênica, mas também em virtude das possibilidades de utilização das proteínas envolvidas como potenciais alvos para a modulação terapêutica desta expressão. Sugerindo que várias linhas de estudos deveriam ser conduzidas com intuito de elucidar a patogênese da doença periodontal isoladamente e em associação com alterações sistêmicas, como o Diabetes mellitus.

7 Conclusão

Baseado nos resultados obtidos e dentro das condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que o diabetes levou a:

- 1- Ausência de alteração dos níveis séricos de cálcio e fósforo;
- 2- Aumento na concentração sérica de fosfatase alcalina (ALP);
- 3- Aumento na atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) quando associado à periodontite induzida;
- 4- Ausência de alteração morfológica;
- 5- Maior perda óssea quando associado à periodontite induzida;
- 6- Menor expressão de IL-1 β durante todo período experimental;
- 7- Expressão elevada de TNF- α no 15º dia de periodontite experimental;
- 8- Maior expressão de IL-6 e IFN- γ quando associado à periodontite experimental;
- 9- Resposta predominante Th2, com intensa expressão de citocinas pró-inflamatórias e do tipo Th1 durante a periodontite experimental.

8 Referências*

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996; 31:787-93.

American Academy of Periodontology. Diabetes and periodontal diseases: position paper. *J Periodontol*. 1996; 67:166-76.

American Academy of Periodontology. Committee on Research, Science and Therapy. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2000;71:664-78,

Arana V, Katchburian E. *Histologia e embriologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Araya AV, Pavez V, Perez C, Gonzalez F, Colombo A, Aguirre A, et al. Ex vivo lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE2 secretion in whole blood from Type 1 diabetes mellitus patients with or without aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw*. 2003;14:128-33.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect*. 2000;2:1181-92.

Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontal Res*. 2003;38:351-3.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bergmeyer HU, Bernt E. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York: Academic Press; 1974;3:1205-15.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol. 2001;2:907-16.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev. 2000;173:17-26.

Bowers GN, McComb RB. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. Clin Chem. 1975;21:1928-95.

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

Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor – α . Nature. 1989;337:661-3.

Buchmann R, Hasilik A, Van Dyke TE, Lange DE. Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. J Dent Res. 2002; 81:716-21.

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

Crawford JM, Cotran RS. Pâncreas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.809-33.

Cueto-Manzano AM, Konel S, Hutchison AJ, Crowley V, France MW, Freemont AJ, et al. Bone loss in long-term renal transplantation; histopathology and densitometry analysis. *Kidney Int.* 1999;55:2021-9.

Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol.* 2002; 73:392-400.

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2907-10.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:12-32.

Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000. 1997;14:54-78.

Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. *J Periodontol.* 1998;69:113-9.

Doxey DL, Ng MC, Dill RE, Iacopino AM. Platelet-derived growth factor levels in wounds of diabetic rats. *Life Sci.* 1995;57:1111-23.

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

Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:112-41.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, et al. Circulation interleukin-6 levels, blood pressure and insulin resistance in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1154-9.

Garlet GP. Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina da USP; 2004.

Gemmel E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol*. 1994;94:28-38.

Gemmel E, Seymour GJ. Regulação immune dos perfis de citocinas Th1/ Th2 na doença periodontal. *Periodontol* 2000. 2006;10:21-41.

Gomes MAB, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, Buso AM, Silva AG, Favoreto Junior S, et al. Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon γ and tumor necrosis factor α in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2006;41:177-83.

Gonzales J, Fevery J. Spontaneous diabetic biobreeding rats and impairment of bile acid-dependent bile flow and increased biliary bilirubin, calcium and lipid secretion. *Hepatology*. 1992;16:426-32.

Goodman WG, Hori M. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes*. 1984;33:825-31.

Goodner CJ, Russel JA. Pancreas. In: Ruch TC, Patton HD. Physiology and biophysics. 19th ed. Philadelphia: W. B. Saunders;1965. p. 1109-20.

Gorska R, Greorek H, kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2003;30:1046-52.

Grandini SA. The effect of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction: histologic study in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1978;45:190-9.

Grossi SC. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evident and need for future research. Ann Periodontol. 2001;6:138-45.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994;5:78-111.

Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2005;40:208-11.

Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulina therapy on alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res. 2004;39:188-93.

Holzhausen M, Rossa JR C, Marcantonio JR E, Nassar PO, Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontol. 2002;73:1030-6.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-15.

Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Teitelbaum SL. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. *Endocrinology*, 1981;108:2228-34.

Iacopino AM. Diabetic periodontitis: Possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995;1:214-29.

Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol.* 2001;6:125-37.

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

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

Iwasaki Y, Hara Y, Koji T, Shibata Y, Nakane PK, Kato I. Differential expression of IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-1 β mRNAs in decalcified tissue sections of mouse lipopolysaccharide-induced periodontitis mandibles assessed by in situ hybridization. *Histochem Cell Biol.* 1998;109:339-47.

Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 2001;22:450-7.

Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontum of the rat. J Periodontal Res. 1975;10:332-45.

Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th-1mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. J Immunol. 2000;164:2102-9.

Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Dis. 2001;7:2-10.

Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. J Periodontal Res.2000;35:194-200.

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. J Periodontol. 1991;62:59-73.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J Bacteriol. 1968;95:2131-8.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor- α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med. 2000;191:275-86.

Koka S, Reinhardt RA. Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary culture human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: Implications for oral health disease. J. Prosthet Dent. 1997;77:191-6.

Komatsu T, Kubota E, Sakai N. Enhancement of matrix metalloproteinase (MMP) –2 activity in gingival tissue and culture fibroblasts from Down's syndrome patients. *Oral Dis.* 2001;7:47-55.

Koyama I, Yakushijin M, Nakajima T, Hokari S, Kawai S, Oh-ke K, et al. Reduced alkaline phosphatase activity in diabetic rat bone: a re-evaluation. *Comp Biochem Physiol.* 1998;121:417-23.

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

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. Review. *Ann Periodontol.* 2001;6:113-8.

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

Lassila V, Virtanen P. Impact of streptozotocin-induced diabetes on rat blood and alveolar bone affected by occlusal stress. *Scand J Dent Res.* 1989;97:216-21.

Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine.* 2005;30:160-7.

Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. Clin Oral Implants Res. 2004;15:546-52.

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

McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling, principles and implications for diagnosis and therapy. J Periodontol. 2002;73:1377-91.

McMillan MD. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats. Part I: Macroscopic observations. N Z Dent J. 1970;66:239-47.

Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin-dependent diabetes. J Periodontol. 1992;63:274-9.

Mattar-Mori D, Baviera AM, de Oliveira Ramalho LT, Vendramini RC, Brunetti IL, Pepato MT. Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. Biotechnol Appl Biochem. 2003;38:1-9.

Mealey BM. Diabetes and periodontal disease, J Periodontol. 1999;70:935-49.

Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. Arch of Oral Biol. 2002;47:843-9.

Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM. The receptor for advanced endproducts (RAGE) mediates the interaction of AGE- β 2-microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway: implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest*. 1996;98:1088-94.

Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83:166-9.

Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*. 2007;148:119-26.

Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Review. *Adv Immunol*. 1989;46:111-47.

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

Nassar CA, Nassar PO, Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Rev Odontol UNESP*. 2003;32:125-30.

Nassar CA, Nassar PO, Abi Rached RS, Holzhausen M, Marcantonio E Jr, Spolidorio LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in rat periodontitis model. *J Periodontal Res*. 2004;39:143-8.

Nassar H, Kantarci A, Van Dyle TE. Diabetic periodontitis a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000*. 2006;43:233-44.

Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontol 2000*. 2006;43:245-53.

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

Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1979;50:450-61.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996;1:879-925.

O'Garra A. Interleukins and the immune system 1. *Lancet*. 1989;29:943-7.

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

Okuda K, Kato T, Naito Y, Ono M, Kikuchi Y, Takazoe I. Susceptibility of *Bacteroides gingivalis* to bactericidal activity of human serum. *J Dent Res*. 1986;65:1024-7.

Owen WF Jr, Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM, et al. Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by humana fibroblast. *Kidney Int*. 1998;53:1365-73.

Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991;26:230-42.

Pepato MT, Folgado VB, Kettelhut IC, Brunetti IL. Lack of anti-diabetic effect of Eugenia jambolona leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. Braz J Med Biol Res. 2001;34:389-95.

Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. Am J Physiol. 1996;271:E340-7.

Pepato MT, Oliveira JR, Kettelhut IC, Migliorini RH. Assessment of the antidiabetic activity of Myrcia Uniflora extracts in Streptozotocin diabetic rats. Diabetes Res. 1993;22:49-57.

Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2002;81:191-7.

Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. Life Sci. 2000;67:291-9.

Rausch-Fan X, Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? Eur J Clin Invest. 2001;31:833-5.

Report of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 2003;26 (suppl. 1):S5-S20.

Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. J Dent Res. 1997;76:1833-9.

Rosenthal SL. Some clinical aspects of oral medicine. J Oral Med. 1970;25:112-7.

Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1992;19:24-9.

Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*. 1982;17:263-74.

Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE₂, IL-1 β , and TNF- α , responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998;3:40-50.

Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of mononuclear phagocyte migration by cell surface binding proteins for advanced glycosylation endproducts. *J Clin Invest*. 1993;92:2155-68.

Scott FW, Trick KD, Lee LP, Hynie I, Heick HM, Nera EA. Serum enzymes in the BB rat before and after onset of the overt diabetic syndrome. *Clin Chem*. 1984;17:270-5.

Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol*. 1998;69:1098-104.

Sjöström S, Hånström L, Lerner UH. The bone resorbing activity released by gingival fibroblasts isolated from patients with periodontitis is independent of interleukin-1. *J Periodontal Res*. 2000;35:74-84.

Soop M, Duxbury H, Agwunobi AO, Gibson JM, Hopkins SJ, Childs C, et al. Euglycemic hyperinsulinemia augments the cytokine and endocrine responses to endotoxin in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:1276-85.

Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. J Clin Periodontol. 1991;18:548-54.

Sundqvist G, Johansson E. Bacterial effect of pooled human serum on *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Scand J Dent Res. 1982;90:29-36.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol. 2003;21:713-58.

Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontol. 1994;65:147-53.

Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Tabman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. J Dent Res. 2000;79:1548-55.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. J Periodontol. 1998;69:76-83.

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

Tervonen T, Oliver RC. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. J Clin Periodontol. 1993;20:431-5.

Tervonen T, Oliver RC, Wolff LF, Bereuter J, Anderson L, Aeppli DM. Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of Diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1994;21:375-9.

Thorstensson H, Dahlen G, Hugoson A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*. 1995;22:449-58.

Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol*. 2001;46:901-8.

Vlassara H, Palace M. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002;251:87-101.

Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, et al. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;13:970-3.

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

Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol*. 2000;115:245-53.

Wilson TG JR, Kornman KS. Retreatment for patients with inflammatory periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1996;12:119-21.

Wong MM, Rao LG, Ly H, Hamilton L, Tong J, Sturtridge W, et al. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res*. 1999;5:803-13.

Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol*. 2000;71:460-7.

Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histol Histopathol*. 2003;18:889-96.

Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adults periodontitis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1988;59:23-31.

Zipfel M, Carmine TC, Gerber C, Niethammer D, Bruchelt G. Evidence for the activation of myeloperoxidase by f-meth-leu-phe prior to its release from neutrophil granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:209-12.

UNESP 50 ANOS 1953-2003 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Rua Humaitá, 1680 – CEP 14801-903 – Caixa Postal 331 Fax (0xx16) 201-6433 – Araraquara – SP
Fone: (0xx16) 201-6431 - e-mail: diretor@foar.unesp.br / home page: <http://www.foar.unesp.br>
Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEEA

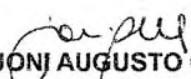
Araraquara, 09 de dezembro de 2003

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 61/2003

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 01/dezembro/2003, após a avaliação final do Projeto de sua responsabilidade intitulado **"Influência do diabetes mellitus na microbiota e na dinâmica do processo inflamatório da doença periodontal induzida em ratos"** (Proc. 28/2003) considerou-o **APROVADO**, devendo o **relatório final** ser apresentado em **maio/2006**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. JONJ AUGUSTO CIRELLI
Coordenador do CEEA

À
C.D. JULIANA RICO PIRES
DD. Pesquisador Responsável
Nesta