



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

Alliny de Souza Bastos

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE PEROXIDAÇÃO
LIPÍDICA E O PERFIL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, DISLIPIDEMIA E
PERIODONTITE CRÔNICA.**

Araraquara

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Alliny de Souza Bastos

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE PEROXIDAÇÃO
LIPÍDICA E O PERFIL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, DISLIPIDEMIA E
PERIODONTITE CRÔNICA.**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Odontologia, Área de concentração Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

***Orientador:** Prof. Dra. Silvana Regina Perez Orrico*

***Co-Orientador:** Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior*

Araraquara

2012

Bastos, Alliny de Souza

Avaliação da correlação entre peroxidação lipídica e o perfil de marcadores inflamatórios em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e periodontite crônica / Alliny de Souza Bastos.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

196 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Peroxidação de lipídeos 2. Diabetes mellitus tipo 2
3. Doenças periodontais 4. Citocinas I. Título

ALLINY DE SOUZA BASTOS

**AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E O
PERFIL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES
PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM PERIODONTITE
CRÔNICA.**

COMISSÃO JULGADORA

DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Profa. Dra. Margarete Aparecida Meneses de Almeida

3º Examinador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

4º Examinador: Profa. Dra. Maria Teresa Pepato

5º Examinador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório

Araraquara, 12 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

Alliny de Souza Bastos

NASCIMENTO: 03/01/1983- RIO BRANCO/AC

FILIAÇÃO: Antonio Bastos

Maria Francismar de Souza Bastos

2000-2005 Curso de Graduação

Universidade Federal de Sergipe- UFS

2006-2008 Curso de Especialização em Implantodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP

2008-2012 Doutorado em Odontologia- Área de Concentração Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP

Com amor, dedico este trabalho...

Aos meus pais *Tobias* e *Meire* que fizeram dos meus sonhos seus próprios objetivos e de meus objetivos suas próprias lutas. Chegamos aqui juntos e esta conquista é nossa!

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, que foram receptivos e tornaram possível a realização deste estudo. Obrigada pela paciência e
confiança!

AGRADEÇO ESPECIALMENTE...

A *Deus à luz do Espírito Santo* que me iluminaram nos momentos mais difíceis em que achei que poderia fraquejar, dando-me força e discernimento para tornar tudo possível. Minha vida segue entregue a ti.

Ao amor e incentivo dos meus pais *Tobias e Meire*, ao apoio incondicional, por estarem ao meu lado em todas as decisões e momentos e por entenderem minha ausência por todo este tempo. Obrigada por investirem em minha educação e em meus sonhos. **AMO VOCÊS**. Ao meu irmão *Rafael* que do seu jeito único, sempre torce por minhas conquistas, apoiando e incentivando tudo que faço.

Ao meu namorado, amigo, companheiro *Nicolau* por ser minha fortaleza, minha paz e meu refúgio. Ter você em minha vida foi um verdadeiro presente divino. Muito obrigada pelos conselhos, por entender meus anseios e compartilhar sonhos, vitórias e momentos difíceis. Agradeço a paciência e incentivo ao longo destes anos, espero que saiba o quanto de você tem neste trabalho. Agradeço ainda a toda família pelo apoio.

À minha prima-irmã *Grazianny*, meu anjinho da guarda, que vibra com minhas conquistas e sofre junto nos momentos difíceis que com *Leonardo* me receberam em sua casa durante as análises realizadas em São Paulo. Obrigada por me acolher, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora *Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico* por ter me aceitado como estagiária e pós-graduanda. Pelos ensinamentos durante a execução desta pesquisa, pelas palavras de sinceridade e pela maneira especial e direta de me fazer aceitar quando eu estava errada e por me ensinar a ser mais clara e objetiva. Muito obrigada por entender minhas ansiedades, por acreditar em mim, pela amizade, competência e paciência com que me orientou durante a realização desta tese.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de seu Diretor, *Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla* e Vice-Diretora *Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon*.

Ao *Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho*, pela competência, dedicação e responsabilidade com que coordena o Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos docentes do Departamento de Periodontia, *Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*, *Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico*, *Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio*, *Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior*, *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*, *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior* pela convivência diária, amizade, formação profissional e pelos exemplos de competência e dedicação à Periontia e à pesquisa.

Ao *Prof Dr.Élcio Marcantonio Júnior* por ter sido meu contato inicial e por ter me recebido em Araraquara. Obrigada pelos conselhos e por me receber sempre com tanto carinho.

À *Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio* meu agradecimento especial pelo carinho e acolhimento nos momentos difíceis, pela amizade fiel e ensinamentos profissionais e de vida com que compartilhamos durante todos estes anos. Me sinto privilegiada por te ter em minha vida.

Ao *Prof Dr. Carlos Rossa Junior* pelos sábios conselhos sempre vindos nos momentos que mais precisava. Obrigada pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório pela amizade e por ser uma inspiração a seguir a carreira acadêmica. Sua vibração e amor pela pesquisa me fazer ter certeza de que estou no caminho certo.

Ao Prof Dr Dana T Graves por ter me recebido em seu laboratório na Filadélfia durante a realização do meu estágio de Doutorado. Obrigada pela confiança, por me ensinar tanto em pouco tempo. Aos alunos do laboratório da Universidade da Pensilvânia, *Sandra, Bhaskar, Mireille, Guangyu, Kathy, Precious e Tina* por compartilhar uma fase da vida que jamais esquecerei.

À *Profa. e amiga Elaine Maria Sgavioli Massucato* por sempre me receber com um olhar que praticamente já sabia o que eu estava sentindo. Por me apresentar um lado da vida positivo e a lidar com os problemas de maneira sábia.

À *Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga* pela amizade, carinho e por ser um exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

À *Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro* (Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, (FCF) Universidade de São Paulo- USP) por participar ativamente das análises de peroxidação lipídica, ao meu lado na bancada. Agradeço o carinho com que sempre me recebeu em seu laboratório, a curiosidade e boa vontade de entender um pouquinho da Periodontia, a atenção em me escutar e a paciência em me ensinar. Você fez toda a diferença. Aos alunos do laboratório da Profa Ana Paula, em especial ao *Tiago Franco de Oliveira* pela amizade, disposição, paciência e ajuda na realização das análises.

À *Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla* (Laboratório de Bioquímica da FCF-USP), por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização do meu trabalho.

Às meninas do laboratório *Tanize, Fernanda, Patrícia, Marcela, Martina e Elaine* pelo carinho nos momentos de desespero e por serem sempre tão prestativas. À *Tanize*, um agradecimento especial por ser um anjo com coração bondoso que apareceu em minha vida na hora que mais precisei. Obrigada por tornar as análises possíveis e por ser um exemplo de calma, competência e dedicação à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. *Niels Olsen Câmara* (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo- USP) por ter me recebido em seu laboratório para as análises de marcadores inflamatórios e à *Meire Hiyane* pela dedicação e acolhimento durante a realização destas análises. Meire, você literalmente abraçou a causa. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. *Paulo Inácio da Costa*, coordenador do CACH/NAC, por permitir a realização dos exames dos pacientes nos laboratórios do NAC (Núcleo de Atendimento à Comunidade de Araraquara).

Aos funcionários do NAC e do laboratório de bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP nas pessoas de *Dalva, Marisa, Mathilde, Fátima, Rose, Flávia, Tânia, Edson*. Obrigada por receber a mim e aos meus pacientes durante anos e por tornar esta pesquisa possível. Vocês são um exemplo de bondade, competência e dedicação ao trabalho que desempenham.

Aos funcionários da Periodontia, *Maria do Rosário, Maria José, Ester, Claudinha, Leandro* pela amizade e carinho que sempre me dispensaram. Que Deus os abençoe!

À *Regina Lúcia*, pela paciência e amizade sempre disponíveis. Por ser meu refúgio e me transmitir paz sempre que precisei. Obrigada por estar sempre presente!

A todos os *funcionários da Secção de Pós-Graduação, Mara, Alexandre e Sérgio* vocês são especiais e essenciais na vida de um pós-graduando. Obrigada por tudo!

Aos *funcionários da biblioteca, Ceres, Adriano, Marley* e a todos os *funcionários da FOAr* que colaboraram com o estudo fazendo parte dele em um momento que precisei de pacientes para terminar a pesquisa em tempo hábil. Obrigada por ter cedido seu tempo e confiança para finalização desta etapa!

À *CAPES, CNPq* e FAPESP pelo apoio financeiro para realizar esta pesquisa.

À *Mariana Ferrari* pela amizade e apoio que me ofereceu nos momentos em que pensei que não fosse ser possível. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

Ao meu querido *Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva* (Universidade Federal de Sergipe- UFS) meu agradecimento especial por ter me incentivado a buscar algo a mais da Odontologia. O grande responsável por ter iniciado esta jornada em Araraquara. Obrigada por estar sempre disponível quando precisei

À *Profa e amiga Kildane Maria Guedes*, com quem fiz meu primeiro trabalho de pesquisa. Obrigada por acreditar em mim, por ter me dar forças para continuar explorando o meu potencial.

À *Profa Dra Margarete A. Meneses de Almeida*, minha orientadora de trabalho de conclusão de curso e alguém que me mostrou que a Periodontia é uma especialidade diferenciada e que se perseveramos e acreditarmos iremos colher bons frutos. Obrigada pelos ensinamentos e por me ser incentivar à carreira acadêmica. À *Profa Tânia Fortes* por ter me iniciado à Periodontia, a senhora é um exemplo de competência e força.

Ao *Departamento de Odontologia da UFS*, nas pessoas da *Profa Dra Marta Piva*, que só a presença já transmite paz e tranquilidade, obrigada pelas palavras de incentivo e apoio e à *Profa Dra Rosa Bragança* pela competência e seriedade com que conduz nosso curso de Odontologia. Ao *Prof Mirabeau Ramos* por acreditar em mim e me inspirar a ir em busca dos meus objetivos.

À *Profa. Andréa Marcaccini* pela atenção sempre disponibilizada quando precisei.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação que fizeram parte da minha vida nos meus primeiros anos de Araraquara *Daniela Zandim, Fernanda Bello, Daniela Gonçalves, Maurício, Ana Emília, Fernando, Rafael Sartori, Rafael Faeda*. Obrigada pelo acolhimento e amizade. À *Aline Cavalcanti* por ter me apresentado Araraquara, por ter me ajudado no primeiro ano tão difícil, jamais esquecerei o que fez por mim.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Periodontia, *Leila, Chaine, Telma, Michelle, Sâmia, Guilherme, Andressa, Livia, Mariana, João, Lucas, Marina, Shelon, Nicolau, Morgana, Sabrina, Rubens, Andrés, Naná, Roberta, Humberto, Yeon, Wagner, Rodrigo, Nicole, Fausto, Giovana, Livia Finoti, Luana, Fabiana, Pablo, João Paulo, Luiz Guilherme, Fernanda* pelo convívio agradável e enriquecedor.

Às minhas amigas de pós-graduação e da vida inteira, *Leila, Marina, Morgana, Livia, Sabrina, Roberta, Carol, Naná e Yeon* por tornar tudo mais fácil e compartilhar de momentos de descontração e dificuldades. Vocês moram no meu coração!

À *Leila* amiga fiel, por participar tão ativamente da minha vida pessoal e profissional. Muito obrigada pelo companheirismo, por se preocupar comigo e por acreditar em mim. Você estará sempre em minha vida, pois não dá para seguir mais sem você. À *Marina* pela convivência diária, por compartilhar angústias e alegrias. À *Livia*

Perussi por ser uma amiga tão fiel e verdadeira. À *Morgana* pela sinceridade e por estar presente em momentos tão delicados com positivismo e tranquilidade. Vocês tornaram esta caminhada possível. Quero tê-las sempre perto!

À *Sâmia* que esteve comigo nos momentos mais difíceis deste doutorado. Quando o cansaço já tomava de conta, sempre tínhamos uma a outra para nos apoiarmos. Muito obrigada por poder contar com você sempre!

Ao amigo *Fausto* pelo companheirismo e ajuda no início da realização desta pesquisa, pelo positivismo transmitido e por mostrar a importância de conduzir a vida de uma maneira mais leve. Ao amigo *Guilherme* que tanto me ajudou no atendimento dos meus pacientes em momentos em que estive ausente, sem forças e sem tempo para dar conta de tudo. Você tem um coração e uma competência admiráveis.

Ao meu querido amigo *Rubens* por ser a palavra e a ação nos momentos que tanto precisei. Você é único e a vida te recompensará por ser tão prestativo e fiel.

Ao amigo *Bruno* por compartilhar conhecimento e experiências de vida. Obrigada por me incentivar a perseverar na pesquisa e a buscar algo maior.

À *Gabriela Giro* pelo apoio e incentivo pessoal e profissional sempre que precisei.

À família *Castanharo, Sabrina, Cristiane, Elzio e Maria* pelo acolhimento, confiança e amizade. Muito obrigada por tudo que fizeram por mim e por minha família.

À Profa *Sílvia Cavalheiros* pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de Araraquara Michel, Paula, Fábio, Adriana, Rosângela, Elaine, Liliane, Giovana, Cassiano, Flávia pelo confiança, carinho e amizade.

À minha querida *Fábia* por ser tão companheira e presente em minha vida, por tentar entender minha rotina, por me dar forças e por tornar tudo mais leve e prazeroso. À *Camilla* pela companhia e energia positiva. Conviver com você é enriquecedor.

Às amigas da especialização em Implantodontia *Sheila e Keidy*, pelo incentivo e companheirismo. Sheila, ter sua presença em nossa casa nos trouxe luz e alegria!

À minha grande amiga *Emanuella* por se esforçar para entender o que faço, por sempre acreditar e me incentivar. Amizade que transcende o tempo e a distância.

A toda minha família, avós, tios, primos que mesmo de longe sempre torceram por mim. Obrigada pela preocupação, apoio e carinho.

Aos meus amigos-irmãos *Djalmyr e Vitor* que compartilharam do meu primeiro ano de Araraquara. Vocês são um exemplo de que honestidade e acreditar faz a diferença.

Aos meus amigos de graduação *Sara* (eterna dupla), *Marina, Júlio, Wesley, Itamar, Christiano*, obrigada pela verdadeira amizade, pelo carinho e palavras de incentivo.

A todos os meus amigos em Aracaju, em especial *Emanuella, Eliana, Evelyne, Thereza, Luana, André*. À distância às vezes me obriga a estar ausente em momentos importantes...mas não tenham dúvidas que sempre trago vocês em meu coração.

A todos aqueles que não foram citados, porém têm conhecimento deste trabalho e de sua importância, bem como aqueles que me ajudaram em momentos específicos e essenciais, minha gratidão.

FILOSOFIA DO SUCESSO

Napoleon Hill

Se você pensa que é um derrotado,
você será derrotado.

Se não pensar “quero a qualquer custo!”

Não conseguirá nada.

Mesmo que você queira vencer,
mas pensa que não vai conseguir,
a vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,
você será fracassado.

Nós descobrimos neste mundo
que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malogrado,
você se torna como tal.

Se almeja atingir uma posição mais elevada,
deve, antes de obter a vitória,
dotar-se da convicção de que
conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa
aos fortes nem aos espertos.

Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória

é aquele que crê plenamente

EU CONSEGUIREI!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	13
Resumo	16
Abstract	18
1 Introdução	20
2 Proposição	43
3 Capítulos	45
3.1 Capítulo 1	46
3.2 Capítulo 2	70
3.3 Capítulo 3.....	101
4 Discussão	131
5 Conclusão	147
6 Referências	149
7 Apêndice.....	166
Apêndice 1 Material e Método	167
Apêndice 2 Resultados Adicionais.....	182
8 Anexos	187
Anexo A Certificado Comitê de Ética.....	188
Anexo B Termo de consentimento Livre e Esclarecido.....	189
Anexo C Documentos comprobatórios.....	193

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGE-** advanced glycation end-products
- BHT-** Butylated hydroxytoluene
- BMI** – Body Mass Index
- BOP** – Bleeding on Probing
- CAL** – Clinical attachment Level
- CEP-** Comitê de Ética em Pesquisa
- CT-** Colesterol Total
- DAD** – Diode array detector
- DM2** – Type 2 Diabetes mellitus
- ELISA-** Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
- EROs-** Espécies reativas de oxigênio
- FSG-** Fluido sulcular gengival
- GBI** – Gingival bleeding index
- GCF** – Gingival Crevicular Fluid
- GM-CSF** Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
- H₃PO₄** - ácido fosfórico
- HbA_{1c}** – Glycated Hemoglobin A_{1c} fraction
- HDL** – High density lipoprotein
- HOMA IR-** Homeostasis model assessment of insulin resistance
- HPLC-** High performance liquid chromatography
- hs CRP** – High Sensitive C-reactive Protein
- IL-** Interleukine
- IMC-** Índice de massa corporal
- IPV-** Índice de placa visível
- ISM-** Índice de sangramento marginal
- KI** - iodeto de potássio

LDL – Low Density Lipoprotein
LDL (-) – LDL eletronegativa
LDL ox – LDL oxidada
LPO – Lipid peroxidation
MDA - Malondialdehyde
NaOH- hidróxido de sódio
NF- κ B – nuclear factor kappa B
NI- Nível de inserção
OPG – osteoprotegerina
Ox-LDL – oxidized LDL
PBS- Phosphate-buffered saline
PD – Probing Depth
PL- peroxidação lipídica
PS- Profundidade de Sondagem
RAGE- receptor of advanced glycation end-products
RANKL- receptor activator of nuclear factor kappa B
ROS- Reactive oxygen species
SS – Sangramento à sondagem
TBA- ácido tiobarbitúrico
TBARs - thiobarbituric acid-reactive substances
TCA- ácido tricloracético
TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido
TG- Triglicérides
TNF- α : Fator de necrose tumoral alpha
VPI – Visible Plaque Index

BASTOS AS. Avaliação da correlação entre peroxidação lipídica e o perfil de marcadores inflamatórios em pacientes com Diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e periodontite crônica. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar os níveis locais e sistêmicos de peroxidação lipídica (LPO) e sua correlação com o perfil de marcadores inflamatórios, locais e sistêmicos em com Diabetes mellitus (DM) tipo 2, dislipidemia e periodontite crônica, comparando-os a indivíduos sem diabetes. Além disso, buscou-se propor um método validado para avaliar o malondialdeído (MDA) no fluido sulcular gengival de sítios saudáveis e doentes. A amostra foi constituída de 120 pacientes com doença periodontal crônica divididos em 4 grupos: Grupo1 (DM descompensado); Grupo2 (DM compensado); Grupo3 (sem diabetes com dislipidemia); Grupo 4 (sistemicamente saudável). Toda a amostra foi submetida a exame periodontal completo, exame físico e avaliação laboratorial para verificação da glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA_{1c}), insulina, proteína C-reativa e perfil lipídico. O exame periodontal consistiu na avaliação do índice de placa visível, do índice de sangramento marginal, da posição da margem gengival, da profundidade de sondagem, do sangramento à sondagem e do nível clínico de inserção. Para todos os grupos foram coletadas amostras de fluido sulcular gengival (FSG) (4 sítios sem periodontite e 4 sítios com periodontite) e de sangue para obtenção do plasma sanguíneo. Os níveis de peroxidação lipídica representados pelo MDA, avaliado por HPLC, e pelo LDL oxidado (LDLox), avaliado por ELISA, foram quantificados no fluido sulcular gengival e no plasma. Foram avaliadas ainda as citocinas (IL)-1 β , -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -12, -13 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) no FSG e no plasma. Foi possível determinar e validar o método de avaliação no fluido sulcular gengival, com alta precisão, sendo que os coeficientes de variação intra- e inter-dias encontrados foram abaixo de 6.3% e 12.4%, respectivamente. O método foi considerado sensível e capaz de detectar o MDA em pequenas quantidades, sendo o

limite de quantificação (S/N = 5) de 0.03 μ M, permitindo avaliação deste marcador no fluido de sítios saudáveis. Foi observado que os sítios com doença periodontal apresentavam-se com valores maiores de MDA do que os sítios saudáveis. Os resultados mostraram que o grupo 1 apresentou maior severidade da doença periodontal quando comparado aos demais grupos, em especial quanto ao sangramento à sondagem, profundidade de sondagem ≥ 6 mm, nível de inserção clínica ≥ 5 mm e supuração. Em relação aos parâmetros de LPO local e sistêmico, os grupos com diabetes apresentaram maiores níveis de peroxidação quando comparados aos grupos sem diabetes, sendo que o grupo 1 apresentou diferença significativa também em relação ao grupo 2. Em relação às citocinas inflamatórias no FSG, foi observado que o TNF- α , IL-6 e IL-10 estavam significativamente aumentadas no fluido de pacientes com diabetes, sendo esta diferença maior no grupo 1. Foram verificadas correlações positivas e significantes entre os níveis de peroxidação lipídica e citocinas no FSG (IL6, IL-10, TNF- α) bem como com parâmetros de doença periodontal, dentre estes sangramento à sondagem, profundidade de sondagem ≥ 6 mm, nível de inserção clínica ≥ 5 mm e presença de supuração. Já no plasma, a expressão das citocinas seguiu um padrão decrescente do grupo 1 ao grupo 4 tanto para citocinas pró- quanto anti-inflamatórias, sendo esta diferença significativa para (IL)-1 β , -4, -6, -8 e TNF- α . Esta diferença ocorreu em maior magnitude no grupo 1, embora nos pacientes portadores de diabetes com adequado controle metabólico os níveis destas citocinas também estivessem mais elevados em relação aos pacientes saudáveis. Os níveis de LPO plasmática apresentaram correlação intermediária e positiva ($p < 0.0001$) com níveis de IL1- β (0.50), TNF- α (0.40) e IL-6(0.40). Concluímos que a peroxidação lipídica pode ser um mecanismo importante na expressão aumentada de marcadores inflamatórios e maior severidade da doença periodontal no paciente com DM e dislipidemia.

Palavras-chave: Peroxidação de lipídeos, diabetes mellitus tipo 2, doenças periodontais, citocinas

BASTOS AS. Correlation between lipid peroxidation and inflammatory markers profile in Diabetes mellitus type 2 patients with dyslipidemia and chronic periodontal disease. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the levels of the lipid peroxidation and its correlation with systemic and local inflammatory markers profile in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) dyslipidemia and chronic periodontitis compared to systemically healthy patients. We also aimed to quantify a specific product of the lipid peroxidation process, malondialdehyde (MDA), in gingival crevicular fluid and to describe the validation of this method in this matrix using HPLC. The study sample comprised 120 patients divided into four groups with 30 patients in each group: group 1- diabetes with poor metabolic control with dyslipidemia, group 2- diabetes with good metabolic control, group 3- without diabetes with dyslipidemia and group 4- systemically healthy. All the subjects will go through a complete periodontal examination and physical and laboratory evaluation in order to verify fasting plasma glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), lipid profile, insulin and high sensitivity C-reactive protein. Periodontal examination will consist of visible plaque index, gingival bleeding index, bleeding on probing, probing depth (PD) and clinical attachment levels (CAL). Plasma and samples of gingival crevicular fluid (GCF) will be collected in 4 sites without periodontal disease and 4 sites with periodontal disease. The lipid peroxidation levels, evaluated by oxidized LDL (ox LDL) and MDA were measured in GCF and in plasma. Inflammatory cytokines, (IL)-1 β , -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -12, -13 and tumor necrosis factor-alpha α (TNF- α) were also evaluated in plasma and GCF. It was possible to validate a HPLC-based method to identify and quantify the MDA in GCF with sensitivity, precision, and accuracy even in small concentrations as observed in healthy sites GCF. Samples' intra- and interday coefficients of variation were below 6.3% and 12.4%, respectively. The limit

of quantitation ($S/N = 5$) was $0.03 \mu\text{M}$. GCF in the periodontal diseased sites presented higher values of MDA than healthy sites for all groups. The results also showed that all the periodontal parameters were considered worse in group 1 (DM with inadequate metabolic control) when compared to the others groups, particularly BOP, $PD \geq 6\text{mm}$, $CAL \geq 5\text{mm}$ and suppuration. Regarding lipid peroxidation evaluated by MDA in plasma and in gingival crevicular fluid (GCF), significant differences were observed between the groups with diabetes when compared to the groups without DM and G1 presented higher values of MDA when compared to G2 ($p < 0.05$). The local inflammation assessed by cytokines in GCF (IL6, IL-10, TNF- α) increased in all diabetic patients, being significant in the group with poorly controlled diabetes and dyslipidemia. It was possible to verify significant and positive correlations between GCF lipid peroxidation markers, GCF cytokines (IL6, IL-10, TNF- α) and periodontal parameters such as bleeding on probing, $PD \geq 6\text{mm}$, $CAL \geq 5\text{mm}$ and presence of suppuration. The cytokines panel in plasma showed a decreasing pattern from the poorly controlled diabetes to the healthy group being significant to (IL)-1 β , -4, -6, -8 e TNF- α . This difference was more evident in group 1 but even in well-controlled DM with dyslipidemia the levels of MDA, OxLDL and inflammatory cytokines were significantly increased when compared to the non DM/dyslipidemic group. There was a wide range of, moderate positive, correlations observed between DM status, LPO markers and inflammatory cytokines expression, such as MDA and IL1- β (0.50); MDA and TNF- α .(0.40); MDA and IL-6(0.40). These findings indicate an important role for LPO in the severity of the local inflammatory response to bacteria and the susceptibility to periodontal disease in DM patients and suggest that LPO may represent an additive effect in the aggravation of inflammation in DM and a role of increased oxidative metabolism in the inflammatory response.

Keywords: Lipid peroxidation, diabetes mellitus type 2, periodontal diseases, cytokines

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A relação entre diabetes e doenças bucais não tem sido amplamente discutida na literatura da mesma forma como se tem discutido os efeitos do diabetes em demais órgãos¹²⁸. No entanto, evidências mostram que a periodontite é uma importante complicação do diabetes¹⁴¹ e uma das primeiras manifestações clínicas da doença¹²⁹. Sendo a periodontite uma infecção, pode induzir ou perpetuar uma condição inflamatória crônica¹⁴² com possível impacto sobre o controle metabólico do diabetes^{73, 158}. Desta forma, além da busca por um adequado controle glicêmico, a prevenção e controle da periodontite são essenciais no tratamento integral do paciente com diabetes^{5, 87}.

Diversos estudos buscam investigar as razões pelas quais a periodontite é mais prevalente e severa em pacientes com diabetes quando comparados a pacientes sem diabetes^{31, 60, 88, 112, 212, 227} e atribui-se ao pobre controle metabólico o papel de ser um dos principais fatores de maior severidade^{136, 187, 227, 229}. No entanto, as anormalidades no metabolismo dos lipídios¹⁰², o estresse oxidativo^{6, 175, 201} e a peroxidação lipídica^{210, 220} podem, caracterizar-se como importantes mecanismos relacionados à patogênese da periodontite crônica nestes pacientes.

Recentemente estudos têm mostrado o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica e de atividade antioxidante nas complicações do diabetes^{92, 110} e na patogênese da periodontite^{176, 246}. No entanto, a avaliação da peroxidação

lipídica em ambas condições, diabetes e periodontite crônica, não tem sido investigada.

Considerando que aumentos dos níveis de peroxidação lipídica podem contribuir para danos significativos na integridade tecidual do hospedeiro ^{137, 153} por diferentes mecanismos como dano ao DNA, oxidação de importantes enzimas e estímulo à liberação de citocinas inflamatórias ^{66, 97}, entende-se que estudos devem ser conduzidos para investigar a influência da peroxidação lipídica sistêmica e localmente, sobre o periodonto de pacientes com diabetes.

Doença periodontal

A doença periodontal é uma desordem inflamatória induzida por bactérias e que afeta as estruturas de suporte dos dentes ^{1, 81, 129}. É a maior causa de perdas dentárias, acometendo aproximadamente 10-15 % da população mundial ¹⁴. Apresenta-se mais severa em um grupo determinado da população, mais predisposto à doença devido a uma reação inflamatória exacerbada frente a interação entre hospedeiro e patógenos, causando dano desproporcional aos tecidos de suporte, mobilidade e eventual perda do elemento dentário ^{82, 86, 128}.

O fator etiológico primário é o biofilme bacteriano, sendo que a bolsa periodontal pode conter diversas espécies microbianas diferentes, das quais uma pequena quantidade é considerada periodontopatogênica, podendo participar diretamente da doença periodontal cada uma com seu potencial de indução e virulência ^{125, 219}. O início e a progressão da periodontite envolvem a colonização

bacteriana da superfície dentária, penetração das bactérias e seus produtos no tecido conjuntivo e estímulo da resposta inflamatória, a qual induz destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar e limita o processo de reparo tecidual ⁵⁴.

A avaliação de marcadores inflamatórios relacionados à destruição do periodonto tem sido constante na busca de elucidar os mecanismos de início e progressão da doença periodontal. Estudos mostram que indivíduos com periodontite apresentam níveis elevados de citocinas inflamatórias no plasma sanguíneo ^{10, 45} e no periodonto, este último avaliado por meio de biópsia do tecido gengival ^{25, 194} ou de coleta do fluido sulcular gengival ⁴⁶. O fluido sulcular gengival (FSG) é considerado um transudato sérico em condições de saúde dos tecidos e quando do estabelecimento de condições inflamatórias periodontais é considerado um exsudato inflamatório oriundo dos tecidos que circundam o periodonto ¹²⁹. Tal fluido pode conter células inflamatórias do hospedeiro e fatores derivados do plasma bem como produtos dos microrganismos que compõem o biofilme supra e subgengival ^{59, 129}. O valor do fluido sulcular gengival como potencial fluido de diagnóstico é reconhecido por estudos prévios que constataram que sua composição pode contribuir para a detecção de alterações relacionadas ao início da doença periodontal ¹⁸⁰, sendo uma amostra de natureza sítio-específica ⁸⁵ e que pode ser coletada usando métodos não invasivos ¹²⁹, servindo como uma excelente fonte de informação do paciente ^{41, 190}.

Atualmente, é bem estabelecido que o dano tecidual que ocorre na periodontite é atribuído mais à resposta inflamatória do hospedeiro do que ao próprio

efeito direto das bactérias e seus produtos^{12, 249, 257}. Desta forma, passou-se a estudar a influência de diversos fatores, além da microbiota, na instalação, progressão e etiopatogênese da doença periodontal. Em especial, a influência de condições sistêmicas, como o diabetes mellitus^{115, 130, 158} e as anormalidades do metabolismo de lipídios^{47, 65, 162} têm sido avaliados como fatores modificadores do processo imunoinflamatório da periodontite.

Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas, que envolve primariamente os carboidratos, seguido de lipídios e proteínas, sendo caracterizado pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou em ambos. Como resultado das alterações metabólicas e do desequilíbrio osmótico, uma tríade clínica clássica de sintomas é desenvolvida e inclui polifagia, polidipsia e poliúria³.

O diagnóstico do Diabetes mellitus é baseado na história médica, exames clínico e laboratoriais, como o exame de glicemia de jejum (≥ 126 mg/dL), valores casuais de glicose sanguínea (≥ 200 mg/dL) ou teste de tolerância à glicose anormal. Entretanto, para monitorar o controle glicêmico do paciente já diagnosticado como portador de diabetes, o exame de hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}) é validado como a ferramenta de maior confiabilidade, fornecendo um registro de aproximadamente 90 dias da condição glicêmica do paciente, devendo ser inferior a 7%^{3, 49, 235}.

As formas mais comuns da doença são o tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). O Diabetes mellitus tipo 1 é resultante da destruição auto-imune das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, enquanto o tipo 2 é causado pela resistência das células alvo à ação da insulina com utilização deficiente do hormônio, podendo estar combinada a um defeito na secreção do mesmo. A maior parte dos pacientes portadores de DM2 são obesos e possuem um aumento do percentual de gordura corporal distribuída principalmente na região abdominal ³.

O aparecimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais ¹¹⁶ com aumento da prevalência em todo o mundo, sendo estimado que mais de 300 milhões de indivíduos serão afetados até 2030 ²⁴⁸. Muitos destes pacientes, particularmente do tipo 2, permanecem sem diagnóstico por muitos anos, uma vez que a hiperglicemia aparece gradualmente gerando pouca sintomatologia no início da doença ⁵¹.

As complicações do diabetes elevam os custos econômicos associados às despesas com assistência médica e redução da capacidade produtiva destes paciente, sendo uma das principais causas do aumento da mortalidade e morbidade destes pacientes ⁶². Tais complicações estão associadas a hiperglicemia crônica desencadeando uma cascata de eventos que levam a mudanças estruturais dos tecidos afetados ¹⁰¹ resultando em prejuízo a diversos órgãos em especial olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos ¹⁵⁹..

Sabe-se que quando o excesso de glicose interage de forma não-enzimática e,

frequentemente, irreversível com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocorre a formação de produtos finais da glicação avançada (*AGE-advanced glycation end-products*)²⁸, sendo um mecanismo importante no desenvolvimento das complicações do DM. Tanto macrófagos como células endoteliais apresentam receptores específicos para AGES denominados RAGES e esta interação resulta em diversas alterações celulares como o aumento da permeabilidade vascular e estímulo à secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α)^{127, 253}. A relação causal entre o aumento de AGEs e as complicações do diabetes foi demonstrada em modelos animais em que a inibição destes reduziu significativamente o processo de aterosclerose em animais com diabetes induzido sem afetar o controle da glicemia⁶⁷.

Outro mecanismo biológico envolvido nas complicações associadas ao diabetes, especialmente as complicações vasculares, é a alteração do metabolismo lipídico. Portadores de diabetes podem apresentar resistência insulínica¹⁵⁴, adiposidade visceral e alteração do metabolismo lipídico¹⁵⁵, esta última sendo definida na literatura como dislipidemia diabética. Apesar da possibilidade de alteração de todas as frações de lipídios, o fenótipo mais comum é caracterizado pela redução do colesterol de alta densidade (HDL), e elevação de triglicérides e do colesterol de baixa densidade (LDL)^{36, 121, 167}.

A patogênese da dislipidemia no diabetes não é bem compreendida, no entanto sabe-se que as anormalidades no metabolismo dos lipídios podem estar

presentes antes mesmo do estabelecimento da hiperglicemia, devido à possível associação com a resistência insulínica ^{75, 90, 122}. Acredita-se que a resistência insulínica prejudica a capacidade dos adipócitos de armazenar triglicérides e pode levar ao aumento da enzima lipoproteína lipase, que resulta no aumento da liberação de ácidos graxos livres. O maior influxo destes ácidos graxos no fígado na presença de estoques de glicogênio adequados promove a produção de triglicérides, a qual estimula a secreção de apolipoproteína B e LDL colesterol ¹⁶⁰.

A dislipidemia diabética desempenha um importante papel na resposta imune, predispondo o paciente a um estado hiperinflamatório por modular a função e atividade dos macrófagos ^{106, 230, 238}, desencadeando a ativação de diversas vias relacionadas à liberação de mediadores oxidativos e inflamatórios e fatores de crescimento que levam a danos em diversos órgãos e tecidos ^{47, 101}.

A relação entre diabetes e resposta imunológica é bidirecional e com possibilidades de convergência das vias metabólica e inflamatória em múltiplos níveis ⁹⁹. Sabe-se que a resposta imunoinflamatória pode inibir eventos moleculares relacionados à regulação da insulina, exercendo um papel fundamental no metabolismo glicêmico ⁹⁹. Reciprocamente, o diabetes pode modular a resposta imune, levando a um aumento da magnitude da resposta inflamatória frente a patógenos e seus produtos ^{43, 171}, persistência do infiltrado inflamatório ¹³⁹, aumento do metabolismo oxidativo ⁸⁴, inibição da função de polimorfonucleares ⁵³, transtornos no metabolismo do tecido conjuntivo ^{54, 79}, inibição da proliferação de células

osteoblásticas e diminuição da formação óssea^{21, 144}, menor resistência a infecções¹⁷⁷ e dificuldade na cicatrização de feridas²¹⁵.

Sendo assim, o controle de infecções, adequado controle glicêmico e a manutenção dos níveis dos lipídicos séricos dentro da normalidade é uma meta a ser atingida nos pacientes com Diabetes mellitus, principalmente pelo fato de tais alterações estarem associadas com o desenvolvimento de complicações que elevam a morbidade e mortalidade do paciente portador de DM³.

Doença periodontal e diabetes

Atualmente, a periodontite pode ser reconhecida como a sexta complicação associada ao diabetes¹⁴¹ e, de fato, o diabetes é um fator de risco estabelecido para a periodontite com maior prevalência, severidade e progressão em indivíduos com diabetes em comparação a indivíduos saudáveis^{41, 60, 115, 119, 158, 187, 226, 227}. Tal relação foi confirmada em recente revisão sistemática na qual foi constatado, após rigorosos ajustes para potenciais fatores de confundimento, a ocorrência de maior extensão e severidade da periodontite em pacientes com DM quando comparados a pacientes sem DM³⁹.

O efeito negativo e recíproco da periodontite sobre o diabetes foi demonstrado em estudos clínicos e longitudinais que observaram que a inflamação do periodonto pode estar relacionada a um risco aumentado de desenvolver complicações do diabetes como proteinúria, angina, infarto do miocárdio, derrame²³¹, falência renal

¹⁹⁸, nefropatia ²¹³, tolerância à glicose diminuída ¹⁸⁹, retinopatia ¹⁷⁴ e maiores níveis de glicose sanguínea quando comparados a paciente sem diabetes ¹⁴³.

Relata-se ainda que pacientes com inadequado controle metabólico (HbA1c \geq 7%) apresentam progressão mais rápida da periodontite em comparação a pacientes com adequado controle metabólico (HbA1c $<$ 7%), como demonstrado em diversos estudos ^{16, 136, 187, 227, 229}, que mostram o impacto do pobre controle metabólico sobre a severidade da periodontite.

Os estudos têm demonstrado que a resposta imunoinflamatória do hospedeiro frente ao desafio bacteriano representa um dos fatores mais importantes para a maior destruição periodontal e que esta pode ser a responsável pela maior severidade da doença periodontal no diabetes ^{43, 128, 171}. É bem estabelecido em estudos in vitro, em animais e em seres humanos que o diabetes induz à exacerbação da resposta inflamatória, demonstrada por alterações celulares e teciduais. Evidências mostram que no diabetes existe aumento da permeabilidade vascular do tecido gengival ²¹⁴ e que os neutrófilos apresentam-se com deficiência de suas funções em nível de aderência, quimiotaxia e fagocitose ^{78, 148}. Já monócitos e macrófagos demonstram fenótipo hiperinflamatório, o que resulta na produção de mediadores e citocinas pró-inflamatórias em níveis aumentados ¹⁹¹, mesmo em sítios com periodontite leve ¹⁹².

Além disso, tem sido sugerido que no diabetes existe uma diminuição da quantidade de colágeno nos tecidos gengivais pela redução da síntese ^{54, 79} e aumento da degradação ^{124, 204, 208}, deficiência na cicatrização de feridas ^{140, 215, 216} e

persistência do infiltrado inflamatório por um período mais longo ⁸³, contribuindo para o extenso dano tecidual observado na periodontite de pacientes com diabetes.

Em se tratando de tecido ósseo, diversos autores investigaram a influência do diabetes sobre fatores relacionados à osteoclastogênese nas infecções periodontais, tendo sido demonstrado que a hiperglicemia pode modular as taxas de RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B) e OPG (osteoprotegerina) nos tecidos periodontais ^{57, 96, 131, 147, 197}, além de aumentar a apoptose de células ósseas, prejudicando a formação e a reabsorção óssea ⁹⁶. Estudos mostram que, além da reduzida formação óssea alveolar, há também um limitado reparo ósseo ^{54, 139} o que poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento da destruição óssea alveolar observada em pacientes com DM.

Assim como nas demais complicações do diabetes, o papel da interação dos produtos de glicação avançada (AGE) com seus receptores RAGEs também tem sido investigado na doença periodontal. Estudos demonstram que existem receptores RAGEs no tecido gengival ^{109, 202} de pacientes com diabetes e que níveis séricos de AGEs foram associados com a extensão da doença periodontal em adultos com DM tipo 2 ²²⁴. Níveis aumentados de AGEs e sua interação com seus receptores estão associados com a supressão da produção de colágeno por fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal ^{164, 183}, liberação de mediadores inflamatórios como interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) ^{127, 253} promoção da

osteoclastogênese^{55, 255} e atraso da reparação tecidual⁸⁰, sendo tais eventos cruciais no desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

Alguns estudos sugerem ainda que as dislipidemias^{47, 69, 102} e o aumento do metabolismo oxidativo^{6, 175, 202}, possam ser possíveis mecanismos que podem levar a uma maior severidade da doença periodontal em pacientes com diabetes principalmente pelo fato de estimularem a liberação de citocinas pró-inflamatórias^{17, 76, 97, 135, 179}. Pacientes com DM tipo 2 e elevados níveis séricos de triglicérides podem apresentar piores parâmetros clínicos periodontais⁴⁷ enquanto níveis elevados de colesterol podem estar correlacionados com a média aumentada da profundidade de sondagem periodontal⁶⁹. Além disso, marcadores de estresse oxidativo foram detectados no tecido gengival²⁰² e no plasma de pacientes⁶ com diabetes e com periodontite. No entanto, estes estudos são escassos e falham em correlacionar os níveis de oxidação encontrados com dados clínicos periodontais e ainda com a expressão de marcadores inflamatórios locais e sistêmicos nestes pacientes.

Estudos clínicos e epidemiológicos fornecem evidências científicas para estabelecer a relação entre doença periodontal e diabetes. Contudo, as investigações sobre o impacto do diabetes na periodontite, deveriam levar também em consideração fatores de risco adicionais à doença periodontal, como a síndrome metabólica^{48, 126, 163, 169, 232}, a obesidade^{35, 114, 200, 211} e a dislipidemia¹⁰², condições que estão intimamente ligadas ao DM tipo 2^{128, 188} e que demonstram ter um efeito potencial

sobre o estado inflamatório local e sistêmico do paciente com diabetes, podendo interferir na patogênese da periodontite.

Estresse oxidativo e peroxidação lipídica

As espécies reativas de oxigênio (EROs) (*reactive oxygen species*- ROS) são produzidas continuamente pelas células sob condições fisiológicas, sendo consideradas bioprodutos normais do metabolismo ¹⁴⁵ e, durante a fagocitose, esses radicais livres são liberados em maior quantidade como parte da reação bactericida ^{13, 207}. No entanto, apesar de desempenharem funções fisiológicas, sabe-se que ocorre uma produção de espécies reativas de oxigênio acima do normal em sítios de inflamação crônica ⁹² e que tais compostos deixam de exercer uma função meramente fisiológica, passando a contribuir para a injúria inflamatória dos tecidos do hospedeiro ²⁰⁷.

As células desenvolvem diversos mecanismos de defesa antioxidante para neutralizar o dano causado pelas ROS no organismo ^{94, 145}. Tal sistema antioxidante interage de forma conjunta e é composto de sistema enzimático (enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx)) e pelo sistema não enzimático (vitamina C-ácido ascórbico, vitamina E, ácido úrico, selênio, carotenóides, entre outros) ⁷². No entanto, quando uma condição patológica se estabelece, ocorre a saturação da capacidade antioxidante celular devido ao freqüente estímulo do eixo de sinalização sensível a alterações no mecanismo de oxidação-

redução. Este desequilíbrio no sentido pró-oxidativo ^{56, 236} desencadeia vias bioquímicas associadas com o desenvolvimento de processos inflamatórios ^{92, 181} e de doenças crônicas, como a aterosclerose, o diabetes e suas complicações ²⁹.

Os radicais livres, em especial o radical hidroxila e o peroxinitrito, têm a tendência de afetar os diferentes tipos de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e lipídios circulantes (colesterol e lipoproteína de baixa densidade) resultando em um processo conhecido como peroxidação lipídica (PL) ^{76, 105, 236}. A interação das espécies reativas de oxigênio com os ácidos graxos das membranas celulares altera a estrutura dos lipídios, causando modificações biológicas e fisiológicas ^{170, 222} como a diminuição da fluidez e alteração da atividade de ligação entre a membrana, enzimas e receptores ¹⁵². O aumento da peroxidação de lipídios em nível sanguíneo atinge primeiramente as células endoteliais e, a seguir, tecidos e órgãos intactos ²⁵², gerando indesejáveis produtos oxidados responsáveis por causar ou contribuir para a progressão de doenças ^{105, 236}.

A produção descontrolada de peróxidos de lipídios pode provocar dano à integridade celular e tecidual ^{137, 153} por mecanismos diferentes incluindo alterações do DNA e proteínas, oxidação de enzimas e estímulo à liberação de citocinas pró-inflamatórias ^{17, 76, 97, 135, 179, 240}. Desta forma, a peroxidação lipídica tem sido considerada um importante mecanismo patogênico em doenças associadas com mecanismos de infiltração fagocitária em resposta a patógenos ^{37, 92}, no envelhecimento ¹⁵¹, na aterosclerose ⁹², no desenvolvimento de complicações do

diabetes como alterações micro e macrovasculares^{110, 241}, na artrite reumatóide¹⁴⁹, na doença pulmonar obstrutiva crônica¹⁴⁶, na AIDS⁵⁸ e na doença periodontal^{4, 38, 233, 246}.

Diversos marcadores de peroxidação lipídica têm sido utilizados para monitorar este processo, empregando diferentes metodologias^{2, 4}, uma vez que espécies reativas de oxigênio são difíceis de serem detectadas por serem instáveis e com meia-vida curta⁵². No entanto, para um método ser considerado ideal na mensuração da peroxidação lipídica deve: identificar e quantificar produtos derivados especificamente do processo de peroxidação (estáveis in vivo e in vitro); ter baixo coeficiente de variação; não estar sujeito a interferências de outras biomoléculas; empregar técnicas confiáveis; não sofrer interferência direta da dieta e ter sensibilidade para avaliação de níveis basais dos produtos^{2, 37}.

O processo de peroxidação lipídica como uma medida geral de oxidação de lipídios, sem considerar a peroxidação de uma fração de lipoproteína específica^{52, 92}, pode ser avaliado por meio do malondialdeído (MDA). Este é o principal e o mais estudado produto da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados^{50, 52} e tem sido descrito como um importante indicador de injúria à membrana celular, estando aumentado em situações de estresse oxidativo^{52, 153}. Diversos métodos têm sido utilizados para mensurar os níveis de peroxidação lipídica por meio do MDA^{4, 64, 153, 176, 221, 233, 234, 252}. No entanto, alguns destes métodos, em especial a reação chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (SRATB)” ou TBARs, têm

recebido críticas devido à falta de especificidade na avaliação efetiva dos níveis de MDA sem interferências de outras moléculas ^{2, 118}. Sendo assim, o método para avaliação do MDA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido considerado mais específico, confiável e reprodutível, uma vez que o MDA é eficientemente separado de outros cromógenos que poderiam vir a interferir na reação ^{4, 37, 40, 68, 89, 98, 256}.

No entanto, existe ainda a mensuração da peroxidação de frações lipídicas específicas como a oxidação da LDL (*low density lipoprotein*). A LDL oxidada (LDL-ox) é uma forma modificada da LDL com importantes propriedades pró-inflamatórias ^{195, 196} e também é utilizada como um biomarcador de peroxidação lipídica ^{42, 173}. Está relacionada com níveis aumentados da HbA_{1c} ¹⁰⁰ e com o desenvolvimento de complicações vasculares do diabetes ²⁰. A LDL-ox tem efeitos importantes sobre as células, sendo relatado maior recrutamento de linfócitos T e de monócitos circulantes assim como apoptose de linfócitos T, ambos os eventos estando relacionados ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas ¹⁵⁷. Outros eventos incluem: citotoxicidade para fibroblastos ¹⁶¹, aumento da expressão de metaloproteinase-9 (MMP-9) e aumento da secreção de citocinas como IL-1 β , IL-12 ²²³ e TNF- α ¹⁰⁶.

Peroxidação lipídica e diabetes

Níveis altos de glicose no sangue podem levar à maior formação de radicais

livres^{9, 111, 234} aumentando o estresse oxidativo²², a peroxidação lipídica^{103, 152} e diminuindo os níveis de defesa antioxidante^{11, 34, 108}. Reciprocamente, evidências sugerem que níveis elevados de estresse oxidativo e peroxidação lipídica podem ser importantes mecanismos na produção, liberação ou função da insulina^{24, 247}, na disfunção e morte de células beta pancreáticas¹³³, no estabelecimento de condições de pré-diabetes e diabetes, podendo ainda ser responsável por complicações associadas à doença^{77, 111, 150, 152, 237}. No entanto, ainda existem controvérsias se os níveis aumentados do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica estão meramente associados ao DM ou se apresentam relação causal com o diabetes¹⁵².

Apesar de alguns autores não encontrarem aumento dos níveis de peroxidação lipídica no diabetes²⁴¹, diversos estudos^{9, 104, 107, 160, 234} observaram que pacientes com diabetes estão expostos a um aumento do estresse oxidativo por meio da peroxidação lipídica¹⁵². Estudos mostram que pacientes com DM tipo 2 apresentam elevados níveis de marcadores de peroxidação lipídica como a LDL-oxidada^{42, 100, 166, 193}, o malondialdeído (MDA)^{9, 84, 107, 160, 234} e o TBARs, quando comparados a pacientes sistemicamente saudáveis^{111, 165}. Além disso, níveis elevados de PL foram correlacionados positivamente com a glicemia de jejum, HbA_{1c} e colesterol total^{111, 165}, sugerindo que pacientes com diabetes descompensado e com complicações têm aumento sérico de PL¹⁵².

As alterações no metabolismo de lipídios e os mecanismos de formação dos peróxidos de lipídios no diabetes bem como os seus efeitos na função e estrutura

celular ainda não estão completamente elucidados ²⁴⁷, mas têm recebido significativa importância no estudo da diabetogênese ¹⁵², principalmente quanto ao entendimento do papel da dislipidemia diabética e da peroxidação de lipídios na modulação da resposta imunoinflamatória.

No diabetes, o microambiente dislipidêmico pode ser alterado também pela presença de produtos finais da glicação avançada (AGEs), os quais podem agir como co-estimuladores das células. A própria LDL-colesterol, como qualquer outra proteína plasmática, é susceptível à glicação formando um AGE ²⁰². Os AGEs presentes no plasma sanguíneo interagem com seus receptores específicos (RAGEs) e esta interação resulta em diversas alterações patológicas, basicamente envolvendo a modulação da resposta imune.

Desta forma, a hiperglicemia associada à dislipidemia e ao diabetes descompensado aumentam a formação de AGEs, incluindo LDL-AGE, bem como implicam em maior peroxidação lipídica representada por um aumento na quantidade de LDL oxidada ^{117, 202, 225}. Tanto AGEs como LDL-ox, presentes concomitantemente no sangue de pacientes com diabetes, apresentam diversos efeitos biológicos sobre linfócitos e monócitos, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias devido à ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B ²⁵⁴ que são conhecidos por serem sensíveis a alterações do metabolismo oxidativo ^{205, 253}. Tais eventos resultam na regulação do crescimento e proliferação celular bem como no início de um processo inflamatório difuso ^{43, 95}, os quais podem ter impacto significativo na patogênese de

diferentes complicações associadas ao diabetes, como insuficiência renal ⁶⁷, doenças vasculares e menor resistência a infecções ¹⁷⁷.

Peroxidação lipídica e doença periodontal

Estudos recentes têm demonstrado que pacientes com doença periodontal crônica têm níveis de peroxidação lipídica aumentados no plasma ^{4, 246}, na saliva ^{32, 37, 113}, no tecido gengival ^{25, 202} e no fluido sulcular gengival ^{4, 233, 246}.

Alguns autores verificaram uma correlação positiva entre os níveis de MDA plasmáticos ⁴ e do fluido sulcular gengival ^{4, 233} com parâmetros clínicos periodontais como índice gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica ^{4, 233}, indicando que níveis aumentados de peroxidação lipídica podem ter um papel importante na inflamação e destruição na periodontite.

O efeito do aumento do metabolismo oxidativo no tecido periodontal e em seus componentes celulares têm sido investigado em estudos *in vivo* e *in vitro* ^{6, 175, 201, 205, 210, 218}. Evidências têm mostrado que níveis aumentados de peroxidação lipídica podem contribuir para danos significativos ao periodonto ³⁸, levando a maior inflamação e destruição tecidual e a alterações degenerativas, como necrose e destruição do osso alveolar na região do infiltrado inflamatório ²¹⁸.

Localmente, o dano tecidual ao periodonto pode ser causado diretamente por um desequilíbrio do sistema antioxidante nos locais de inflamação ^{27, 176} e pelo aumento do metabolismo oxidativo durante a ativação de neutrófilos e macrófagos

por periodontopatógenos e seus produtos ^{25, 209, 210, 233}. A presença do ânion superóxido, potente indutor de peroxidação lipídica ^{123, 155} foi demonstrada em áreas de reabsorção adjacente a osteoclastos, levando à reabsorção óssea ²⁴⁵. Tem sido demonstrado que o colágeno, juntamente com outras proteínas, é susceptível ao ataque direto de espécies reativas do oxigênio podendo interagir com produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído ²¹⁷, levando a dano aos tecidos periodontais de proteção e sustentação. Durante o processo inflamatório e oxidativo ocorre degradação de proteoglicanas e componentes extracelulares da matriz ^{59, 244}, alterações nas funções dos fibroblastos como adesão, proliferação e longevidade ¹⁸⁵ e estímulo à diferenciação ⁷¹ e ativação ^{19, 91} de osteoclastos.

O dano causado pela oxidação aos tecidos periodontais também pode ocorrer indiretamente via desequilíbrio do eixo oxidação-redução ativando fatores de transcrição como a proteína-1 (AP-1) e fator nuclear-kB (NF-kB) ^{7, 178}, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios e apoptóticos como citocinas e moléculas de adesão celular ⁹², mecanismos considerados importantes na patogênese da doença periodontal ^{132, 168}.

No entanto, estudos mais recentes que investigaram o papel da peroxidação lipídica em pacientes com periodontite ^{4, 25, 32, 113, 202, 233, 246}, não consideraram o perfil imunoinflamatório local e/ou sistêmico do indivíduo, tornando difícil, estabelecer uma correlação entre achados clínicos periodontais e de peroxidação lipídica com a magnitude da resposta inflamatória gerada.

Peroxidação lipídica e severidade da doença periodontal no paciente com diabetes

As evidências atuais de fato comprovam a relação bidirecional entre diabetes e doença periodontal ^{88, 112, 158, 227}. No entanto os mecanismos precisos pelos quais esta interação ocorre ainda permanecem incertos. O estado hiperinflamatório que existe em ambas condições tem sido proposto como sendo um elo comum. No entanto, suspeita-se que algum mecanismo adicional esteja atuando para amplificar sinergisticamente a bioquímica e o curso clínico destas doenças ⁷.

Estudos recentes têm demonstrado que as anormalidades no metabolismo dos lipídios e a peroxidação lipídica podem, além do pobre controle glicêmico, caracterizar-se como um importante mecanismo associado à maior severidade e extensão da doença periodontal em pacientes com diabetes ^{43, 202, 220}. Sugere-se que espécies reativas de oxigênio, por meio da peroxidação lipídica, cause danos diretos e indiretos ao tecido periodontal e seus componentes celulares e teciduais, conforme relatado acima.

O efeito da peroxidação lipídica sobre o periodonto pode ser ainda mais severo em pacientes que apresentam condições sistêmicas que predis põem o indivíduo à produção de PL em níveis exacerbados, como é o caso de pacientes com dislipidemia ⁸⁶ e diabetes, em especial com inadequado controle metabólico ¹⁷². No

entanto, os estudos clínicos que investigaram a peroxidação lipídica em pacientes com diabetes e periodontite crônica são escassos ^{43, 202, 220}.

O estudo da peroxidação lipídica plasmática, mensurada por meio do TBARs, em pacientes com diabetes e doença periodontal demonstrou uma correlação fraca entre PL e expressão de metaloproteinases da matriz-8 (MMPs), que dentre outras funções são responsáveis por prejudicar a formação do colágeno ⁴³.

Além disso, o acúmulo de AGEs e de produtos de peroxidação lipídica foi demonstrado em diversos órgãos, inclusive na gengiva de pacientes com diabetes ²⁰² e no endotélio e epitélio vascular gengival de pacientes portadores de diabetes com periodontite ¹⁰⁹. Sendo a doença periodontal uma condição que se desenvolve frente a um desafio bacteriano, o acúmulo periférico ou local de AGE e de produtos de peroxidação lipídica, pode prejudicar a capacidade antioxidante ¹⁵⁶ ao mesmo tempo em que aumenta a liberação de mediadores inflamatórios ^{29, 63}, contribuindo para dano aos tecidos periodontais ⁶. Avaliando a peroxidação lipídica por meio do anticorpo anti-malondialdeído modificado pela LDL (MDA-LDL), em uma amostra reduzida de pacientes, foram constatados níveis aumentados de PL em indivíduos com diabetes e doença periodontal e que após o tratamento periodontal os níveis de peroxidação lipídica foram significativamente reduzidos ²²⁰.

No entanto, os estudos acima citados apresentam certas deficiências metodológicas que dificultam a interpretação dos dados de maneira conjunta, pois alguns deles não consideraram os níveis de dislipidemia destes pacientes ^{43, 202, 220} ou

avaliaram a PL por meio de metodologias pouco específicas ⁴³, apenas um estudo avaliou os níveis de peroxidação lipídica no tecido periodontal ²⁰² e nenhum correlacionou tais achados com a resposta inflamatória sistêmica e local.

O paciente com diabetes e dislipidemia apresenta por si só um estado hiperinflamatório em nível celular e molecular, que leva à maior destruição tecidual e dificuldade de reparo. Tais condições combinadas, em especial em pacientes com pobre controle glicêmico, predispõem a níveis de peroxidação lipídica aumentados agravando o processo inflamatório e o dano tecidual. No entanto não existem estudos que avaliem o estado periodontal e o papel da peroxidação lipídica em pacientes com diabetes, dislipidemia e doença periodontal. Sendo que tais condições clínicas são, na maioria das vezes, indissociáveis ^{75, 90, 122}.

Neste contexto, sugere-se que a LPO possui um papel importante na severidade do processo inflamatório relacionado à periodontite crônica em pacientes com DM e dislipidemia. Em virtude do exposto acima, parece-nos oportuno estudar, em pacientes portadores de Diabetes mellitus tipo 2, com dislipidemia, a correlação entre peroxidação lipídica e o perfil imunoinflamatório, local e sistêmico.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a correlação entre peroxidação lipídica e o perfil de marcadores inflamatórios, locais e sistêmicos, em pacientes com Diabetes mellitus (DM) tipo 2, dislipidemia e periodontite crônica, comparando-os a indivíduos sem diabetes.

2.3 Objetivos específicos

- Avaliar a peroxidação lipídica plasmática e seu papel na modulação da resposta imune, por meio do estímulo à liberação de citocinas inflamatórias;
- Validação de um método de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica no fluido sulcular gengival de sítios saudáveis e com periodontite crônica;
- Avaliar o impacto da peroxidação lipídica local e sistêmica sobre parâmetros de severidade da periodontite crônica e expressão de citocinas inflamatórias no fluido sulcular gengival.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method

Alliny de Souza Bastos, Ana Paula de Melo Loureiro, Tiago Franco de Oliveira,
Sâmia Cruz Tfaile Corbi, Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, Carlos Rossa Júnior,
Silvana Regina Perez Orrico

Artigo publicado na revista Analytical Biochemistry

Publisehd online 28 Jan 2012

PMID: 22330745

Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method

Alliny de Souza Bastos¹, Ana Paula de Melo Loureiro³, Tiago Franco de Oliveira³, Sâmia Cruz Tfaile Corbi¹, Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga², Carlos Rossa Júnior¹, Silvana Regina Perez Orrico¹

¹UNESP – Univ Estadual Paulista – Araraquara School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara, Brazil.

²UNESP – Univ Estadual Paulista – Araraquara School of Dentistry, Department of Morphology, Araraquara, Brazil.

³USP – Univ São Paulo- Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analyses, São Paulo, Brazil.

Short Title: Malonaldehyde in gingival crevicular fluid by HPLC

Corresponding author:

Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico,

UNESP – Univ Estadual Paulista; Araraquara School of Dentistry

Department of Diagnosis and Surgery

Rua Humaitá, 1680, 2^o andar

CEP: 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (16) 3301-6377 Fax: +55 (16) 3301-6369

E-mail: s-orrico@foar.unesp.br

Table of Contents: Chromatographic Techniques

ABSTRACT

Lipid peroxidation has been associated with periodontal disease, and the evaluation of malonaldehyde (MDA) in the gingival crevicular fluid (GCF), an inflammatory exudate from the surrounding tissue of the periodontium, may be useful to clarify the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontal disease. We describe the validation of a method to measure MDA in the gingival crevicular fluid using HPLC. MDA calibration curves were prepared with PBS solution spiked with increasing known concentrations of MDA. Healthy and diseased GCF samples were collected from the same patient to avoid interindividual variability. MDA response was linear in the range measured, and excellent agreement was observed between added and detected concentrations of MDA. Samples' intra- and interday coefficients of variation were below 6.3% and 12.4%, respectively. The limit of quantitation (S/N = 5) was 0.03 μ M. When the validated method was applied to the gingival crevicular fluid, excellent agreement was observed in the MDA quantitation from healthy and diseased sites, and diseased sites presented more MDA than healthy sites ($p < 0.05$). In this study a validated method for MDA quantitation in gingival crevicular fluid was established with satisfactory sensitivity, precision, and accuracy.

Keywords: Lipid peroxidation, malondialdehyde, periodontal diseases, gingival crevicular fluid, HPLC.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are produced as an integral feature of normal cellular metabolism under physiological conditions [1]. The generation of ROS is an important mechanism during phagocytosis as part of the bactericidal reaction [2,3,4]. However, it has been well-established that over-production of ROS occurs at sites of chronic inflammation [4], and uncontrolled production of lipid peroxides can result in oxidative stress. These conditions can contribute to injury of the host tissue [5] and significant damage to cell integrity [6,7] by different mechanisms such as DNA damage, oxidation of important enzymes, lipid peroxidation, and stimulation of proinflammatory cytokine release [8,9].

Lipid peroxidation (LPO) is thought to play an important role in ageing, atherosclerosis [4], late complications of diabetes mellitus [10] such as micro- and macrovascular alterations [11,12], rheumatoid arthritis [13], chronic obstructive pulmonary disease [14], and periodontitis [3,15,16,17,18].

Periodontitis is an infectious inflammatory disease involving the connective tissue and bone that support the teeth, and its primary etiological factor is the biofilm constituted by several pathogenic bacteria. The severity of periodontal disease is determined by the interactions between host defense and pathogens and can lead to periodontal destruction and lost teeth [19,20]. There have been many investigations regarding the systemic conditions and modifier factors that can be involved in the pathogenesis of periodontitis. Recently, more studies have focused on the roles of

antioxidant activity, reactive oxygen species, and lipid peroxidation products in the pathogenesis of periodontitis [18,21]

It has been demonstrated that patients with periodontitis have increased levels of lipid peroxidation in plasma [17,18], saliva [3,22,23], gingival tissue [24], and gingival crevicular fluid [16,17,18]. In addition, these levels have been correlated with periodontal parameters such as gingival index, probing pocket depth, and gingival crevicular fluid volume [16,17]. Interventional studies have demonstrated that conventional periodontal treatment resulted in decreased levels of lipid peroxidation in gingival crevicular fluid, saliva [16,18], and plasma [25], suggesting important roles of ROS and lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontal disease.

Gingival crevicular fluid (GCF) is considered as a serum transudate or, more commonly, as an inflammatory exudate from the surrounding tissue of the periodontium [26]. GCF contains substances from the host such as inflammatory cells and serum-derived factors as well as from microorganisms in the subgingival and supragingival plaque [26,27]. The potential diagnostic value of the gingival crevicular fluid has been well-recognized since early studies reported that the composition of gingival fluid seems promising as a potential medium for the detection of early changes that could indicate the onset of disease [28]. The major interest in GCF as a diagnostic marker is due to the site-specific nature of the sample [29]. Further, it can

be collected from the gingival sulcus surrounding the teeth [26] by a non-invasive procedure, serving as an expedient biological source of patient information [30].

Numerous markers have been investigated for monitoring the production of reactive oxygen species. Malonaldehyde (MDA) is the most-studied product of polyunsaturated fatty acid peroxidation and can be an indicator of oxidative stress increase [7,31]. Several methods have been described in the literature to measure the levels of the adduct formed between MDA and two molecules of thiobarbituric acid, MDA-(TBA)₂ (Fig. 1) [7,16,32,33,34]. However, spectrophotometer or spectrofluorimeter determination of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) has been criticized for a lack of specificity in the precise evaluation of MDA without the interference of other molecules [21,35].

Of the studies that measured MDA in GCF, some used a method to evaluate TBARS or colorimetric assays [16], and two recent studies described a lipid peroxidation assay by a high-performance liquid chromatography (HPLC)-based method [17,18]. However, this is the first study to demonstrate the measurement and validation of MDA in healthy and diseased gingival crevicular fluid including modifications in the assay described by the abovementioned authors, to optimize chromatographic conditions, eliminate interferents that could influence the results of the assay and improve the method sensitivity.

Considering the importance of having a reliable and validated method to identify and quantify a specific product of the lipid peroxidation process in human

gingival crevicular fluid and the possibility to use this measurement as a risk marker of disease, we describe here the validation of a method to quantitate MDA in this matrix using HPLC with photodiode array detection.

MATERIALS AND METHODS

The present study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Araraquara School of Dentistry (UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06).

Sample selection and assessment of periodontal disease

The clinical measurements were performed by a single calibrated examiner ($\kappa = 0.89$) using a Williams periodontal probe PCPUNC15-6 (Hu-Friedy[®], Chicago, IL, USA). The periodontal status was evaluated by probing depth (PD - distance from the gingival margin to the most apical penetration of the probe), clinical attachment level (CAL - distance from the cementoenamel junction to the most apical penetration of the probe), and bleeding on probing (BOP). All measurements were evaluated at six sites per tooth. In the second clinical session, the GCF was collected, to avoid stimulation of the fluid or bleeding during the probing, which would interfere with the sample collection process.

The selected healthy sites had probing depth ≤ 3 mm, without clinical attachment loss and without bleeding on probing. The sites with periodontal disease had probing depth ≥ 4 mm, clinical attachment loss ≥ 4 mm, and bleeding on probing.

Gingival crevicular fluid collection

The GCF samples were collected with standardized paper strips (Periopaper[®], Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA), and the volume of GCF in each strip was measured with specific precalibrated equipment (Periotron[®] 8000; Oraflow Inc.). After supragingival plaque was removed, the sites were isolated with cotton rolls, to avoid saliva contamination, and gently air-dried. GCF was collected by means of a paper strip inserted into each sulcus/pocket and left in place for 1 min. The GCF collection was performed in different nonadjacent teeth. Samples contaminated with blood or saliva were discarded.

Samples from four different healthy sites were collected and pooled in a microtube with 300 μ l of phosphate buffered solution (PBS), and the same procedure was performed in 4 different diseased sites. This procedure was repeated 4 times with new paper strips and the same methodology in the same sites with 5-min intervals. In total, 32 samples were collected, resulting in 16 samples from 4 healthy sites (4 samples at each site) and 16 samples from 4 diseased sites (4 samples at each site) of the same patient, to avoid interindividual variability. Samples from the same site were

pooled in the same PBS solution, resulting in 4 different healthy-site and 4 different diseased-site solutions for MDA quantitation.

Samples were eluted for 40 min on ice and centrifuged at 3000 g for 5 min. The supernatants were transferred to new microtubes and stored at -80°C until the MDA analysis.

MDA assay

Chemicals and reagents

All chemicals used here were of the highest-grade purity commercially available. Chromatography grade methanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents used were acquired from Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). Water was purified in a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA).

Chromatographic conditions

HPLC analyses were carried out with a Shimadzu (Kyoto, Japan) system equipped with two LC-20AT pumps, a photo diode array detector (PDA-20AV), an auto-injector (Proeminence SIL-20AC), and a column oven (CTO-10AS/VP) controlled by a CBM-20A communication module and LC-Solution software. The elution system was as follows: A 150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, Luna C18 (2) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a C18 security guard cartridge, 4.0 mm x 3.0 mm (Phenomenex) was eluted in isocratic mode with a mobile phase consisting of

35% CH₃OH and 65% potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) filtered through a Millipore membrane filter (0.22 μm; Millipore), at a flow rate of 1 ml/min and 30°C. The diode array detector (DAD) was set at 532 nm for detection of the adduct TBA-MDA-TBA obtained from the reaction.

Preparation of MDA stock solution

A solution was prepared with 22 μl of 1,1,3,3-tetramethoxypropane added to 10 ml of H₂SO₄ (1%), and it was left to stand at room temperature for 2 h in a place protected from light to generate MDA from acid hydrolysis of the standard. Then, 10 μl of the MDA stock solution were added to 3 ml of H₂SO₄ (1%). We determined the concentration of the MDA stock solution by reading the absorbance at 245 nm in the spectrophotometer ($\epsilon_{245 \text{ nm}} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Calibration curves

MDA calibration curves were prepared with PBS solutions spiked with known concentrations of MDA. Increasing concentrations of MDA were used—0, 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 μM—and these curves were included in parallel with all samples. These solutions were prepared on the same day of the experiment.

Sample preparation

MDA levels were determined by the method of Hong et al. [36], with slight modification to measure the MDA in the gingival crevicular fluid. The tubes

containing 300 μl of the gingival crevicular fluid in PBS were vortexed, and a volume of 250 μl of these solutions was added to 36 μl of 0.2% BHT and 100 μl of H_3PO_4 , 0.44 M. The tubes were vortexed and left to stand at room temperature for 10 min. The tubes utilized in this experiment had screws to avoid inadvertent opening during the incubation period. After this, 150 μl of a solution containing 0.6% of thiobarbituric acid (TBA) in H_3PO_4 , 0.44 M, were added to all tubes, vortexed, and heated in a dry bath for 45 min at 90°C . After the incubation period, the tubes were cooled at room temperature, and the extraction with 150 μl of n-butanol was carried out by vortex-mixing for 1 min, followed by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min. A volume of 100 μl of the butanol layer was transferred to a vial, and 40 μl were injected into the HPLC system.

RESULTS

A typical calibration curve in the 0.05 – 1 μM range is presented in Fig. 2. The DAD response was linear in the range measured. Method accuracy was determined by the addition of MDA standard to the PBS solution to achieve different samples within this concentration range. Samples were then processed in two different days as described above, and 40 μl of the butanol layer were injected into the HPLC system. Representative chromatograms are shown in Fig. 3. Excellent

agreement was observed between added and detected concentrations of MDA (Table 1).

Method precision was determined by quadruplicate analysis of the same samples used for method accuracy determination. Intra- and interday coefficients of variation (CV) were below 6.3% and 12.4%, respectively (Table 1). The limit of quantitation (S/N = 5) was 0.03 μM .

The validated method was then applied to gingival crevicular fluid in PBS. The periodontal clinical characteristics of the sites from which GCF was collected are presented in Table 2. Four healthy and four diseased samples from the same person were processed. As presented in Table 3 and Fig. 4, a significant increase in MDA concentration was observed in the periodontally diseased gingival crevicular fluid when compared with healthy fluid samples ($p < 0.05$). Similar MDA concentrations were also observed for different sites within each group, showing the method precision when applied to real samples (Table 3).

DISCUSSION

It has been postulated that the levels of oxidative markers are increased in periodontally diseased sites [16,33,37,38]. Further, several studies have shown that increased levels of MDA in gingival crevicular fluid significantly correlate with clinical parameters of periodontal disease [16,17,18]. Investigators have been

attempting to identify the role of oxidative stress products in the inflammation and destruction of the periodontium in periodontal disease. It has been reported that this destruction can be caused or enhanced by reactive oxygen species and active proteases released during inflammatory and host immune responses to bacterial challenge [3,18,30,39].

However, it has not been well-established whether the increased levels of lipid peroxidation (LPO) products in the periodontal region are the cause or a result of periodontitis. Some authors believe that LPO products in gingival crevicular fluid can enhance the inflammatory reaction in periodontitis, but it is also possible that local inflammatory responses in the gingival tissue can generate lipid peroxidation products [18,30]. Nevertheless, whatever the case, an appropriate measurement of lipid peroxidation markers is essential to give accurate and reproducible results. In this study, we describe a reliable and validated method to identify and quantify a specific product of lipid peroxidation in human gingival crevicular fluid by HPLC. By applying this method to real samples, we demonstrated that, in fact, sites with periodontal disease have increased MDA concentrations when compared with healthy sites.

For many years, the analysis of MDA has been widely employed for the assessment of lipid peroxidation in biological systems [31,40]. The measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) has been commonly used as an index of MDA generation and consists of a spectrophotometric or spectrofluorimetric

assay of the products generated when the sample is heated under acidic conditions to form the adduct MDA-(TBA)₂. However, aldehydes other than MDA can react with TBA, and several other pigments may interfere, usually giving an overestimation of the MDA concentrations. For these reasons, the specificity of the TBARS assay has been open to question [35,36,41].

In this way, HPLC has been introduced as a means of improving the specificity and reliability of the measurement [42], since the authentic MDA-TBA₂ chromogen is efficiently separated from other chromogens [3,36,43,44,45,46]. Several HPLC methods have been validated for determination of MDA in plasma [36,41,46]. By these methods, it has been postulated that systemic conditions such as glomerular disease [41], male infertility [47], hyperlipidemia [44], and diabetes mellitus [48,49,50] correlate with increased MDA levels in plasma.

In evaluating lipid peroxidation markers in patients with periodontitis, studies have demonstrated the measurements of these products in saliva [3,22,23], plasma [17,18], gingival tissue [24], and gingival crevicular fluid [16,17,18]. Methods used to measure MDA in GCF are TBARS or colorimetric assays [16], and only two recent studies have evaluated lipid peroxidation using HPLC-based methods [17,18]. However, the method described in the present study for MDA analysis consists of GCF collection, TBA reaction, and HPLC/PDA quantitation of the MDA-TBA adduct. The approach described here has not been utilized previously. Of the few

studies that detected MDA in GCF, none described the sensitivity and validation of their method, nor did they determine the quantitation of MDA in healthy sites.

In addition, the method was directed at GCF, making it distinct from other methods used for MDA measurement in other biological samples, such as saliva or plasma. In this study, the samples were treated with BHT, which is a chain-breaking antioxidant added to suppress peroxidation during the assay and eliminate artefacts due to events taking place during the assay itself [44]. Furthermore, a sample extraction step with n-butanol before injection into the chromatographic system was added to improve the method. The extraction removed interference and extended the lifetime of the column by preventing contaminants from the incubation mixture to be injected [36,46].

The chromatographic conditions we used in the present paper are very similar to those previously used for MDA analysis in plasma [36]. However, the matrix used here for MDA determination is much less complex, consisting of a few microliters of GCF diluted in 300 μ L of PBS buffer, which diminishes the possibility of interference. In addition, the chromatographic peak corresponding to MDA-(TBA)₂ in the samples presented the same retention time and absorbance spectrum of the MDA standard added to the buffer and subsequently reacted with TBA. To test for interference from the reagents, we processed blank samples without GCF in parallel to each set of analyses, and the peak due to MDA-(TBA)₂ was not present.

Further, the reaction volume we used for MDA analysis in GCF was decreased approximately 4-fold, improving method sensitivity. For comparison, a 0.5- μM MDA standard processed by the method described here gave an average peak area of 9104, while the average peak area when the same standard was processed by the method described by Hong et al. [36] was 2069. Method sensitivity allowed for MDA quantitation with excellent accuracy and precision. The sensitivity improvement of the present method (LOQ = 0.03 μM) was necessary for MDA quantitation in concentrations as low as 0.04 - 0.05 μM . This was of fundamental importance for the quantitation of MDA in GCF from healthy sites, which has not been measured previously. The method used for GCF collection, with the improvement in the sensitivity, allowed for the determination of MDA levels with high reproducibility within healthy or diseased sites.

GCF samples collected from 4 different healthy and 4 different diseased sites presented similar MDA concentrations within each group (healthy or diseased), demonstrating the precision of the method when applied to real GCF samples. Further, a significant increase in MDA concentrations was observed in gingival crevicular fluid from periodontally diseased sites compared with samples from healthy sites. These findings are in accordance with those of Tsai et al. [16], who also detected higher MDA levels in sites with periodontal disease in comparison with healthy sites. However, this is the first study to use HPLC to detect MDA in the gingival crevicular fluid of healthy sites. This implies not only a reliable

measurement of MDA even in low concentrations in these biological samples, but also the possibility for use of this measurement as a risk marker of periodontal disease.

In this study, using an HPLC-based assay, an improved method for MDA quantitation in gingival crevicular fluid was established with satisfactory sensitivity, precision, and accuracy. Such a reliable and validated method to measure MDA in human GCF, collected non-invasively, may be very useful in clarifying the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontal disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the financial support from São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) (grant 2007/08362-8) and the Coordination for Improvement of Higher Education Students of the Brazilian Ministry of Education (CAPES).

REFERENCES

- [1] S. Luqman, S.I. Rizvi, Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress, *Phytother. Res.* 20 (2006) 303-306.
- [2] B.M. Babior, Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts), *N. Engl. J. Med.* 298 (1978) 659-668.
- [3] I.L. Chapple, Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases, *J. Clin. Periodontol.* 24 (1997) 287-296.
- [4] B. Halliwell, Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity?, *Oral Dis.* 6 (2000) 136-137.
- [5] C.K. Sen, Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39 (1995) 177-196.

- [6] R.E. Little, B.C. Gladen, Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature, *Reprod. Toxicol.* 13 (1999) 347-352.
- [7] L.J. Marnett, Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde, *IARC Sci. Publ.* (1999) 17-27.
- [8] T. Hemnani, M.S. Parihar, Reactive oxygen species and oxidative DNA damage, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 42 (1998) 440-452.
- [9] T.A. Libermann, D. Baltimore, Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor, *Mol. Cell Biol.* 10 (1990) 2327-2334.
- [10] M.M. Kesavulu, R. Giri, B. Kameswara Rao, C. Apparao, Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications, *Diabetes Metab.* 26 (2000) 387-392.
- [11] E. Velazquez, P.H. Winocour, P. Kesteven, K.G. Alberti, M.F. Laker, Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes, *Diabet. Med.* 8 (1991) 752-758.
- [12] K.Z. Kedziora-Kornatowska, M. Luciak, J. Blaszczyk, W. Pawlak, Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy, *Nephrol. Dial. Transplant.* 13 (1998) 2829-2832.
- [13] P.I. Mapp, M.C. Grootveld, D.R. Blake, Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis, *Br. Med. Bull.* 51 (1995) 419-436.
- [14] W. Macnee, I. Rahman, Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (1999) S58-S65.
- [15] Y.T. Teng, The role of acquired immunity and periodontal disease progression, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14 (2003) 237-252.
- [16] C.C. Tsai, H.S. Chen, S.L. Chen, Y.P. Ho, K.Y. Ho, Y.M. Wu, C.C. Hung, Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis, *J. Periodontal Res.* 40 (2005) 378-384.
- [17] F.A. Akalin, E. Baltacioglu, A. Alver, E. Karabulut, Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis, *J. Clin. Periodontol.* 34 (2007) 558-565.
- [18] D. Wei, X.L. Zhang, Y.Z. Wang, C.X. Yang, G. Chen, Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy, *Aust. Dent. J.* 55 (2010) 70-78.
- [19] D.F. Kinane, P.M. Bartold, Clinical relevance of the host responses of periodontitis, *Periodontol.* 2000. 43 (2007) 278-293.
- [20] D.N. Tatakis, P.S. Kumar, Etiology and pathogenesis of periodontal diseases, *Dent. Clin. North Am.* 49 (2005) 491-516.
- [21] P.M. Abuja, R. Albertini, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clin. Chim. Acta.* 306 (2001) 1-17.

- [22] J. Khalili, H.F. Biloklytska, Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals, *Oral Dis.* 14 (2008) 754-760.
- [23] C.F. Canakci, Y. Cicek, V. Canakci, Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases, *Biochemistry (Mosc).* 70 (2005) 619-628.
- [24] I. Borges, Jr., E.A. Moreira, D.W. Filho, T.B. de Oliveira, M.B. da Silva, T.S. Frode, Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease, *Mediators Inflamm.* 2007 (2007) 45794.
- [25] K. Sonoki, S. Nakashima, Y. Takata, T. Naito, K. Fujisawa, T. Ootsubo, M. Wakisaka, M. Iwase, M. Iida, M. Yokota, Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients, *J. Periodontol.* 77 (2006) 1907-1913.
- [26] I.B. Lamster, J.K. Ahlo, Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098 (2007) 216-229.
- [27] R.J. Waddington, R. Moseley, G. Embery, Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases, *Oral Dis.* 6 (2000) 138-151.
- [28] A.M. Polson, J.M. Goodson, Periodontal diagnosis. Current status and future needs, *J. Periodontol.* 56 (1985) 25-34.
- [29] G.S. Griffiths, Formation, collection and significance of gingival crevice fluid, *Periodontol.* 2000. 31 (2003) 32-42.
- [30] Y. Sakiyama, R. Kato, S. Inoue, K. Suzuki, H. Itabe, M. Yamamoto, Detection of oxidized low-density lipoproteins in gingival crevicular fluid from dental patients, *J. Periodontal Res.* 45 (2010) 216-222.
- [31] D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15 (2005) 316-328.
- [32] K. Yagi, Lipid peroxides and human diseases, *Chem. Phys. Lipids.* 45 (1987) 337-351.
- [33] K. Panjamurthy, S. Manoharan, C.R. Ramachandran, Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10 (2005) 255-264.
- [34] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407-421.
- [35] J.A. Knight, R.K. Pieper, L. McClellan, Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation, *Clin. Chem.* 34 (1988) 2433-2438.
- [36] Y.L. Hong, S.L. Yeh, C.Y. Chang, M.L. Hu, Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method, *Clin. Biochem.* 33 (2000) 619-625.
- [37] H. Sobaniec, M.E. Sobaniec-Lotowska, Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis, *Med. Sci. Monit.* 6 (2000) 875-881.

- [38] M. Sheikhi, R.K. Bouhaf, K.J. Hammarstrom, C. Jarstrand, Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis, *Oral Dis.* 7 (2001) 41-46.
- [39] M. Battino, M.S. Ferreiro, I. Gallardo, H.N. Newman, P. Bullon, The antioxidant capacity of saliva, *J. Clin. Periodontol.* 29 (2002) 189-194.
- [40] L.L. de Zwart, J.H. Meerman, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 202-226.
- [41] J. Templar, S.P. Kon, T.P. Milligan, D.J. Newman, M.J. Raftery, Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method, *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 (1999) 946-951.
- [42] R.P. Bird, S.S. Hung, M. Hadley, H.H. Draper, Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 128 (1983) 240-244.
- [43] I.S. Young, E.R. Trimble, Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *Ann. Clin. Biochem.* 28 (Pt 5) (1991) 504-508.
- [44] S. Chirico, C. Smith, C. Marchant, M.J. Mitchinson, B. Halliwell, Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test, *Free Radic. Res. Commun.* 19 (1993) 51-57.
- [45] K. Fukunaga, K. Takama, T. Suzuki, High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure, *Anal. Biochem.* 230 (1995) 20-23.
- [46] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charao, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 619-624.
- [47] K. Li, X. Shang, Y. Chen, High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility, *Clin. Chim. Acta.* 346 (2004) 199-203.
- [48] S. Nacitarhan, T. Ozben, N. Tuncer, Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 893-896.
- [49] M. Nakhjavani, O. Khalilzadeh, L. Khajeali, A. Esteghamati, A. Morteza, A. Jamali, S. Dadkhahipour, Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol, *Lipids.* 45 (2010) 321-327.
- [50] D.J. VanderJagt, J.M. Harrison, D.M. Ratliff, L.A. Hunsaker, D.L. Vander Jagt, Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications, *Clin. Biochem.* 34 (2001) 265-270.

Table 1: Precision and accuracy of the method for MDA quantitation.*

MDA	MDA (day 1)	MDA (day 2)	Intraday precision (day 1)	Interday precision	Accuracy (day 1)	Accuracy (day 2)
Added (μM)	Detected (μM)	Detected (μM)	CV (%)	CV (%)	(%)	(%)
	N = 4	N = 4	N = 4	N = 8	N = 4	N = 4
0.05	0.0520 \pm 0.0033	0.0568 \pm 0.0089	6.3	12.4	104	114
0.1	0.1329 \pm 0.0045	0.1178 \pm 0.0111	3.4	9.0	133	118
0.5	0.4922 \pm 0.0244	0.4853 \pm 0.0253	5.0	4.8	98	97
1	1.0005 \pm 0.0122	1.0052 \pm 0.0264	1.2	1.9	100	101

*Samples consisted of PBS buffer contaminated with the indicated concentrations of MDA.

Table 2: Characteristics of the sampled sites.

	Probing depth (mm)	Clinical Attachment Level (mm)	Bleeding on Probing (% sites)
Healthy Sites (N = 16)	2.5 \pm 0.5	2.5 \pm 0.5	0
Periodontal diseased sites (N = 16)	5.75 \pm 0.5 *	5.75 \pm 0.5*	100% *

*p<0.05; Mann-Whitney test

Table 3: MDA quantitation in gingival crevicular fluid from healthy and diseased sites.

	Sampled sites	MDA concentration (μM)	Mean MDA concentration (μM)	MDA pmol/min in each site	Inter samples precision CV (%)
GCF of healthy sites (N = 4)	1	0.0482		3.6141	
	2	0.0407	0.0415 ± 0.0082	3.0534	19.8
	3	0.0469		3.5193	
	4	0.0302		2.2655	
GCF of periodontitis sites (N = 4)	1	0.0873		6.5497	
	2	0.0863	$0.0877 \pm 0.0015^*$	6.4755	1.8
	3	0.0872		6.5373	
	4	0.0899		6.7439	

* $p < 0.05$; Mann-Whitney test

Figure 01

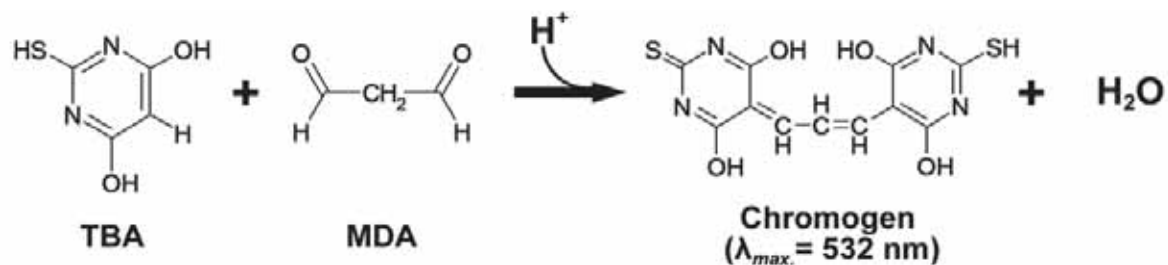
Fig. 1. Scheme of the adduct MDA-(TBA)₂.

Figure 02

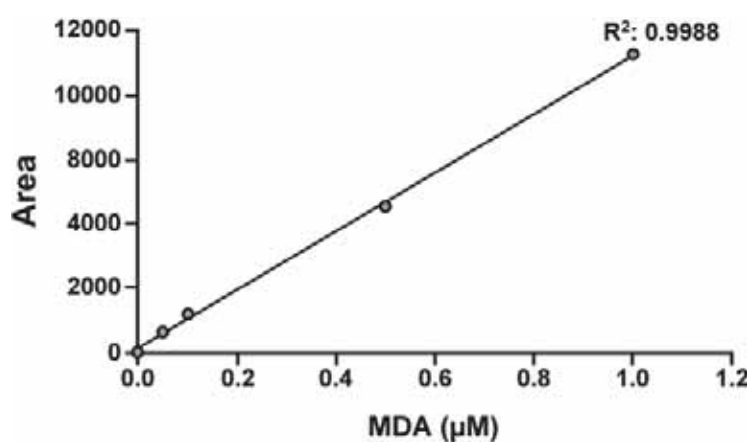


Fig. 2. A typical calibration curve in the 0.05 – 1 µM range with regression line $y = 18191x + 275.48$, $r^2 = 0.9988$.

Figure 03

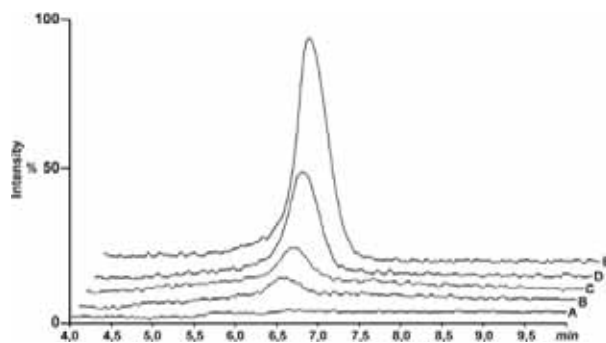


Fig. 3. Typical sample chromatograms showing the elution of MDA-(TBA)₂ at 6 min in the concentration range tested (A, blank; B, 0.05; C, 0.1; D, 0.5; E, 1.0 μM).

Figure 04

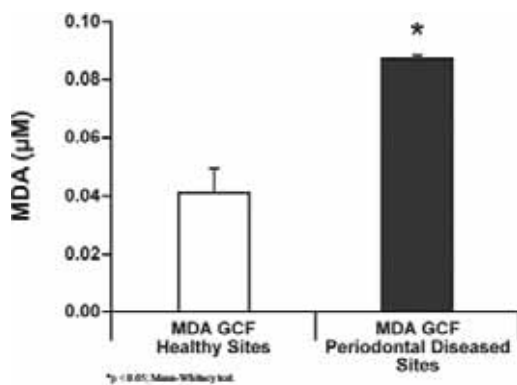


Fig. 4. MDA concentrations in GCF collected from healthy and periodontally diseased sites.

CAPÍTULO 2

Lipid Peroxidation is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes

Alliny de Souza Bastos, Dana T. Graves, Ana Paula de Melo Loureiro, Carlos Rossa Júnior, Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Tanize do Espírito Santo Faulin, Niels Olsen Câmara, Oelisoa M Andriankaja, and Silvana Regina Perez Orrico

Artigo submetido para revista

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Em revisão: JC-11-3397 (R1) 20 Dez 2011

Lipid Peroxidation is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes

Alliny de Souza Bastos¹, Dana T. Graves², Ana Paula de Melo Loureiro³, Carlos Rossa Júnior¹, Dulcinéia Saes Parra Abdalla³, Tanize do Espírito Santo Faulin³, Niels Olsen Câmara⁴, Oelisoa M Andriankaja², and Silvana Regina Perez Orrico¹

¹Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara School of Dentistry – UNESP-State University of São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brazil

²Department of Periodontics, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

³Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Abbreviated Title: Lipid peroxidation, diabetes, periodontitis

Corresponding author:

Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico, e-mail: s-orrico@foar.unesp.br

UNESP – Univ Estadual Paulista; Araraquara School of Dentistry

Department of Diagnosis and Surgery Rua Humaitá, 1680, 2^o andar

CEP: 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (16) 3301-6377 Fax: +55 (16) 3301-6369

Grants- FAPESP 2007/08362-8; NIH DE017732

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Key terms: Lipid peroxidation, diabetes mellitus type 2, periodontal diseases, cytokines

ABSTRACT

Context: Periodontitis is the most common lytic disease of bone and is recognized as a common complication of diabetes. Lipid peroxidation (LPO) is increased in diabetes and may be related to modulation of the inflammatory response. LPO levels in patients with diabetes (DM) and periodontal disease have not been evaluated.

Objective: The aim of this study was to evaluate the association of LPO with periodontal status and to establish a potential mechanism by assessing inflammatory cytokines in type 2 diabetic and non-diabetic patients.

Design and Setting: This is a cross-sectional study of 18 months' duration involving Brazilian patients recruited at the Univ Estadual Paulista.

Patients: The sample was comprised of 120 patients divided into four groups based upon diabetic and dyslipidemic status: poorly controlled diabetics with dyslipidemia, well-controlled diabetics with dyslipidemia, normoglycemic individuals with dyslipidemia, and healthy individuals.

Main Outcome Measure(s): Blood analyses were carried out for fasting plasma glucose, HbA_{1c}, and lipid profile. Periodontal examinations were performed, and gingival crevicular fluid was collected. LPO levels were evaluated by measuring oxLDL (ELISA) and malondialdehyde (MDA, HPLC). Cytokines were evaluated by the multiplex bead technique.

Results: Lipid peroxidation evaluated by MDA in plasma and gingival crevicular fluid was significantly increased in DM groups. Significant correlations between LPO markers and periodontal parameters indicate a direct relationship between these levels and the severity of inflammation and secretion of inflammatory cytokines, particularly in diabetic patients.

Conclusion: These findings indicate an important role for LPO in the severity of the local inflammatory response to bacteria and the susceptibility to periodontal disease in diabetic patients.

Abbreviations: **BMI** – Body Mass Index; **DM** – Diabetes mellitus; **GCF** – Gingival Crevicular Fluid; **HbA_{1c}** – Glycated Hemoglobin A_{1c} fraction; **HDL** – High-density lipoprotein; **LDL** – Low-density Lipoprotein; **LPO** – Lipid peroxidation; **MDA** – Malondialdehyde.

Introduction

Periodontitis is the most common lytic disease of bone and consists of a bacteria-induced inflammatory disorder that involves the structures that support teeth (1, 2). It is the most common cause of tooth loss in adults and affects approximately 10 to 15% of the world's population (3). Periodontitis is initiated by bacteria that induce an inflammatory response in the gingiva. It is the bacteria-stimulated inflammation that leads to breakdown of bone that supports the teeth, which is a hallmark of periodontitis (4-6).

The link between diabetes and oral diseases has not been widely discussed in the medical literature (5). However, it has been reported that periodontitis is one of the first clinical manifestations of diabetes (7) and is recognized as a common complication in diabetic patients (8), particularly in poorly controlled diabetics (9). As an infectious-initiated inflammatory condition, periodontal disease may result in a systemic chronic inflammatory challenge that may have a significant impact on metabolic control in diabetics (10).

A potential mechanism through which diabetes is linked to periodontitis and other inflammatory conditions associated with diabetes is the increased production of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation products (11, 12). However, the role of lipid peroxidation in both conditions, diabetes and periodontal disease, has received relatively little attention.

Diabetes may contribute to the destructive aspects of the host response that leads to periodontal disease through the generation of reactive oxygen species (ROS) (11, 13, 14) . Over-production of ROS is also thought to contribute to several diabetic complications, including vascular disease (15-17). ROS are unstable, with a short half-life, and thus are difficult to detect (14). Several markers of lipid peroxidation have been studied to monitor ROS production. Malondialdehyde (MDA) is one of the most studied end-products of lipid peroxidation and is often used as a surrogate marker of oxidative stress (18) . To investigate the link among diabetes, lipid peroxidation, and inflammation, we assessed periodontal disease as an indicator of the severity of inflammation in a host-microbe interface. We examined the local and systemic levels of lipid peroxidation in type 2 diabetic patients with dyslipidemia. We also evaluated the effect of lipid peroxidation on periodontal status and investigated a potential mechanism, the expression of inflammatory markers in local tissues.

Materials and Methods

Study population

The present study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Araraquara School of Dentistry (UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06) and was carried out between May 2009

and November 2010. All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and they provided their written consent to participate.

As inclusion criteria, all study participants ranged in age from 35 to 60 yr and had at least 15 natural teeth. All individuals had clinical chronic periodontal disease as defined by the American Academy of Periodontology (19), with local signs of inflammation and tissue destruction (presence of deep periodontal pockets ≥ 6 mm) and loss of the connective tissue attachment of gingiva to teeth (clinical attachment loss ≥ 4 mm) in at least 4 non-adjacent teeth. Patients were excluded based on the following criteria: history of antibiotic therapy in the previous 3 months and/or non-steroidal anti-inflammatory drug therapy in the previous 6 months, pregnancy or use of contraceptives or any other hormone, current smoker or former smoker, history of anemia, periodontal treatment or surgery in the preceding 6 months, use of hypolipemic drugs such as statins or fibrates, and history of diseases that interfere with lipid metabolism, such as hypothyroidism and hypopituitarism.

A power analysis based on a pilot study determined that at least 20 patients in each group would be sufficient to detect a 3-unit difference in MDA levels with 90% power and 95% confidence interval. To compensate for the possibility of drop-out during the experimental period, the experimental groups consisted of 30 patients each. The population was divided into four groups based upon diabetic and dyslipidemic status: poorly controlled diabetics with dyslipidemia (Group 1), well-

controlled diabetics with dyslipidemia (Group 2), normoglycemic individuals with dyslipidemia (Group 3), and healthy individuals (Group 4) (Table 1).

Clinical record and physical evaluation

The individuals answered a structured questionnaire about demographic characteristics, and a trained examiner collected information regarding time since diabetes onset, medication used to control glucose, and the presence of at least one complication associated with diabetes. Abdominal circumference (cm) and height (m) were measured as part of a physical examination, which allowed the body mass index (BMI) to be calculated.

Parameters of metabolic control and lipoprotein profile

Blood samples were collected after a 12-hour overnight fast for the evaluation of fasting plasma glucose (mg/dl) by modified Bondar e Mead method, glycated haemoglobin (HbA_{1c}) by enzymatic immunoturbidimetry, high-sensitivity C-reactive protein by the nephelometric method, total cholesterol (TC), triglycerides (TGs), and HDL by enzymatic methods. LDL was determined by the Friedewald formula. To avoid the inclusion of individuals with transitory dyslipidemia, the cutoff points used were the highest values according to the National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III): TC \geq 240 mg/dL, LDL \geq 160 mg/dL, HDL \leq 40 mg/dL, and TGs \geq 200 mg/dL. Metabolic control was considered as adequate when HbA_{1c} $<$ 8% and as inadequate when HbA_{1c} \geq 8%. Insulin resistance was also

evaluated for insulin levels by the chemiluminescence method (uUI/mL) for calculation of the HOMA index (HOMA IR) (20).

Periodontal clinical examination

All patients were subjected to a periodontal clinical examination performed in six sites per tooth by a single trained calibrated examiner ($\kappa = 0.89$). Periodontal pocket depth, clinical attachment loss, and bleeding on probing were evaluated with a periodontal probe PCPUNC15-6 (Hu-Friedy®). Severe periodontal disease was defined as the presence of deep periodontal pockets ≥ 6 mm with clinical attachment loss ≥ 5 mm and bleeding on probing in at least 8 sites distributed in different quadrants of the dentition (21).

Gingival crevicular fluid (GCF) collection

Gingival crevicular fluid (GCF) is considered as a serum transudate or, more commonly, as an inflammatory exudate from the gingival sulcus surrounding the teeth. GCF contains substances from the host, such as inflammatory cells and serum-derived factors, as well as from microorganisms. The potential diagnostic value of the GCF is due to the site-specific nature of the sample, and it can be collected non-invasively, serving as an expedient biological source of patient information.

In each patient, 4 different healthy sites (probing depth ≤ 3 mm, no loss of attachment, and no bleeding on probing) and 4 periodontally diseased sites (probing depth ≥ 5 mm, loss of attachment ≥ 4 mm, and with bleeding on probing) were

randomly chosen in different non-adjacent teeth for GCF collection. Collection of gingival crevicular fluid was performed as previously described (22) with paper strips (Periopaper[®], Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA), and the volume of gingival crevicular fluid was measured with a specific instrument (Periotron[®], Oraflow Inc.). The samples from each patient were pooled in 2 different tubes, representing healthy and diseased sites, centrifuged at 3000 g for 5 min, and the supernatants were stored at -80°C until the analysis of MDA and cytokines.

Blood collection

Blood samples were collected in tubes with EDTA centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. Plasma was obtained and stored at -80°C until the lipid peroxidation analyses. The assays were performed by professionals blinded to the patients' conditions.

Inflammatory biomarker assays

The concentration of 3 inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid, as tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-10, and IL-6, was analyzed by multiplex beads (Bio-Plex system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Lipid peroxidation assays

Oxidized LDL assay in plasma samples

The levels of oxLDL in plasma were analyzed with a commercially available ELISA kit (Mercodia AB[®], Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions.

MDA assay

The assessment of MDA in plasma and gingival crevicular fluid was determined by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) with a reverse-phase HPLC column (C18; 4.6 x 150 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and compared with MDA standard curves. Plasma and gingival crevicular fluid samples were prepared as described previously (23).

Statistical analysis

The distribution and normality of the variables were evaluated by the D'Agostino-Pearson test. The general characteristics of each group were described with mean and standard deviation (SD), and the inflammatory cytokines were expressed as median (25% /75% quartiles). The differences between the groups for parametric data were evaluated by ANOVA, followed by Bonferroni's post-test, and non-parametric data were evaluated by the Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test or. Pearson's partial correlation coefficient was used for normally distributed data, or Spearman's partial correlation coefficient was used for non-normally distributed data, to investigate the correlations between the

various parameters adjusted for age, gender, and BMI. To determine the influence of lipid peroxidation and diabetic status on the severity of periodontal disease and on the expression of local cytokines, separate multivariable logistic and linear regression models were built for each independent variable. Variables found to be associated with the independent and dependent variables, and thus possible confounding factors, were included in the models. Moreover, regardless of their statistical significance, all variables known to have biologic linkage with the outcomes were retained. The significance level was set at $\alpha=0.05$. All analyses were carried out with SPSS software, IBM version 19.

Results

Sample population

In total, 1728 patients were screened, and 120 were identified as meeting the study inclusion criteria; of these, 30 patients assigned to 4 different groups. The general characteristics of the sample are demonstrated in Table 1. There were no age and gender differences between the groups. Diabetics had significantly higher values of BMI and abdominal circumference ($p<0.05$). Among all diabetics, there was no difference in the age of diabetes onset. However, poorly controlled diabetics had more diabetic complications, with the most common complication being retinopathy, followed by nephropathy. Glucose metabolism, metabolic control, insulin resistance,

lipoprotein profile, and high-sensitivity C-reactive protein for all groups are presented in Table 1. The groups with diabetes had increased levels of fasting glucose, HbA_{1c}, and insulin resistance compared with non-diabetic patients, and groups 1, 2, and 3 all presented dyslipidemia with increased total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides compared with group 4 (healthy individuals) ($p < 0.05$).

Periodontal evaluation

Periodontal tissue destruction and local inflammation were significantly more severe in diabetics, particularly in group 1 (Fig. 1A and supplemental Table1), indicating that poorly controlled diabetes aggravates local host response to microorganisms in the dental biofilm. Relevant clinical periodontal parameters that were significantly different between the groups are illustrated in Fig. 1B in terms of fold change. Each patient group was compared with group 4 (healthy individuals). Chronic periodontitis, as evaluated by the presence of deep periodontal pockets (≥ 6 mm), was increased four-fold in poorly controlled diabetics with dyslipidemia and two-fold in well-controlled diabetics with dyslipidemia. Acute infection, evaluated by the presence of suppuration, and acute inflammation, evaluated by bleeding on probing, were increased 3.5- and 1.3-fold, respectively, in poorly controlled diabetics with dyslipidemia.

Immunological analysis

To assess local inflammation, the expression of TNF- α , IL-6, and IL-10 was measured in gingival crevicular fluid. The cytokine expression was normalized to the volume of gingival crevicular fluid collected and expressed in concentration (pg/ μ l). All cytokines were increased in the gingival crevicular fluid of diabetic patients, being significant in the group with poorly controlled diabetes and dyslipidemia ($p < 0.05$), indicating that diabetes aggravates the local inflammatory response to microorganisms in the dental biofilm (Table 2).

Lipid peroxidation levels

Plasma Malondialdehyde (MDA) and Oxidized LDL (oxLDL)

Plasma MDA levels were slightly increased in dyslipidemic patients, but the presence of diabetes resulted in significantly increased systemic oxidative metabolism ($p < 0.05$) (Fig. 2A). However, the most increased levels of plasma MDA were observed in poorly controlled diabetics with dyslipidemia who had about 2.5 times higher MDA levels when compared with those in the non-diabetic groups and approximately 1.5 times higher MDA levels when compared with well-controlled diabetics with dyslipidemia. OxLDL was increased in all groups with dyslipidemia (Groups 1, 2, and 3) (Fig. 2A).

In relation to local lipid peroxidation, evaluated by MDA in the gingival crevicular fluid, the patients with diabetes presented significantly higher levels of

MDA when compared with those in the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 2B). The mean levels of MDA in the diseased sites of the poorly controlled diabetics were 2.3 greater than in the normoglycemic with dyslipidemia group ($p < 0.001$), approximately 1.8 times higher than in the healthy group ($p < 0.05$), and about 1.6 times higher in the well-controlled diabetics with dyslipidemia ($p < 0.05$) (Fig. 2B). Moreover, even the gingival crevicular fluid of healthy sites in the groups with diabetes presented higher levels of MDA when compared with the healthy gingival crevicular fluid of normoglycemic groups.

Correlations

Correlations among lipid peroxidation markers, diabetes status, lipoprotein profile, clinical periodontal parameters, and local cytokine levels were assessed (Table 3). There was no independent association between lipoprotein profile and a greater severity of periodontal disease in individuals with periodontitis. Diabetes was significantly associated with lipid peroxidation markers, and this was the strongest positive correlation observed ($r = 0.65$, $p < 0.0001$). Even though we cannot infer causal relationships by correlations, this association could represent an additive effect in the aggravation of inflammation in diabetics, as indicated by the positive correlations observed between diabetes markers and periodontal disease parameters. The positive associations between systemic levels of lipid peroxidation and the levels of inflammatory cytokines in the gingival crevicular fluid (Table 3) support a role for increased oxidative metabolism in the aggravation of inflammation.

Considering the correlation between systemic levels of lipid peroxidation, a significant intermediate correlation between MDA in plasma and oxidized LDL ($r=0.460$; $p<0.01$) was observed. In addition, there was a statistically significant but weak correlation between plasma and local levels of MDA ($r=0.33$; $p<0.01$) and between plasma-oxidized LDL and local levels of MDA ($r=0.32$; $p<0.01$).

Regressions

Regression analyses were performed to obtain insight into the role of diabetes and lipid peroxidation in local inflammatory responses. Table 4A represents the results from multiple regression analysis using separate models for independent variables, lipid peroxidation parameters, and diabetes status. Lipid peroxidation markers were directly related to the severity of local inflammation, represented by all clinical measures of periodontal disease (except for bleeding on probing) after adjustment for age, gender, BMI, and triglycerides. Diabetes was also directly related to the severity of local inflammation. Table 4B represents the results from a multivariate logistic regression analysis using separate models and taking into account the effects of age, gender, BMI, and triglycerides. There was an approximate 1.81- and two-fold increase in the odds of having severe bleeding on probing and deep periodontal pockets, respectively, among those patients who have higher plasmatic levels of MDA. This finding suggests a link between periodontal inflammation/destruction and plasma MDA levels.

A potential mechanistic insight into this linkage is the demonstration of a positive relationship among periodontal inflammation, diabetes, and lipid peroxidation by a regression analysis using the levels of inflammatory cytokines in the gingival crevicular fluid as the dependent variable (Tables 5A, 5B). In particular, plasma levels of MDA were correlated with a more than two-fold increase in the odds ratio of high IL-6 and TNF- α levels in GCF.

Discussion

This is the first study to investigate the impact of systemic and local lipid peroxidation levels on periodontal inflammation and periodontal disease in patients with and without diabetes and dyslipidemia. The results offer new insight into the association of diabetes and dyslipidemia that, by generating lipid peroxidation products, can affect the magnitude of a microbially triggered inflammatory process increasing tissue destruction, represented in this study by a greater severity of periodontal disease.

It has been stated that, in diabetes, there is a magnification of the inflammatory response to pathogens and their products (24). More extensive periodontal tissue loss caused by diabetes has been linked to persistence of the inflammatory infiltrate in diabetic compared with normoglycemic conditions (25), impaired wound healing, (26) reduced connective tissue formation (27), increased periodontal bone loss as result of enhanced resorption and diminished bone formation

(28, 29), and increased oxidative metabolism (30, 31). In addition, diabetic dyslipidemia combines a cluster of lipid abnormalities (32) that predispose the patient to a hyperinflammatory status by modulating the function and activity of macrophages that promote enhanced inflammation (33).

Results presented here demonstrate that there is an increased production of lipid peroxidation in patients with diabetes that is strongly correlated with elevated fasting glucose, HbA_{1c}, and dyslipidemia parameters such as levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides. In addition, there was also a positive correlation between local and systemic markers of lipid peroxidation and periodontal clinical parameters, indicating that the higher the level of lipid peroxidation, the more severe the periodontal tissue inflammation. Within this context, it can be suggested that LPO has an important role in the severity of the inflammatory process that was observed by loss of attachment, deep periodontal pockets ($\geq 6\text{mm}$), bleeding on probing, and suppuration.

We found that greater severity of inflammatory periodontal disease parameters was not associated with the lipid profile in the studied sample of patients with periodontal disease, in contrast to previous studies suggesting that dyslipidemia itself can be associated with a worse periodontal status (34). In fact, when diabetes was coupled with dyslipidemia, compared with individuals in the 'normoglycemic with dyslipidemia' group, increased severity of inflammation was observed, represented by greater periodontal tissue damage and local production of

inflammatory cytokines. Our findings suggest that diabetes may alter oxidative metabolism, increasing lipid peroxidation. This increase in oxidative metabolism and lipid peroxidation may represent an additive effect to the metabolic imbalance associated with diabetes in the modulation of the inflammatory response. In this sense, dyslipidemia may have a relevant impact on the inflammatory response in the presence of diabetes-increased oxidative metabolism.

LPO can contribute to injury of the host tissue by several mechanisms, including DNA damage, oxidation of enzymes, stimulation of proinflammatory cytokines (15), degenerative changes including necrosis in the region of inflammatory infiltrate, and the presence of superoxide anions in areas adjacent to osteoclasts, leading to bone resorption (35). Several sources can generate lipid peroxidation products, such as lipids in plasma and in cell membranes and the accumulation of advanced glycation end-products (AGEs) (36) in various organs, including the gingiva (30). AGEs binding with their pattern-recognition receptors (RAGE) can actively participate in inflammation and immune responses, thereby causing the activation of a range of inflammatory and fibrotic pathways, triggering the host response and altering the structure and function of cellular membranes (30, 36), causing the overproduction of reactive oxygen species (ROS) (37).

Increased oxidative metabolism and accumulation of AGEs are involved in the pathogenesis of chronic inflammatory conditions commonly observed in diabetic patients, such as atherosclerosis (15), micro- and macrovascular alterations (16, 17),

and periodontitis (11, 13, 14, 38). Some mechanisms can be suggested to elucidate the role of LPO in the severity of an inflammatory condition in diabetic and dyslipidemic patients. In the course of an infectious/inflammatory condition, the overproduction of LPO can enhance the inflammatory reaction during the activation of neutrophils and macrophages by pathogens or their products in the tissue (14, 39), releasing proinflammatory cytokines (1). In addition, lipid peroxides can also activate transcription factors such as nuclear factor- κ B (37). NF- κ B can be activated by oxidative stress (37), stimulate the release of proinflammatory and apoptotic mediators, and enhance endothelial expression of vascular cell adhesion molecules (15), resulting in a cascade of cell activation and diffuse inflammation.

Previous studies reported that oxidative stress induced by diabetic status triggers the release of cytokines and enhances their activation (40), and that diabetics, especially those with poor metabolic control, have increased levels of inflammatory cytokines in plasma and in gingival crevicular fluid (24). Our findings of significant correlations between plasma levels of MDA and the expression of local (gingival crevicular fluid) cytokines, especially TNF- α , have not been reported previously and suggest that systemic and local lipid peroxidation can increase the odds of expression of inflammatory markers in the inflamed site.

Thus, the results of our study suggest that lipid peroxidation may play a crucial role in the initiation and/or progression of the inflammatory response. Increased oxidative metabolism and lipid peroxidation, and not merely dyslipidemia,

aggravate the inflammatory response. If this association is proved causal by experimental studies, targeting the oxidative metabolism and its downstream effects may be an alternative therapeutic approach to manage diabetes-associated inflammatory complications.

Acknowledgments

This study was supported by financial support from the São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) (grant 2007/08362-8), by the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel of the Brazilian Ministry of Education (CAPES), and by a grant from the NIH (DE017732).

References

1. **Graves DT, Kayal RA** 2008 Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci* 13:1227-1239
2. **Lamster IB, Ahlo JK** 2007 Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann NY Acad Sci* 1098:216-229
3. **Baelum V, Lopez R** 2004 Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol* 32:239-249
4. **Griffiths R, Barbour S** 2010 Lipoproteins and lipoprotein metabolism in periodontal disease. *Clin Lipidol* 5:397-411
5. **Lalla E, Papapanou PN** 2011 Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol* 7:738-748
6. **Graves DT, Li J, Cochran DL** 2011 Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 90:143-153

7. **Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW** 2008 The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 139(Suppl):19S-24S
8. **Löe H** 1993 Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16:329-334
9. **Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC** 2007 Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 34:118-123
10. **Mealey BL, Oates TW** 2006 Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 77:1289-1303
11. **Chapple IL** 1997 Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 24:287-296
12. **Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR** 2005 Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 10:255-264
13. **Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E** 2007 Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 34:558-565
14. **Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC** 2005 Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 40:378-384
15. **Halliwell B** 2000 Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis* 6:136-137
16. **Velazquez E, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KG, Laker MF** 1991 Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med* 8:752-758
17. **Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W** 1998 Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 13:2829-2832
18. **Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N** 2005 A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15:316-328
19. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol* 4:i, 1-112
20. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** 1985 Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419

21. **Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN** 2011 A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol* 38:142-147
22. **Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A** 2000 Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 71:1535-1545
23. **Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML** 2000 Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem* 33:619-625
24. **Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y** 2007 The periodontal host response with diabetes. *Periodontol* 2000 43:245-253
25. **Graves DT, Liu R, Oates TW** 2007 Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol* 2000 45:128-137
26. **Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, Behl Y, Alikhani M, Yang J, Braasch C, Graves DT** 2010 Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 53:378-388
27. **Desta T, Li J, Chino T, Graves DT** 2010 Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res* 89:609-614
28. **Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT** 2006 Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 85:510-514
29. **Graves DT, Li J, Cochran DL** Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 90:143-153
30. **Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, Brett JG, Lamster IB** 1996 Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res* 31:508-515
31. **Allen EM, Matthews JB, DJ OH, Griffiths HR, Chapple IL** 2011 Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 38:894-901
32. **Chahil TJ, Ginsberg HN** 2006 Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35:491-510, vii-viii

33. **Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J** 1996 Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1573-1579
34. **Fentoglu O, Oz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykac Y, Bozkurt FY** 2009 Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol* 80:267-273
35. **Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME** 2000 Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 6:875-881
36. **Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP** 1989 Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus? *Med Hypotheses* 29:47-50
37. **Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D** 1994 Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897
38. **Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G** 2010 Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* 55:70-78
39. **Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarström KJ, Jarstrand C** 2001 Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis* 7:41-46
40. **Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliari L, Ceriello A, Giugliano D** 2002 Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 106:2067-2072

TABLE 1. Characteristics of the sample: demographic, physical, laboratory, and diabetes data (mean \pm SD)

	GROUP 1 (DM \geq 8% / dyslip)	GROUP 2 (DM <8% / dyslip)	GROUP 3 (without DM / with dyslip)	GROUP 4 (without DM / without dyslip)
Gender (F / M)	18 / 12	20 / 10	17 / 13	19 / 11
Age (mean \pm SD)	48.0 (\pm 7.6)	50.3 (\pm 6.7)	49.0 (\pm 7.5)	45.9 (\pm 5.9)
Ethnicity (white/brown/black)	13 / 10 / 7	15 / 11 / 4	20 / 8 / 2	14 / 11 / 5
BMI (m/kg²)	30.5 (\pm 5.2) [#]	31.4 (\pm 4.1) [#]	28.4 (\pm 3.8)	27.3 (\pm 6.4)
Abdominal circumference (cm)	104.3 (\pm 14.6) [#]	109.3 (\pm 10.8) [#]	98.1 (\pm 9.9)	98.2 (\pm 16.9)
Fasting glucose (mg/dl)	226.6 (\pm 74.2) ^{††}	137.5 (\pm 41.4) [‡]	90.0 (\pm 6.4)	90.8 (\pm 7.3)
HbA_{1c} (%)	10.4 (\pm 1.9) ^{**}	6.6 (\pm 0.9) ^{§#}	5.4 (\pm 0.6)	5.1 (\pm 0.6)
Insulin (U/L)	19.7 (\pm 20.9) [#]	21.1 (\pm 21.5) [#]	12.6 (\pm 8.5)	11.1 (\pm 12.7)
HOMA IR Index	9.03 (\pm 8.11) [‡]	6.51 (\pm 4.98) ^{§#}	2.82 (\pm 1.90)	1.81 (\pm 1.01)
Total cholesterol (mg/dl)	242.7 (\pm 37.8) ^{##}	243.4 (\pm 42.9) ^{##}	246.1 (\pm 42.3) ^{##}	171.6 (\pm 18.5)
HDL cholesterol (mg/dl)	44.8 (\pm 9.5)	46.1 (\pm 10.5)	50.7 (\pm 11.1)	48.4 (\pm 12.6)
LDL cholesterol (mg/dl)	153.4 (\pm 37.0) ^{##}	147.3 (\pm 44.3) ^{##}	156.4 (\pm 44.1) ^{##}	103.8 (\pm 17.4)
Triglycerides (mg/dl)	216.9 (\pm 94.6) ^{##}	249.8 (\pm 104.1) ^{##}	194.1 (\pm 80.6) [#]	93.9 (\pm 35.9)
Hs C-Reactive Protein	0.5 (\pm 0.5)	0.7 (\pm 0.6) [#]	0.4 (\pm 0.4)	0.4 (\pm 0.6)
Time since DM onset (years) (mean \pm SD)	6.2 (\pm 4.2)	5.2 (\pm 6.6)	-	-
Presence of diabetes				
Complication	19 ⁺	12	-	-
One	09	09	-	-
More than one	10	03	-	-
Medication for DM control:				
Hypoglycemic	20	15	-	-
Insulin	1	1	-	-
Hypoglycemic / Insulin	8	5	-	-
None	1	9	-	-

+ p < 0.05 in relation to group 2 (Mann-Whitney Test; α =5%). † p < 0.05 in relation to group 2; ‡ p < 0.0001 in relation to groups 3 and 4.

* p < 0.05 in relation to the other groups; ** p < 0.0001 in relation to the other groups.

§ p < 0.05 in relation to group 3; # p < 0.05 in relation to group 4; ## p < 0.0001 in relation to group 4 (Kruskal-Wallis Test; α =5%)

TABLE 2. Local cytokine expression in gingival crevicular fluid [Median (25th / 75th percentiles)]

	GROUP 1 (DM ≥8% / dyslip)	GROUP 2 (DM <8% / dyslip)	GROUP 3 (without DM / with dyslip)	GROUP 4 (without DM / without dyslip)
IL-6 (pg/μl)	0.92 (0.35 / 1.7) [#]	0.45 (0.05 / 1.0)	0.55 (0.16 / 0.78)	0.55 (0.14 / 0.78)
IL-10 (pg/μl)	0.19 (0.10 / 0.62) [#]	0.14 (0.01 / 0.23)	0.15 (0.02 / 0.30)	0.12 (0.01 / 0.18)
TNF-α (pg/μl)	0.34 (0.14 / 1.8) [#]	0.28 (0.06 / 0.65)	0.25 (0.06 / 0.75)	0.13 (0.05 / 0.33)

[#]p < 0.05 in relation to group 4 (Kruskal-Wallis test; α=5%).

TABLE 3. Adjusted correlation between lipid peroxidation and diabetes status, lipoprotein profile, periodontal parameters, and GCF cytokines

	PARAMETER	Plasma MDA [#]	GCF MDA Periodontally Diseased Sites [#]	Oxidized LDL [#]
Diabetic status	Fasting glucose (mg/dl)	0.66**	0.39**	0.35**
	HbA _{1c}	0.65**	0.33**	0.43**
Lipoprotein profile	Total cholesterol (mg/dl)	0.24*	0.16	0.60**
	LDL cholesterol (mg/dl)	0.23*	0.14	0.60**
	Triglycerides (mg/dl)	0.22*	-0.03	0.53**
Clinical periodontal Parameters	Percentage of sites with bleeding on probing	0.30*	0.34*	0.12
	Percentage of sites with probing depth \geq 6mm	0.25*	0.34*	0.13
	Percentage of sites with suppuration	0.32*	0.162	0.32*
Local inflammatory markers	IL-6 GCF (pg/ μ l)	0.30*	0.28*	0.14
	IL-10 GCF (pg/ μ l)	0.28*	0.29*	0.25*
	TNF- α GCF (pg/ μ l)	0.41*	0.30*	0.25*

*p<0.05; ** p< 0.0001 (r; Pearson's or Spearman's correlation coefficient; α =5%).

[#]Adjusted for age, gender, and BMI.

HbA_{1c}, glycated hemoglobin; GCF MDA, malondialdehyde in gingival crevicular fluid of periodontally diseased sites.

TABLE 4A. Multiple-regression model with the influence of lipid peroxidation and diabetes status on parameters of severe periodontal disease

		Bleeding on Probing (% sites) [#]			Probing Depth ≥ 6mm (% sites) [#]		
		β	SE	95%CI	β	SE	95%CI
LPO parameter	MDA PL	4.71*	1.43	(1.88 - 7.53)	5.08*	1.19	(2.72- 7.44)
	MDA PD GCF	2.32*	0.61	(1.11 - 3.53)	2.13*	0.52	(1.10- 3.16)
	Ox LDL PL	0.23	0.15	(-0.07- 0.53)	0.40*	0.13	(0.15- 0.69)
Diabetes status	Fasting glucose	0.09**	0.02	(0.05- 0.13)	0.08**	0.02	(0.04- 0.11)
	HbA _{1c}	2.52**	0.54	(1.44- 3.59)	2.71**	0.44	(1.84- 3.58)
	HOMA IR	0.38*	0.18	(0.02- 0.73)	0.16	0.16	(-0.16- 0.47)

TABLE 4B. Multivariate Logistic Regression model with the influence of lipid peroxidation and diabetes status of parameters of severe periodontal disease.

		Bleeding on Probing (% sites) [#]			Probing Depth ≥ 6mm (% sites) [#]		
		OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI
LPO parameter	MDA PL	1.81	0.02*	(1.12-2.92)	2.01	0.004*	(1.25-3.23)
	MDA PD GCF	1.36	0.003*	(1.11-1.65)	1.31	0.009*	(1.07-1.60)
	Ox LDL PL	1.03	0.13	(0.99-1.08)	1.07	0.007*	(1.02-1.13)
Diabetes Status	Fasting glucose	1.01	0.005*	(1.0-1.02)	1.01	0.006*	(1.0-1.02)
	HbA _{1c}	1.36	0.002*	(1.12-1.66)	1.46	0.0001**	(1.21-1.77)
	HOMA IR	1.08	0.08	(1.0-1.17)	1.0	0.88	(0.95-1.06)

*p<0.05; ** p< 0.0001. # Adjusted for age, gender, BMI, TGL. β partial standardized regression coefficient.

LPO, lipid peroxidation; MDA PL, malondialdehyde in plasma; MDA GCF PD, malondialdehyde in gingival crevicular fluid of periodontally diseased sites; Ox LDL PL, oxidized LDL in plasma; HbA_{1c} (glycated hemoglobin); HOMA IR, Insulin resistance

TABLE 5A: Multiple Regression model with the influence of lipid peroxidation and diabetes status on the expression of local cytokines

		IL-6 [#]			TNF- α [#]			IL-10 [#]		
		β	SE	95%CI	β	SE	95%CI	β	SE	95%CI
LPO parameter	MDA PL	0.32**	0.06	(0.01-0.34)	0.44**	0.06	(0.2- 0.45)	0.29*	0.17	(0.02- 0.1)
	MDA PD GCF	0.251*	0.27	(0.20 – 0.13)	0.31*	0.03	(0.04-0.16)	0.25*	0.01	(0.010- 0.04)
	Ox LDL PL	0.25*	0.01	(0.01- 0.03)	0.40**	0.007	(0.01- 0.04)	0.31*	0.01	(0.002-0.01)
Diabetes Status	Fasting glucose	0.30*	0.13	(0.12 – 0.63)	0.37**	0.01	(0.18-0.5)	0.22*	0.04	(0.01- 0.18)
	HbA _{1c}	0.38**	0.13	(0.31-0.82)	0.30*	0.15	(0.18-0.75)	0.32*	0.04	(0.07 -0.30)
	HOMA IR	0.35**	0.01	(0.01 -0.05)	0.33*	0.15	(0.18-0.73)	0.33**	0.01	(0.0-0.01)

TABLE 5B. Multivariate Logistic Regression model of the effects of lipid peroxidation and diabetes status on the expression of local cytokines

		IL-6 [#]			TNF- α [#]			IL-10 [#]		
		OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI
LPO parameter	MDA PL	2.06	0.003*	(1.28-3.30)	2.24	0.002*	(1.35-3.71)	1.17	0.45	(0.78-1.77)
	MDA PD GCF	1.32	0.004*	(1.09- 1.60)	1.21	0.049*	(1.01-1.48)	1.25	0.02*	(1.04-1.51)
	Ox LDL PL	1.04	0.06	(1.00-1.09)	1.10	0.001*	(1.04-1.17)	1.04	0.04*	(1.01 -1.1)
Diabetes status	Fasting glucose	1.01	0.003*	(1.003-1.02)	1.01	0.0001**	(1.01-1.02)	1.01	0.10	(0.1- 1.0)
	HbA _{1c}	1.31	0.003*	(1.09-1.56)	1.28	0.005*	(1.08-1.52)	1.11	0.21	(0.95-1.3)
	HOMA IR	1.07	0.07	(1.0-1.16)	1.08	0.04*	(1.04-1.15)	1.03	0.22	(0.98-1.0)

*p<0.05; ** p< 0.0001. [#] Adjusted for age, gender, BMI, TGL. β partial standardized regression coefficient.

LPO, lipid peroxidation; MDA PL, malondialdehyde in plasma; MDA GCF PD, malondialdehyde in gingival crevicular fluid of periodontally diseased sites; Ox LDL PL, oxidized LDL in plasma; HbA_{1c} glycosylated hemoglobin; HOMA IR, Insulin resistance.

FIGURES

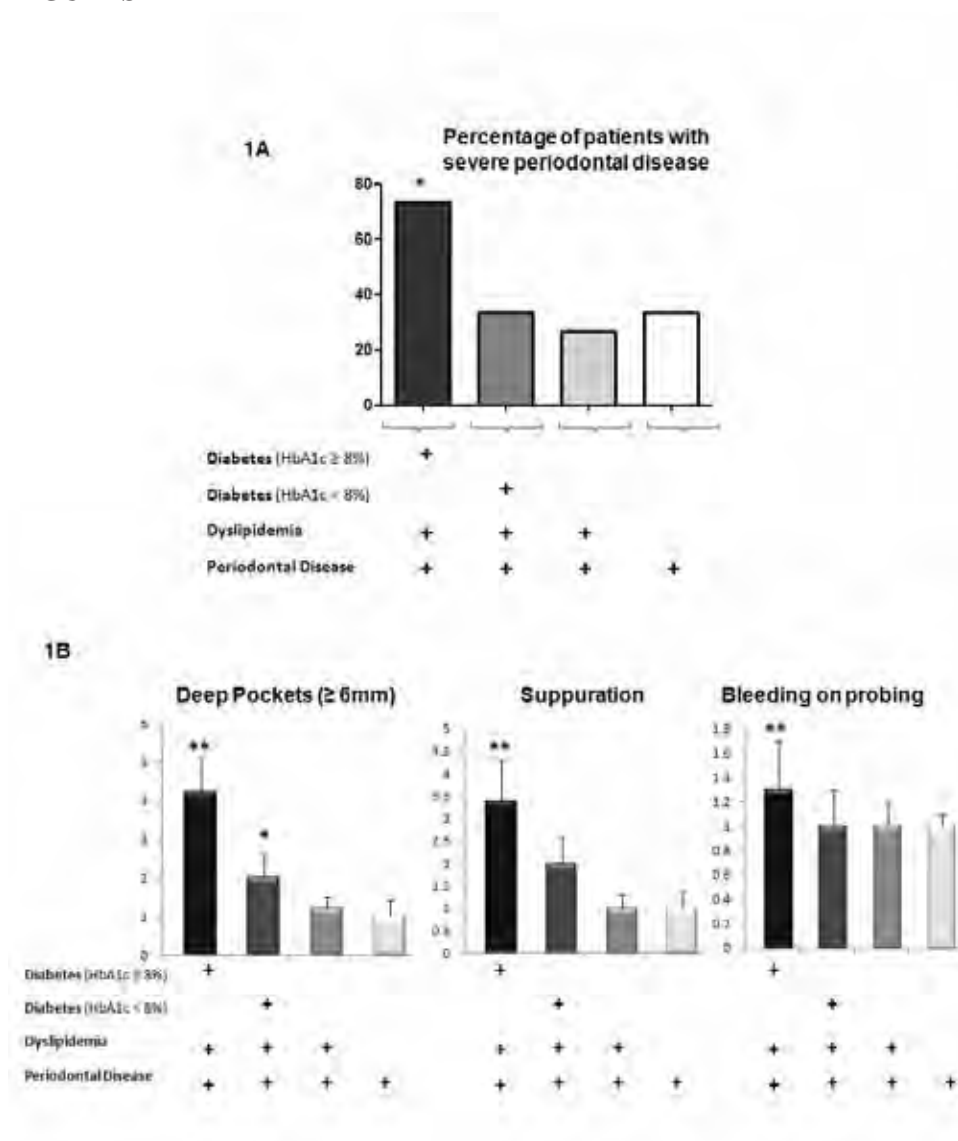


FIG 1: 1A. Prevalence of patients with severe periodontal disease. The severity of periodontal disease was assessed by the number of sites with deep periodontal pockets ($\geq 6\text{mm}$) and bleeding on probing in at least 8 sites. * $p < 0.05$ in relation to all groups (ANOVA; $\alpha = 5\%$); **1B.** Fold change differences in relative numbers of sites with deep periodontal pockets as defined by depth $\geq 6\text{mm}$ (A), suppuration (B), and bleeding on probing (C) for all groups. ** $p < 0.01$ in relation to group 4; * $p < 0.05$ in relation to group 4 (ANOVA; $\alpha = 5\%$).

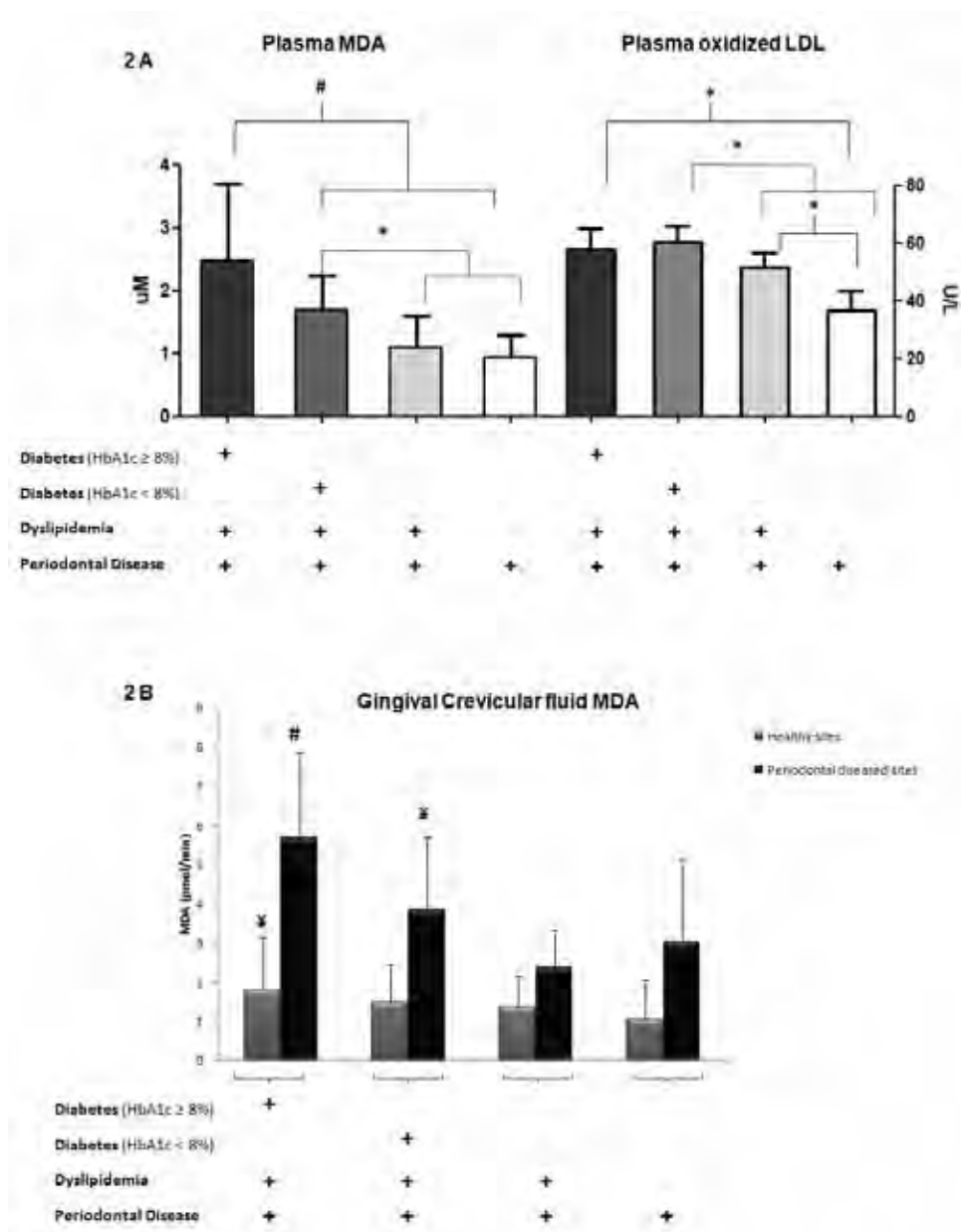


FIG 2: 2A. Levels of MDA and oxidized LDL in plasma. # $p < 0.05$ in relation to all other groups; * $p < 0.05$ significant difference between the groups (ANOVA; $\alpha = 5\%$); **2B.** Levels of MDA in GCF from healthy and periodontally diseased sites. # $p < 0.05$ in relation to the other groups; ¥ $p < 0.05$ in relation to the group without diabetes with dyslipidemia and periodontitis (Group 3) (ANOVA; $\alpha = 5\%$).

CAPÍTULO 3

*Systemic inflammatory profile aggravated by lipid
peroxidation products in patients with type 2 Diabetes*

Alliny de Souza Bastos, Dana T. Graves, Ana Paula de Melo Loureiro, Carlos Rossa
Júnior, Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Tanize do Espírito Santo Faulin, Niels Olsen
Câmara, Oelisoa M Andriankaja, and Silvana Regina Perez Orrico

Systemic inflammatory profile aggravated by lipid peroxidation products in patients with type 2 Diabetes

Alliny de Souza Bastos¹, Dana T. Graves², Ana Paula de Melo Loureiro³, Carlos Rossa Júnior¹, Dulcinéia Saes Parra Abdalla³, Tanize do Espírito Santo Faulin³, Niels Olsen Câmara⁴, Oelisoa M Andriankaja², and Silvana Regina Perez Orrico¹

¹Department of Diagnosis and Surgery, Araraquara School of Dentistry – UNESP-State University of São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brazil

²Department of Periodontics, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

³Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

Abbreviated Title: Lipid peroxidation, diabetes, periodontitis

Corresponding author:

Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico, e-mail: s-orrico@foar.unesp.br

UNESP – Univ Estadual Paulista; Araraquara School of Dentistry
Department of Diagnosis and Surgery Rua Humaitá, 1680, 2^o andar
CEP: 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (16) 3301-6377 Fax: +55 (16) 3301-6369

ABSTRACT

Lipid peroxidation (LPO) is increased in patients with diabetes. The evaluation of diabetes, lipid peroxidation, dyslipidemia and inflammation has not been evaluated simultaneously. The aim of this study is to investigate if diabetes coupled with dyslipidemia may alter the oxidative metabolism, by increasing lipid peroxidation products leading to the modulation of the inflammatory response. The sample was comprised of 100 patients divided into four groups based upon diabetic and dyslipidemic status: poorly controlled diabetics with dyslipidemia, well-controlled diabetics with dyslipidemia, normoglycemic individuals with dyslipidemia, and healthy individuals. Blood analyses were carried out for fasting plasma glucose, HbA_{1c} and lipid profile. LPO levels in plasma evaluated by measuring oxLDL (ELISA) and malondialdehyde (MDA, HPLC). Plasma cytokines were evaluated by the multiplex bead technique. Lipid peroxidation evaluated by MDA was significantly increased in DM groups. The cytokines panel showed a decreasing pattern from the poorly controlled diabetes ($p < 0.05$) to the healthy group. Even in well-controlled diabetics with dyslipidemia the levels of MDA, OxLDL and inflammatory cytokines were significantly increased when compared to the non diabetic/ dyslipidemic group. Moderate positive ($p < 0.0001$) correlations were observed between diabetic status, lipid peroxidation markers and proinflammatory cytokines expression, such as MDA and HbA_{1c} (0.64); MDA and IL1- β (0.50); MDA and TNF- α . (0.40); MDA and IL-6 (0.40). These findings suggest that LPO may represent an additive mechanism in the aggravation of inflammation in diabetics and may support a role for increased oxidative metabolism in the inflammatory response.

Key terms: Lipid peroxidation, diabetes mellitus type 2, periodontal diseases, cytokines

INTRODUCTION

Diabetes is a group of metabolic diseases that, by several mechanisms such as the accumulation of advanced glycation end products (AGEs), leads to several events that are involved in the pathogenesis of chronic inflammatory conditions, impaired wound healing, higher susceptibility to infections¹, atherosclerosis², and micro- and macrovascular alteration³⁻⁵. Considering that inflammation is an underlying cause of several co-morbidities associated with poorly controlled diabetes⁶, several studies demonstrated high levels of circulating inflammatory markers such as interleukin-6, tumor necrosis factor α (TNF- α)⁶⁻¹⁰ in type 2 diabetic patients.

Systemically, several alterations can contribute to the hyperinflammatory status of the patients with diabetes such as the binding of AGEs with their pattern-recognition receptors (RAGE). The interaction AGE-RAGE participate actively in inflammation and immune responses, dyslipidemia that modulates the function and activity of macrophages that promote enhanced inflammation¹¹ and an over-production of ROS leading to peroxidation of lipid membranes. Lipid peroxidation can contribute to injury of the host tissue by several mechanisms, including DNA damage, oxidation of enzymes and stimulation of proinflammatory cytokines².

However the evaluation of these conditions, diabetes, lipid peroxidation, dyslipidemia and inflammation have not been evaluated simultaneously. In this context, even in well controlled diabetic patients the effects of dyslipidemia and lipid peroxidation products should be considered in a more emphatic way helping to

prevent these patients to become a poorly controlled diabetic. In this context, the aim of our study is to investigate if diabetes coupled with dyslipidemia may alter the oxidative metabolism, by increasing lipid peroxidation products leading to the modulation of the inflammatory response.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The present cross-sectional study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Araraquara School of Dentistry (UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06) and was conducted according to the ethical principles of the Declaration of Helsinki. All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and they provided their written consent to participate.

A simple questionnaire was applied initially to all subjects to identify the patients that were eligible to be enrolled in the study, considering the inclusion/exclusion criteria. All study participants should range in age from 35 to 60 years and have similar socio-economic level. None of the patients were pregnant or were current or former smokers. Patients taking antibiotic, nonsteroidal anti-inflammatory, hormones or hypolipidemic drugs such as statins or fibrates, were excluded from the study. Particular care was taken to exclude subjects with history of

anemia and diseases known to influence lipoprotein metabolism, such as hypothyroidism and hypopituitarism.

A power analysis determined that at least 25 patients in each group would be sufficient to detect a 3-unit difference in MDA levels or a 2.4-unit difference in an inflammatory cytokine with 90% power and 95% confidence interval. The population was divided into four groups based upon diabetic and dyslipidemic status: poorly controlled diabetics with dyslipidemia (Group 1), well-controlled diabetics with dyslipidemia (Group 2), normoglycemic individuals with dyslipidemia (Group 3), and healthy individuals (Group 4).

Clinical record and physical evaluation

After been enrolled in the study, all participants answered a face-to-face structured questionnaire about socio-demographic data, personal and family medical history, and use of medications. A trained examiner collected information from diabetics patients regarding time since diabetes onset, medication used to control glucose, and the presence of complications associated with diabetes. Subjects completed a physical examination including anthropometric data such as abdominal circumference (cm), hip (cm), waist (cm) and height (m), weight (kg), and body mass index (BMI).

Laboratory measurements: metabolic control and lipoprotein profile

Blood samples were collected after a 12-hour overnight fast for the evaluation of fasting plasma glucose (mg/dL) by modified Bondar e Mead method, glycated haemoglobin (HbA_{1c}) by enzymatic immunoturbidimetry, high-sensitivity C-reactive protein by the nephelometric method and lipid profile (total cholesterol (TC), triglycerides (TGs), and HDL) by enzymatic methods. LDL was determined by the Friedewald formula. To avoid the inclusion of individuals with transitory dyslipidemia, the cutoff points used were the highest values according to the National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III)¹²: TC \geq 240 mg/dL, LDL \geq 160 mg/dL, HDL \leq 40 mg/dL, and TGs \geq 200 mg/dL. Metabolic control was considered as adequate when HbA_{1c} \leq 7.0% and as inadequate when HbA_{1c} \geq 8.5% to avoid the inclusion of patients that were transitorily poorly/well-controlled. Insulin levels were determined by the chemiluminescence method (uUI/ml) and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA IR) was calculated by the formula: fasting insulin concentration (μ U/ml) x fasting glucose concentration (mmol/L)¹³.

Sample collection

Blood samples were collected in tubes with EDTA centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C, plasma was obtained, promptly aliquoted and stored at -80°C until the lipid peroxidation and cytokine analyses. The following assays were performed by professionals blinded to allocation of the patients into the groups.

Analysis of cytokines in plasma

Eleven cytokines (interleukin-1 β IL-1 β , IL-2,-4,-5,-6,-7,-8,-10,-12(p70)-IL-13 and tumor necrosis factor-alpha TNF- α) were measured in plasma samples using a multiplex bead analysis (Bio-Plex system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Lipid peroxidation assays

Oxidized LDL assay: The levels of oxLDL in plasma were analyzed with a commercially available ELISA kit (Merckodia AB[®], Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions.

MDA assay: The assessment of MDA in plasma was determined by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) with a reverse-phase HPLC column (C18; 4.6 x 150 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and compared with MDA standard curves. Plasma samples were prepared as described previously ¹⁴.

Statistical analysis

The distribution and normality of the variables were evaluated by the D'Agostino-Pearson test. The general characteristics of each group were described with mean and standard deviation (SD), and the inflammatory cytokines were expressed as median (25% /75% quartiles). The differences between the groups for parametric data were evaluated by ANOVA followed by Bonferroni's post-test, and

non-parametric data were evaluated by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. Pearson's partial correlation coefficient was used to investigate the correlations between the various parameters adjusted for age, gender, and BMI. To determine the influence of lipid peroxidation and diabetic status on the expression of plasma cytokines, separate multivariable logistic and linear regression models were built for each independent variable. Variables found to be associated with the independent and dependent variables, and thus possible confounding factors, were included in the models. Moreover, regardless of their statistical significance, all variables known to have biologic linkage with the outcomes were retained. The significance level was set at $\alpha=0.05$. All analyses were carried out with SPSS software, IBM version 19.

RESULTS

Sample population

The general characteristics of the sample are demonstrated in Table 01. From the screened patients, 100 were identified as meeting the study inclusion criteria; of these, 25 patients assigned to 4 different groups. There was no statistical significant difference between the participants with respect to gender, age and socioeconomic status. In relation to physical evaluation, all individuals were overweight and the diabetic groups were obese and presented higher values of BMI ($p<0.05$), waist/hip proportion and abdominal circumference. The groups with diabetes had significantly

increased levels of fasting glucose, HbA_{1c}, and insulin resistance compared with non-diabetic patients. Based on ATP III¹² definition of dyslipidemia groups 1, 2, and 3 were dyslipidemic presenting increased levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides compared with group 4 (healthy individuals) ($p < 0.05$).

Among all diabetics, there was no difference in the age of diabetes onset. However, poorly controlled diabetics were the most hypertensive patients and had more diabetic complications ($p < 0.05$), with the most common complication being retinopathy, followed by nephropathy.

Lipid peroxidation levels

Plasma Malondialdehyde (MDA) and Oxidized LDL (oxLDL)

Plasma MDA levels were slightly increased in dyslipidemic patients (Fig. 1A). However, the most increased levels of plasma MDA were observed in poorly controlled diabetics with dyslipidemia who had about 2.9 times higher MDA levels when compared with those in the non-diabetic groups and approximately 1.6 times higher MDA levels when compared with well-controlled diabetics with dyslipidemia. OxLDL was also increased in all groups with dyslipidemia (Groups 1, 2, and 3) and in the plasma of diabetics were approximately 1.7 times higher than in the healthy group ($p < 0.05$) (Fig. 1B). Well-controlled diabetics with dyslipidemia (Group 2) presented significantly increased levels of MDA and OxLDL ($p < 0.05$) when compared to the non diabetic/ dyslipidemic group (Group 3).

Immunological analysis

To assess inflammation, the expression of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70) e IL-13 and TNF- α was measured in plasma. The cytokines panel showed a decreasing pattern from the poorly controlled diabetes ($p < 0.05$) to the healthy group, indicating that diabetes aggravates the inflammatory response. The significant differences between the groups according to the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines are illustrated in Figure 2. The cytokines that did not have statistical significant difference between the groups are represented in Table 2. The cytokines that are considered adipokines such as IL-6 and TNF- α were also significantly increased in the group with dyslipidemia.

Correlations

Adjusted correlation among diabetes status, lipoprotein profile, anthropometric and lipid peroxidation markers, and plasma cytokine expression were assessed taking into account the effect of age, gender and BMI (Table 3). There was a wide range of, moderate positive, correlations observed between diabetic status, lipid peroxidation markers and proinflammatory cytokines expression. Among these most significant correlations ($p < 0.0001$) were between IL1- β and fasting glucose (0.48), HbA1c (0.40), MDA (0.50), OxLDL (0.42). Moderate positive correlation was also observed between TNF- α and fasting glucose (0.50), HbA1c (0.50), Triglycerides

(0.35), MDA (0.44), OxLDL (0.48). Lastly, IL-6 was moderately and positively correlated with OxLDL (0.40). Diabetes was significantly associated with lipid peroxidation markers, and there was a strong positive correlation observed between MDA and HbA1c ($r=0.643$, $p<0.0001$), suggesting that the higher the concentration of HbA1c, the higher the expression of MDA (Figure 03).

Regressions

A potential mechanistic insight into the linkage among inflammation, diabetes, and lipid peroxidation is demonstrated by a multiple regression analysis using separate models for independent variables, lipid peroxidation parameters, diabetes status, lipoprotein profile and physical parameters. Lipid peroxidation markers and diabetic status were directly related to the expression of inflammatory cytokines, especially IL-1 β ($\beta=0.40$) and TNF- α ($\beta=0.50$). IL-6 was significantly related to lipoprotein profile rather than diabetic or inflammatory status (Table 4)

The multivariate logistic regression analysis using separate models for dependent variables, also evaluated the expression of cytokines taking into account the effects of age, gender and BMI. There was an approximate 3.2-, 2.0- 1.9- and 2.6-fold increase in the odds of having increased levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α , respectively, among those patients who have higher plasmatic levels of MDA. In addition, increased levels of HbA_{1c} were correlated with, approximately, 1.5-fold increase in the odds ratio of high of IL-1 β , IL-8, and TNF- α . Physical parameters and

lipoprotein profile did not demonstrate significant relationship with increased expression of inflammatory cytokines (Table 5).

Discussion

The evaluation of diabetes, lipid peroxidation, dyslipidemia and inflammatory profile has not been evaluated simultaneously. In the present study we evaluated the impact of lipid peroxidation on the inflammatory status in patients with diabetes coupled with dyslipidemia. Our results suggest that lipid peroxidation can have an impact on the modulation of the inflammatory response, even in well controlled diabetics.

Previous studies evaluated cytokines in plasma of patients with diabetes^{6, 8, 15} and its influence in diabetic complications^{16, 17}. However to the best of our knowledge, this is the first study to measure 11 cytokines simultaneously and correlate them with the several systemic parameters. Elevated proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) were significantly detected in diabetics patients. Antinflammatory cytokines (IL-4, IL-10) were also elevated in these patients, but the difference was statistically significant only to IL-4. The presence of complications related to diabetes was positively associated with increased levels of TNF- α . Thus, the expression of adipocytokines, IL-6 and TNF- α , were significantly increased in patients with dyslipidemia (Gr 1, 2 and 3) and were positively correlated with total cholesterol and triglycerides.

It is known that obesity promotes dyslipidemia and may impact insulin action via additional pathways, including through the release of leptin, IL-6 and TNF- α ⁹. In the present study the individuals with DM were considered obese (BMI > 30), had a large waist circumference, an increased insulin resistance index (HOMA IR) compared to healthy patients. However, in contrast with some studies^{9, 18, 19} we did not find a statistically significant correlation between the cytokines and physical parameters, suggesting that even in individuals with the physical parameters considered in a normal range, the cytokines expression can be elevated leading to an increased inflammatory response in these patients. Besides, positive but weak correlations (0.2) were observed between cytokines (IL-6 e o TNF- α) and insulin resistance (HOMA IR). In spite of the fact that previous studies demonstrated the association between insulin resistance and the increased expression of inflammatory cytokines^{9, 10}, other authors did not find this correlation and affirm that cytokines circulating levels are more related to hyperglycemia²⁰ or to the presence of adipose tissue^{18, 21} rather than insulin resistance itself.

The pathogenesis of diabetic dyslipidemia is not completely elucidated, however, it is stated that lipid abnormalities are part of primary features of metabolic syndrome and can precede the clinical manifestation of hyperglycemia, probably due to its association with insulin resistance²²⁻²⁵. It is important to notice that even with the well-established effect of dyslipidemia on diabetes^{23, 24, 26, 27}, several studies with diabetic population do not consider the lipid profile of the patients^{8, 17, 20, 25, 28} or do

not categorize them according to their dyslipidemic status^{6, 19, 20, 29-31}. In the present study we evaluated the lipid profile of the whole sample and included in diabetic groups only patients with established dyslipidemia¹² to avoid the inclusion of diabetic patients with a transitory state, considering that diabetes is a metabolic syndrome and a cluster of lipid abnormalities³² is a part of it. To check real the impact of dyslipidemia alone on lipid peroxidation markers and on inflammatory cytokines we've included a group of patients only with dyslipidemia (group 3).

In the present study we observed significant but weak correlation between dyslipidemic status and inflammatory cytokines suggesting that in spite of the fact that abnormalities in lipids can contribute to the production of lipid peroxides, dyslipidemia itself was not responsible to major alterations on oxidative and inflammatory profile. In fact, when diabetes was coupled with dyslipidemia (Gr 1 and 2), compared with normoglycemic /dyslipidemic individuals (Gr 3), an increased expression of LPO products and inflammatory cytokines was observed, suggesting that not only the dyslipidemia itself but the presence of diabetes resulted in significantly increased systemic oxidative metabolism. Our findings are in accordance with other authors that showed an increased oxidative metabolism levels in diabetic patients^{28-30, 33, 34}. Besides, previous studies reported that hyperglycemia and dyslipidemia together predisposes the patient to an inflammatory status by modulating the function and activity of macrophages and promote enhanced inflammation increasing the expression of inflammatory cytokines^{11, 35, 36}.

Another relevant issue is that only few studies consider the metabolic control, based on HbA1c levels, and separate the sample into different groups^{7, 30, 31, 37, 38}. In the present study, we've analyzed the DM patients as separate groups based on the metabolic control. It was observed a significant increase on lipid peroxidation and proinflammatory levels in poorly controlled diabetics when compared to the other groups. These results indicated that the higher the concentration of blood glucose, evaluated by fasting glucose and HbA1c, the higher the expression of MDA, oxLDL and inflammatory cytokines. Consistent with this, previously reported increased levels of inflammatory cytokines^{6, 39, 40}, high levels of LPO^{27, 30, 33, 41, 42} in patients whose diabetes is poorly controlled.

Interesting findings were observed in well-controlled diabetics. This group of patients is usually considered at a lower risk to develop cardiovascular disease and diabetic complications when compared to patients with inadequate metabolic control^{12, 43} and for these reasons is not often evaluated regarding lipid profile and acute phase proteins. However, in the present study, well-controlled diabetics showed the higher levels of high sensitivity C-reactive protein and the larger abdominal circumference from the whole sample, high lipid peroxidation levels and high inflammatory cytokines levels (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α). Thus, the inflammatory and lipid peroxidation levels of the well-controlled diabetics were closer to the levels observed in the group with poorly controlled DM when compared to the LPO levels in the 'normoglycemic with dyslipidemia' group, suggesting a possible risk of these

patients to develop complications and an imbalance in the metabolic control. Other authors also emphasize the hypothesis that lipid peroxidation may cause the beginning and progression of diabetes^{44, 45} and that oxidative stress can be an important early event in the pathogenesis of complications secondary to diabetes and may indicate an underlying subclinical pathology despite the good metabolic control³¹. These results point out the importance to establish strict goals to achieve lower lipids levels not only in patients with high levels of HbA1c but also in patients with adequate metabolic control, preventing them to become patients with poor metabolic control in a near future.

Several studies show that the accumulation of advanced glycation end-products (AGEs)⁴⁶ and their binding with their pattern-recognition receptors (RAGE) can actively participate in immunoinflammatory responses, being involved in the development of diabetic complications^{2, 4, 47, 48}. However, the precise mechanism by which LPO products, possibly serve as a key activator leading to the induction of inflammatory cytokines release has not been directly studied in humans. Some experimental studies point out to the direction that an increased oxidative metabolism²⁰ seems to be a likely mechanism linking acute hyperglycemia to diabetic complications⁴⁵, by activating nuclear factor- κ B (NF- κ B)⁴⁹ and increasing the cytokines expression (IL-6 and TNF- α)²⁰. At the same time it was shown that the inhibition of the lipid peroxidation can significantly improve the impaired wound

healing in diabetic mice through the normalization of the defect in VEGF expression⁵⁰.

Consistent with this, in the present study lipid peroxidation markers were positively and significantly correlated with the expression of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α e IL-6. It also demonstrated that, among those patients with elevated plasmatic levels of MDA, there is a positive correlation with having complications related to diabetes and there is a significant increase in the odds having higher levels of cytokines release, particularly IL-1 β and TNF- α .

The present study has the limitation to have a cross-sectional design and its inherent restriction to infer causality or allow to generalize the results observed. However, in an effort to minimize the influence of lifestyle behaviors and the effects of confounding factors, particular care was taken to use a strict inclusion criteria, having subjects of similar socio economic level, age and gender-matched, who were not currently taking medication that could influence inflammatory and oxidative markers (i.e., statins) and who did not differ in habitual activity. Nevertheless, our study introduces an additional aspect of the influence of the lipid peroxidation to increase circulating inflammatory cytokines levels and also favor the modulation of inflammatory response even in well controlled diabetics and dyslipidemic patients.

Taken together, such findings suggest that the lipid peroxidation may represent an additive effect to the metabolic imbalance associated with diabetes in the aggravation of inflammation in diabetics. In this sense, dyslipidemia may have a

relevant impact on the inflammatory response in the presence of diabetes-increased oxidative metabolism.

Acknowledgments

This study was supported by financial support from the São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) (grant 2007/08362-8), by the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel of the Brazilian Ministry of Education (CAPES)

REFERENCES

1. Hirsch T, Spielmann M, Zuhaili B, Koehler T, Fossum M, Steinau HU, et al. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC surgery*. 2008; **8**: 5.
2. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis*. 2000; **6**(3): 136-7.
3. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; **67**(1): 3-21.
4. Velazquez E, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KG, Laker MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med*. 1991; **8**(8): 752-8.
5. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009; **5**(3): 150-9.
6. Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, et al. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine*. 2012; **57**(1): 136-42.
7. Rytter E, Vessby B, Asgard R, Johansson C, Sjodin A, Abramsson-Zetterberg L, et al. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *The British journal of nutrition*. 2009; **101**(10): 1423-6.
8. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life sciences*. 2000; **67**(3): 291-300.
9. Vinik AI. The metabolic basis of atherogenic dyslipidemia. *Clinical cornerstone*. 2005; **7**(2-3): 27-35.

10. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004; **15**(11): 2792-800.
11. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; **16**(12): 1573-9.
12. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; **106**(25): 3143-421.
13. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; **28**(7): 412-9.
14. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem*. 2000; **33**(8): 619-25.
15. Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, et al. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2000; **32**(10): 407-12.
16. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000; **101**(18): 2149-53.
17. Liu J, Shi B, He S, Yao X, Willcox MD, Zhao Z. Changes to tear cytokines of type 2 diabetic patients with or without retinopathy. *Molecular vision*. 2010; **16**: 2931-8.
18. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia*. 2004; **47**(6): 1029-37.
19. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; **14**(12): 2127-31.
20. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002; **106**(16): 2067-72.
21. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity research*. 2001; **9**(7): 414-7.
22. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*. 1991; **14**(9): 839-55.

23. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 1998; **82**(12A): 67U-73U; discussion 85U-6U.
24. Haffner SM. Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Am J Cardiol.* 2002; **90**(8A): 55i-61i.
25. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation.* 2003; **107**(25): 3199-203.
26. Krauss RM, Siri PW. Dyslipidemia in type 2 diabetes. *Med Clin North Am.* 2004; **88**(4): 897-909, x.
27. Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes.* 1992; **41 Suppl 2**: 61-6.
28. Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem.* 2010; **43**(4-5): 508-11.
29. Nakhjavani M, Khalilzadeh O, Khajeali L, Esteghamati A, Morteza A, Jamali A, et al. Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol. *Lipids.* 2010; **45**(4): 321-7.
30. Hussein OA, Gefen Y, Zidan JM, Karochero EY, Luder AS, Assy NN, et al. LDL oxidation is associated with increased blood hemoglobin A1c levels in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 2007; **377**(1-2): 114-8.
31. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab.* 2005; **31**(6): 551-7.
32. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006; **35**(3): 491-510, vii-viii.
33. Colas R, Pruneta-DeLoche V, Guichardant M, Luquain-Costaz C, Cugnet-Anceau C, Moret M, et al. Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients. *Lipids.* **45**(8): 723-31.
34. Sampi M, Veneskoski M, Ukkola O, Kesaniemi YA, Horkko S. High plasma immunoglobulin (Ig) A and low IgG antibody titers to oxidized low-density lipoprotein are associated with markers of glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(5): 2467-75.
35. Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res.* 1994; **35**(3): 417-27.
36. van der Poll T, Braxton CC, Coyle SM, Boermeester MA, Wang JC, Jansen PM, et al. Effect of hypertriglyceridemia on endotoxin responsiveness in humans. *Infect Immun.* 1995; **63**(9): 3396-400.
37. Gambino R, Uberti B, Alemanno N, Pisu E, Pagano G, Cassader M. In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control. *Atherosclerosis.* 2004; **173**(1): 103-7.
38. Kostolanska J, Jakus V, Barak L. HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and

- adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2009; **22**(5): 433-42.
39. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontol 2000*. 2007; **43**: 245-53.
40. Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondon M, Charry L, et al. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC pulmonary medicine*. 2010; **10**: 38.
41. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)*. 1996; **90**(4): 255-60.
42. Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M, Yagi K. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochemical medicine*. 1981; **25**(3): 373-8.
43. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*. 2011; **34 Suppl 1**: S11-61.
44. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metab Rev*. 1995; **11**(3): 181-92.
45. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; **19**(3): 257-67.
46. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus? *Med Hypotheses*. 1989; **29**(1): 47-50.
47. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; **13**(11): 2829-32.
48. Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*. 1994; **43**(6): 836-41.
49. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994; **269**(13): 9889-97.
50. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2001; **50**(3): 667-74.

TABLES

TABLE 1. Characteristics of the sample: demographic, physical, laboratory, and diabetes data (mean \pm SD)

	GROUP 1 (DM \geq 8.5% / dyslip)	GROUP 2 (DM \leq 7.0% / dyslip)	GROUP 3 (without DM / with dyslip)	GROUP 4 (without DM / without dyslip)
Gender (F / M)	14 / 11	15 / 10	14 / 11	15 / 10
Age (mean \pm SD)	47.8 (\pm 7.7)	50.3 (\pm 6.7)	49.1 (\pm 7.9)	45.6 (\pm 5.3)
Ethnicity (white/brown/black)	11 / 7 / 7	9 / 4 / 12	13 / 3 / 9	12 / 5 / 8
BMI (m/kg²)	30.8 (\pm 4.1) [#]	30.9 (\pm 4.1) [#]	28.5 (\pm 4.0)	27.6 (\pm 6.9)
Abdominal circumference (cm)	103.7 (\pm 14.3)	107.9 (\pm 10.0) ^{# §}	98.2 (\pm 10.7)	98.1 (\pm 18.0)
Waist/hip proportion	1.0 (\pm 0.1)	1.0 (\pm 0.1)	0.9 (\pm 0.1)	0.9 (\pm 0.1)
Fasting glucose (mg/dl)	233.4 (\pm 76.6) ^{† ‡}	137.7 (\pm 43.5) [‡]	90.2 (\pm 6.1)	91.0 (\pm 7.5)
HbA_{1c} (%)	10.7 (\pm 1.8) ^{**}	6.5 (\pm 0.7) ^{§#}	5.5 (\pm 0.7)	5.2 (\pm 0.6)
Insulin (U/L)	17.7 (\pm 14.5) [#]	16.2 (\pm 7.8) [#]	12.5 (\pm 8.3)	12.1 (\pm 13.7)
HOMA IR Index	9.8 (\pm 8.5) [‡]	5.4 (\pm 2.7) ^{§#}	2.8 (\pm 1.8)	2.8 (\pm 3.4)
Total cholesterol (mg/dl)	244.0 (\pm 38.5) ^{##}	247.3 (\pm 44.3) ^{##}	244.8 (\pm 41.9) ^{##}	173.9 (\pm 18.4)
HDL cholesterol (mg/dl)	45.9 (\pm 9.8)	47.2 (\pm 10.6)	50.0 (\pm 11.3)	48.9 (\pm 13.4)
LDL cholesterol (mg/dl)	153.6 (\pm 39.0) ^{##}	150.8 (\pm 45.1) ^{##}	157.0 (\pm 43.2) ^{##}	105.5 (\pm 17.8)
Triglycerides (mg/dl)	218.1 (\pm 94.2) ^{##}	246.2 (\pm 108.4) ^{##}	189.1 (\pm 82.7) ^{##}	94.1 (\pm 37.8)
High-sensitive C-Reactive Protein	0.4 (\pm 0.3)	0.7 (\pm 0.5) [#]	0.4 (\pm 0.3)	0.4 (\pm 0.6)
Hypertension	19 [#]	14 [#]	8	3
Time since DM onset (years) (mean \pm SD)	6.5 (\pm 4.5)	4.8 (\pm 5.2)	-	-
Presence of diabetes				
Complication	18	10	-	-
One	10	08	-	-
More than one	08	02	-	-
Medication for DM control:				
Hypoglycemic	17	12	-	-
Insulin	1	1	-	-
Hypoglycemic / Insulin	7	4	-	-
None	0	8	-	-

[#]p < 0.05 in relation to group 4; ^{##}p < 0.0001 in relation to group 4; [§]p < 0.05 in relation to group 3; [†]p < 0.05 in relation to group 2; [‡]p < 0.0001 in relation to groups 3 and 4; * p < 0.05 in relation to the other groups; ^{**}p < 0.0001 in relation to the other groups (Kruskal-Wallis Test; $\alpha=5\%$); [§]p < 0.05 in relation to group 2 (Mann-Whitney Test; $\alpha=5\%$).

TABLE 02- Mean values (\pm SD) cytokine expression in plasma

Cytokines (pg/μl)	GROUP 1 (DM \geq8.5%/ dyslip)	GROUP 2 (DM \leq7.0% / dyslip)	GROUP 3 (without DM / with dyslip)	GROUP 4 (without DM / without dyslip)
IL-2	0.55 (\pm 0.73)	0.42 (\pm 0.44)	0.33 (\pm 0.40)	0.33 (\pm 0.22)
IL-7	1.28 (\pm 0.41)	1.24 (\pm 0.38)	1.14 (\pm 0.28)	1.02 (\pm 0.22)
IL-10	0.83 (\pm 0.34)	0.80 (\pm 0.24)	0.75 (\pm 0.18)	0.72 (\pm 0.25)
IL-12 (p70)	0.81 (\pm 0.48)	0.93 (\pm 0.42)	0.95 (\pm 0.73)	0.91 (\pm 0.49)
IL-13	2.71 (\pm 2.20)	2.03 (\pm 0.98)	2.28 (\pm 0.99)	2.14 (\pm 1.20)

TABLE 3. Adjusted correlation between plasma cytokines and diabetes status, lipoprotein profile, physical parameters, lipid peroxidation levels markers

	PARAMETER	IL-1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α
Diabetic status [#]	Fasting glucose (mg/dL)	0.48**	0.30**	0.24*	0.17	0.32**	0.15	0.50**
	HbA _{1c}	0.40**	0.21*	0.25*	0.19	0.17	0.09	0.50**
	HOMA IR index	0.18	0.12	0.04	0.21*	0.15	-0.02	0.25*
Lipoprotein profile [#]	Total Cholesterol (mg/dL)	0.20*	0.05	0.12	0.25*	0.02	-0.03	0.16
	HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.15	0.04	-0.01	-0.17	-0.03	-0.11	-0.08
	LDL-cholesterol (mg/dL)	0.14	-0.01	0.04	0.21*	-0.05	-0.01	0.07
	Triglycerides (mg/dL)	0.20*	0.10	0.15	0.24*	0.16	0.01	0.35**
Physical Parameters	BMI	0.04	0.03	-0.01	0.08	-0.01	-0.03	0.05
	Wais/hip proportion	0.15	0.10	0.11	0.17	0.20*	0.12	0.14
	Abdominal circumf	0.06	0.05	0.001	0.12	0.08	0.02	0.04
Lipid peroxidation markers [#]	MDA (μ M)	0.50**	0.25*	0.28*	0.16	0.25*	0.08	0.44**
	Ox LDL (U/L)	0.42**	0.18	0.21*	0.40**	0.21*	0.07	0.48**

*p<0.05; ** p< 0.0001 (r; Pearson's correlation coefficient; α =5%)

[#]Adjusted for age, gender and BMI; † Adjusted for age and gender

HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HOMA IR – homeostatis model assessment of insulin resistance

TABLE 4: Multiple Regression Linear model with the influence of lipid peroxidation, diabetes status, lipoprotein profile and physical parameters on plasma cytokines

		IL-1β[#]		IL-6[#]		IL-8[#]		TNF-α[#]	
		β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI
LPO parameter	MDA PL	0.50**	(0.08-0.16)	0.15	(-0.04 - 0.326)	0.25*	(0.05-0.36)	0.44**	(0.53-1.27)
	Ox LDL PL	0.44**	(0.0-0.01)	0.40**	(0.02-0.05)	0.06	(-0.02- 0.03)	0.50**	(0.05-0.11)
Diabetes status	Fasting glucose	0.50**	(0.001-0.002)	0.17	(0.000-0.005)	0.11	(-0.01-0.03)	0.47**	(0.008-0.02)
	HbA_{1c}	0.40**	(0.02-0.06)	0.17	(-0.01-0.14)	0.18	(-0.01-0.12)	0.50**	(0.26-0.54)
	HOMA IR	0.2	(-0.001-0.02)	0.2	(-0.002-0.06)	0.17	(-0.01-0.05)	0.13	(-0.01-0.04)
	Insulin	0.01	(-0.003-0.003)	0.23*	(0.001- 0.03)	0.01	(-0.01- 0.01)	0.27*	(0.02-0.16)
Lipoprotein profile	Total Chol	0.2	(0.000-0.002)	0.26*	(0.001-0.01)	0.03	(-0.003-0.004)	0.17	(-0.02-0.02)
	LDL	0.14	(0.000-0.002)	0.21*	(0.000-0.01)	-0.04	(-0.005-0.003)	0.008	(-0.01- 0.01)
	TGL	0.21	(0.000-0.001)	0.24*	(0.000- 0.004)	0.18	(0.000-0.003)	0.37**	(0.003- 0.01)
Physical parameters[§]	BMI	0.04	(-0.008-0.01)	0.08	(-0.02 - 0.051)	-0.005	(-0.03-0.03)	0.051	(-0.06-0.1)
	Abdominal circ	0.12	(-0.005-0.009)	0.19	(-0.01- 0.037)	0.33	(-0.03-0.04)	-0.004	(-0.06 - 0.05)

* p<0.05; ** p< 0.0001.

[#] Adjusted for age, gender and BMI.

[§] Adjusted for age and gender

β partial standardized regression coefficient.

LPO, lipid peroxidation; MDA PL, malondialdehyde in plasma; Ox LDL PL, oxidized LDL in plasma; HbA_{1c} (glycated hemoglobin); HOMA IR, Insulin resistance.

TABLE 5: Multivariate Logistic Regression model with the influence of lipid peroxidation, diabetes status, lipoprotein profile and physical parameters on plasma cytokines

		IL-1 β [#]			IL-6 [#]			IL-8 [#]			TNF- α [#]		
		OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI	OR	p value	95%CI
LPO parameter	MDA PL	3.17	0.0001**	(1.72-5.83)	1.9	0.01*	(1.15-3.11)	1.87	0.01*	(1.15-3.06)	2.57	0.0001**	(1.46-4.53)
	Ox LDL PL	1.08	0.003*	(1.03-1.14)	1.1	0.0001**	(1.04-1.14)	1.03	0.17	(0.99-1.06)	1.11	0.0001**	(1.06-1.17)
Diabetes status	Fasting glucose	1.01	0.0001**	(1.01-1.02)	1.00	0.11	(1.00-1.01)	1.01	0.003*	(1.0-1.02)	1.01	0.01*	(1.00-1.01)
	HbA_{1c}	1.31	0.005**	(1.09-1.58)	1.16	0.11	(0.97-1.38)	1.22	0.03*	(1.02-1.45)	1.41	0.0001**	(1.15-1.73)
	HOMA IR	1.12	0.02*	(1.02-1.24)	1.02	0.51	(0.95-1.10)	1.1	0.04*	(1.0-1.21)	1.04	0.30	(0.96-1.12)
	Insulin	1.00	0.74	(0.98-1.03)	1.0	0.67	(0.98-1.04)	1.01	0.54	(0.98-1.04)	1.02	0.24	(0.99-1.05)
Lipoprotein profile	Total Chol	1.00	0.44	(0.99-1.01)	1.0	0.14	(1.00-1.02)	1.0	0.63	(0.99-1.01)	1.01	0.11	(1.00-1.02)
	LDL	1.00	0.91	(0.99-1.01)	1.0	0.39	(1.00-1.01)	1.0	0.8	(0.99-1.01)	1.0	0.31	(0.99-1.01)
	TGL	1.11	0.04*	(1.00-1.01)	1.0	0.01*	(1.00-1.01)	1.0	0.13	(1.0-1.01)	1.0	0.01*	(1.00-1.10)
Physical parameters[§]	BMI	0.97	0.59	(0.89-1.07)	1.1	0.06	(1.00-1.18)	0.98	0.6	(0.90-1.06)	1.04	0.32	(0.96-1.13)
	Abdominal circ	1.06	0.91	(1.00-1.14)	1.05	0.11	(0.99-1.12)	1.02	0.6	(0.96-1.07)	0.99	0.66	(0.93-1.04)

* p<0.05; ** p<0.0001.

[#] Adjusted for age, gender and BMI.

[§] Adjusted for age and gender

LPO, lipid peroxidation; MDA PL, malondialdehyde in plasma; Ox LDL PL, oxidized LDL in plasma; HbA_{1c} (glycated hemoglobin); HOMA IR, Insulin resistance.

FIGURES

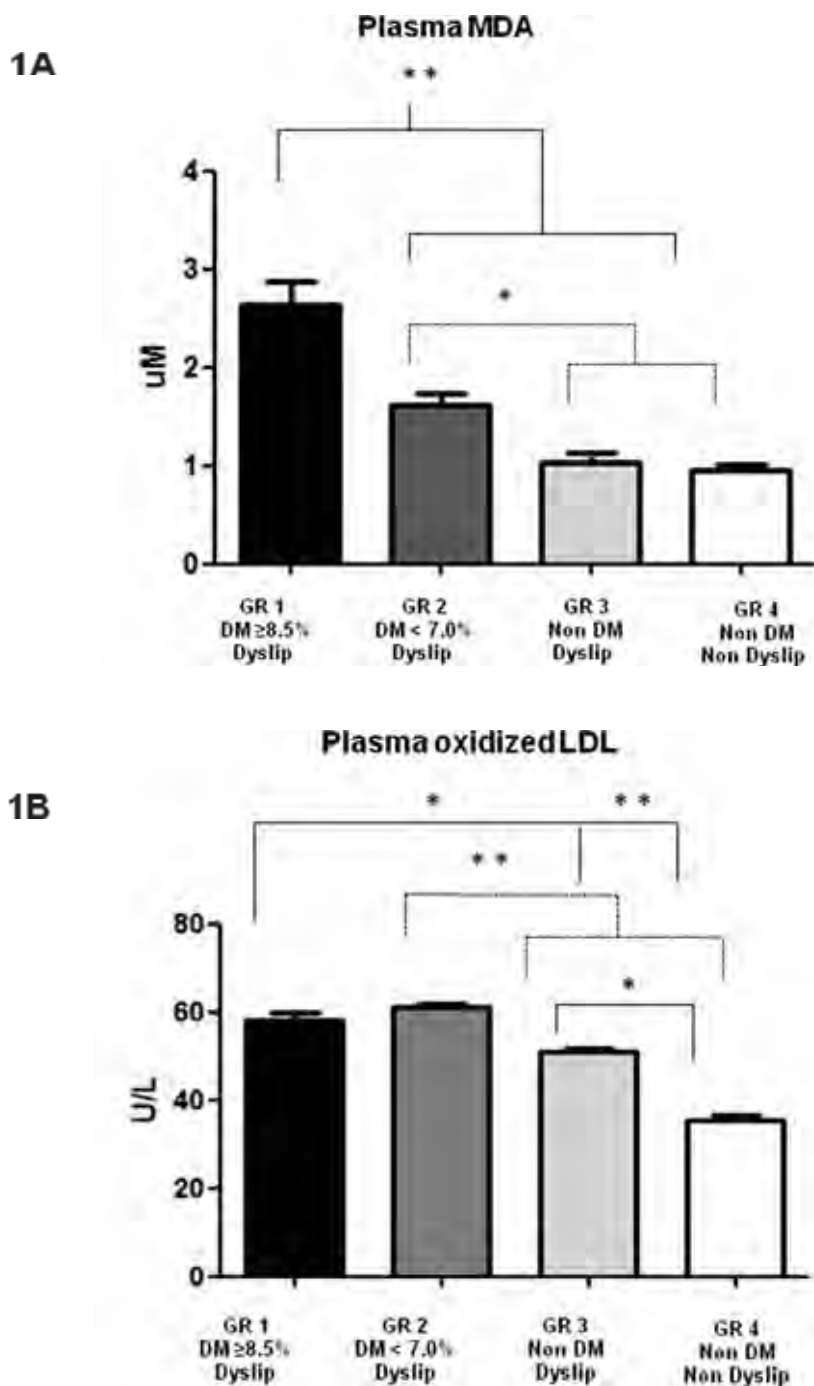


Figure 1: Lipid Peroxidation markers in plasma– 1A Levels of MDA in plasma; **1B** Levels of oxidized LDL in plasma (** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; ANOVA Test; $\alpha = 5\%$)

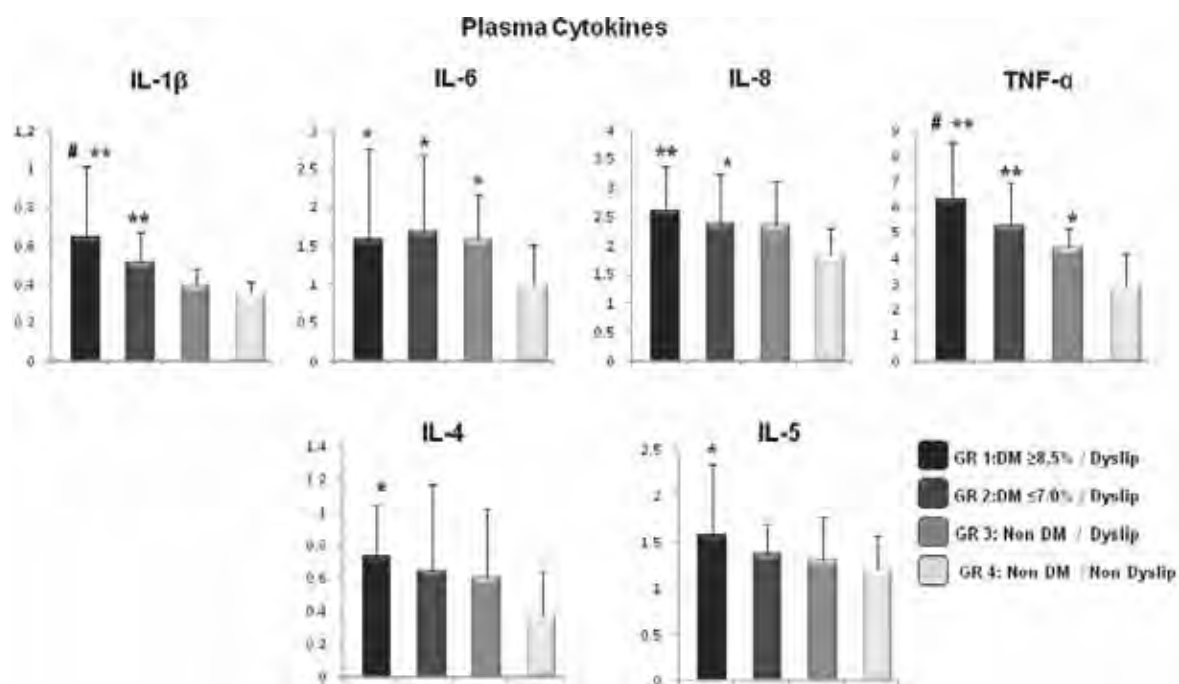


Figure 2: Cytokines expression in plasma** $p < 0.0001$ in relation to group 4; * $p < 0.05$ in relation to group 4; # $p < 0.05$ in relation to group 3; Kruskal Wallis Test; $\alpha = 5\%$)

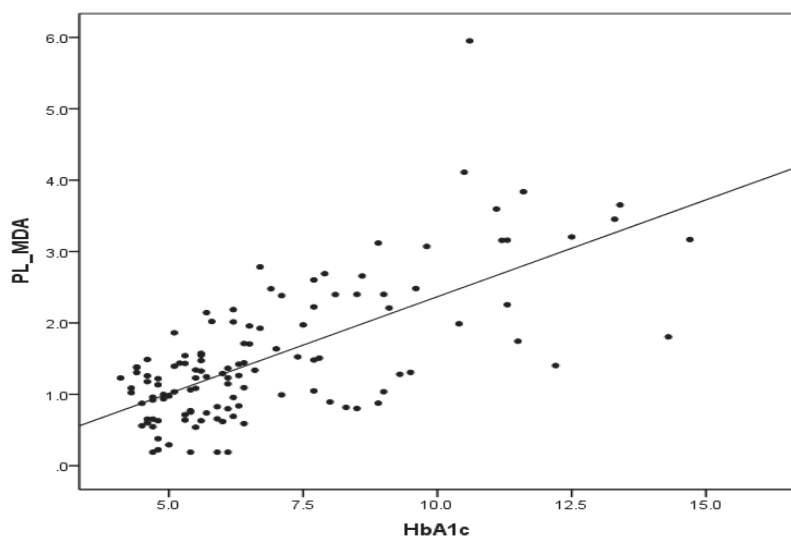


Figure 03: Correlation between levels of lipid peroxidation (MDA) in plasma and metabolic control (HbA_{1c}); r, Pearson's correlation coefficient= 0.643; p<0.0001

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Estudos prévios têm avaliado o impacto da peroxidação lipídica no diabetes e na doença periodontal como condições independentes. Neste estudo foi possível avaliar a peroxidação lipídica em pacientes com diabetes tipo 2, com adequado e inadequado controle metabólico, e dislipidemia comparando-os a pacientes sistemicamente saudáveis, bem como avaliar seu impacto sobre a inflamação crônica no plasma e no fluido gengival. Além disso, foi possível padronizar e validar a mensuração da peroxidação lipídica (PL) no fluido sulcular gengival (FSG) de sítios saudáveis e com periodontite. Os resultados demonstraram a presença de maiores níveis de peroxidação lipídica em pacientes com diabetes e sugerem que a associação diabetes/dislipidemia pode afetar a magnitude da inflamação local e sistêmica, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias plasmáticas e no periodonto, levando também à destruição tecidual, representada neste estudo por maior severidade da periodontite crônica.

A dislipidemia no diabetes pode estar presente antes mesmo do estabelecimento da hiperglicemia^{75, 90, 122}. Desempenha um importante papel na resposta imune, predispondo o paciente a um estado hiperinflamatório por modular a função e atividade dos macrófagos^{106, 230, 238}, desencadeando a ativação de diversas vias relacionadas à liberação de produtos oxidativos, de peroxidação lipídica e de mediadores inflamatórios que levam a danos em diversos órgãos e tecidos^{47, 101}. O aumento do metabolismo oxidativo e o acúmulo de AGEs estão envolvidos na patogênese de condições inflamatórias

crônicas observadas em pacientes com diabetes como a aterosclerose⁹², as alterações micro e macrovasculares^{110, 241} e a doença periodontal^{4, 37, 233, 246}.

Diversos autores observaram que pacientes com diabetes apresentam aumento de marcadores de peroxidação lipídica como LDL-oxidada (LDL-ox)^{42, 100, 104, 166, 193} e o malondialdeído (MDA)^{4, 9, 84, 107, 160}. Em concordância com tais autores, o presente resultado demonstrou que os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica (LDL-ox e MDA) estão aumentados em pacientes com diabetes, sendo ainda mais elevados na presença de inadequado controle metabólico e estão correlacionados com parâmetros de dislipidemia como níveis elevados de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides. Em concordância com os estudos de Kesavulu et al.¹¹¹ e Nacitarhan et al.¹⁶⁵, foi observado que os níveis de peroxidação lipídica também apresentaram correlação forte e significativa com elevados níveis de glicemia de jejum e hemoglobina glicada (HbA_{1c}). No entanto, alguns autores²⁴¹ não encontraram relação significativa entre níveis elevados de peroxidação lipídica e diabetes, isso provavelmente esteve relacionado a diferenças nas populações de estudo.

Por muitos anos, a análise do MDA tem sido amplamente empregada para verificar a peroxidação lipídica em amostras biológicas^{50, 52}. A reação chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico” (TBARS) tem sido comumente utilizada como um índice de produção de MDA e consiste de um ensaio espectrofotométrico ou espectrofluorimétrico de produtos gerados quando a amostra é aquecida sob condições ácidas para formar o aduto MDA-(TBA)₂. No entanto, outros aldeídos além do MDA podem reagir com o TBA e

diversos outros cromógenos podem interferir, resultando dessa forma em uma superestimação das concentrações de MDA. Por estas razões, a especificidade do TBARs tem sido alvo de questionamentos^{98, 118, 228}.

Desta forma, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) tem sido introduzida como uma maneira de melhorar a especificidade e confiabilidade da avaliação²³, uma vez que o autêntico cromógeno MDA-TBA₂ é eficientemente separado de outros cromógenos que poderiam via a interferir com a reação^{37, 40, 68, 89, 98, 256}. Diversos autores demonstraram a validação de métodos para avaliação de MDA em plasma^{89, 98, 228}, mostrando que condições sistêmicas como doença glomerular²²⁸, infertilidade masculina¹³⁴, hiperlipidemia⁴⁰ e Diabetes mellitus^{165, 166, 239} apresentam níveis aumentados de MDA plasmáticos.

Em se tratando de doença periodontal, estudos recentes têm investigado o papel dos produtos do metabolismo oxidativo sobre a inflamação e dano ao periodonto. Níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo foram verificados em sítios com periodontite^{176, 210, 218, 233} e produtos de peroxidação lipídica no fluido sulcular gengival, como o malondialdeído (MDA), foram significativamente correlacionados com parâmetros clínicos da doença^{4, 233, 246}. Alguns estudos sugerem que o início ou progressão da destruição periodontal pode ser devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio e proteases ativas, liberadas durante o processo de resposta do hospedeiro frente a um desafio bacteriano^{18, 37, 190, 246}.

Dessa forma, qualquer que seja o mecanismo, uma medida eficaz para detectar os marcadores de peroxidação lipídica se faz necessária para fornecer resultados precisos e reprodutíveis. Na avaliação da peroxidação lipídica em pacientes com periodontite, os estudos têm realizado tal análise na saliva ^{32, 37, 113}, no plasma ^{4, 246}, no tecido gengival ²⁵ e no fluido sulcular gengival ^{4, 233, 246}. No entanto, os métodos descritos para avaliar MDA no fluido gengival de sítios com doença periodontal foram ensaios colorimétricos ²³³ e apenas dois autores recentemente utilizaram cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ^{4, 246}. Deve-se ressaltar, entretanto, que a metodologia empregada para mensuração no fluido sulcular gengival nestes estudos foi a mesma utilizada para amostras de plasma e saliva e que não existe validação do método na literatura. Considerando-se que o fluido sulcular gengival é uma amostra biológica menos complexa em relação ao plasma e diferente da saliva quanto à composição, o estabelecimento de uma metodologia específica para avaliação do MDA no fluido gengival se faz necessária assim como a validação do método para que esta análise seja precisa e reprodutível.

No presente estudo, foi descrito um método confiável o qual foi validado para identificar e quantificar um produto específico da peroxidação lipídica no fluido sulcular gengival, de sítios saudáveis ou com periodontite crônica, utilizando HPLC. O método foi padronizado e direcionado especificamente para o FSG, diferenciando-o da mensuração em outras amostras biológicas. Além disso, este é o primeiro estudo a descrever a quantificação do MDA no fluido sulcular gengival de sítios saudáveis, uma vez

que outros estudos apenas avaliaram MDA, por HPLC, em fluido de sítios com doença periodontal^{4, 246}. Isto implica não somente na mensuração do MDA em concentrações reduzidas, mas também na possibilidade de usar esta mensuração como um marcador de risco para doença periodontal (Apêndice 1).

A sensibilidade do método empregado permitiu a quantificação do MDA com excelente exatidão e precisão até mesmo em concentrações baixas como 0.04 - 0.05 μM . Tal característica foi de fundamental importância na quantificação do MDA no fluido de sítios saudáveis. Adicionalmente, as diferentes amostras coletadas tanto de sítios saudáveis quanto com periodontite crônica apresentaram concentrações semelhantes, a depender da característica do sítio, demonstrando a precisão do método quando aplicado para amostras de fluido sulcular gengival. Além disso, um significativo aumento nas concentrações de MDA foi observado no fluido de sítios com periodontite crônica quando comparados a sítios saudáveis, em concordância com o estudo de Tsai et al.²³³.

Além da possibilidade de detectar MDA no fluido de sítios saudáveis e de se obter um método validado para mensurar a peroxidação lipídica no fluido sulcular gengival utilizando a cromatografia líquida de alta performance (Capítulo 1- Anexo C), o presente estudo avaliou o impacto da peroxidação lipídica no plasma e fluido gengival sobre a inflamação crônica em pacientes portadores ou não de diabetes e dislipidemia (Capítulo 2).

É reconhecido que o diabetes está associado a uma maior magnitude da resposta inflamatória a patógenos e seus produtos^{43, 171}. A periodontite crônica é

reconhecida como a sexta complicação do diabetes¹⁴¹ e é bem estabelecido que há maior prevalência, severidade e extensão da doença periodontal nestes pacientes^{41, 60, 115, 158, 187, 226, 227}. Esta informação foi confirmada no presente estudo mostrando que os grupos com diabetes (grupos 1 e 2) foi relacionado a piores valores para todos os parâmetros periodontais quando comparados aos grupos normoglicêmicos (grupos 3 e 4) (Apêndice 2).

O nível de controle metabólico tem sido extensivamente apontado como um importante fator que leva à doença periodontal mais severa, tendo mais impacto em pacientes com inadequado controle metabólico^{16, 136, 187, 227} apesar de alguns estudos não observarem tal associação^{26, 199}. No presente estudo foi verificado que pacientes com inadequado controle metabólico e com dislipidemia (grupo 1) apresentaram mais sítios com sangramento à sondagem, supuração e perda de inserção quando comparados a pacientes sistemicamente saudáveis (grupo 4). Além disso, uma correlação forte e positiva foi observada entre glicemia de jejum e hemoglobina glicada e parâmetros clínicos de periodontite crônica. Estes achados mostraram que, de fato, o controle metabólico exerceu um impacto importante sobre a severidade da inflamação e destruição periodontal.

No entanto, além do controle metabólico, fatores como alterações na resposta imune, anormalidades no metabolismo de lipídios^{86, 218} e aumento do metabolismo oxidativo^{6, 175, 202} podem caracterizar-se como um importante mecanismo relacionado a maior destruição periodontal. Sabe-se que a dislipidemia característica do diabetes^{36, 121} predispõe o paciente a um estado

hiperinflamatório pela modulação da função e atividade dos macrófagos^{106, 230, 238} desencadeando a ativação de vias associadas com a liberação de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias^{47, 101}.

Estudos têm demonstrado a presença de produtos do metabolismo oxidativo e de peroxidação lipídica no plasma^{4, 220, 246}, saliva^{32, 37, 113} e fluido sulcular gengival^{4, 233, 246}. Ainda, alguns autores demonstraram a relação desses produtos com a patogênese da doença periodontal^{18, 176, 206, 244}. Neste aspecto, o presente estudo verificou que independente da condição sistêmica, os sítios com periodontite crônica apresentaram mais MDA do que os sítios saudáveis. Nossos achados demonstram uma correlação positiva entre marcadores de peroxidação lipídica local e sistêmica e parâmetros clínicos periodontais, como sítios profundos ($PD \geq 6\text{mm}$), sangramento à sondagem, nível de inserção clínica ($NI \geq 5\text{mm}$) e presença de supuração, estando em concordância com outros estudos^{4, 233}, o que indica que níveis aumentados de peroxidação lipídica podem ter um papel importante na destruição periodontal. Além disso, também foi verificada correlação positiva entre marcadores de peroxidação lipídica local e sistêmica. Neste contexto, pode-se sugerir que a peroxidação lipídica tem um importante papel na severidade do processo inflamatório periodontal e sistêmico, frequentemente observado nestes pacientes.

Não foi encontrada correlação significativa entre dislipidemia e parâmetros inflamatórios da periodontite crônica, em contraste com estudos anteriores que sugerem que a dislipidemia por si só pode estar associada a um pior *status* periodontal^{65, 102}. O aumento da severidade da inflamação,

representada por maior destruição periodontal e produção aumentada de citocinas inflamatórias locais ocorreu quando a dislipidemia esteve associada ao diabetes (grupos 1 e 2), não havendo diferença na comparação entre indivíduos com e sem dislipidemia não portadores de diabetes (grupos 3 e 4). Nossos achados sugerem que o diabetes, na presença de um ambiente dislipidêmico, pode alterar o metabolismo oxidativo, aumentando a peroxidação lipídica. Tal aumento na peroxidação lipídica pode representar um fator adicional no desequilíbrio metabólico associado ao diabetes com efeito sobre a modulação da resposta inflamatória. Neste sentido, sugere-se que a dislipidemia tenha impacto relevante sobre a resposta inflamatória na presença de estresse oxidativo aumentado.

Até o momento, o efeito da peroxidação lipídica local e sistêmica em pacientes com diabetes e periodontite crônica não havia sido estudado. No presente estudo tais aspectos foram avaliados de maneira conjunta e foi observado que apenas o fato de ter diabetes, independente do controle metabólico, levou a um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, avaliados pela LDL-oxidada no plasma e pelo MDA no plasma e no fluido. Nesse aspecto, um importante resultado que deve ser salientado foi a obtenção de maiores valores de MDA no fluido sulcular gengival de sítios saudáveis para os grupos com diabetes (grupo 1 e 2) quando comparado ao fluido de pacientes normoglicêmicos (grupos 3 e 4). Além disso, os resultados de regressões, logística e múltipla, sugerem que níveis aumentados de peroxidação lipídica

local e sistêmica podem representar um maior risco para a presença de periodontite crônica considerada severa.

Alguns mecanismos podem ser sugeridos para elucidar o papel da peroxidação lipídica sobre a severidade da condição inflamatória em pacientes com diabetes e dislipidemia. Durante o curso de uma condição inflamatória/infecciosa, após a ativação de neutrófilos e macrófagos por patógenos^{209, 210, 233}, ocorre a produção exagerada de produtos da peroxidação lipídica no tecido como consequência do processo inflamatório^{200, 210}. Por sua vez, a presença de peroxidação lipídica nos locais inflamados pode, de maneira oposta, aumentar a magnitude da reação inflamatória por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias¹⁸².

Neste contexto, os peróxidos de lipídios podem ativar fatores de transcrição como o fator nuclear- κ B^{7, 178, 205, 253}, o qual é sensível a alterações no metabolismo oxidativo²⁵³. Tal ativação estimula a liberação de mediadores apoptóticos e citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial, como a VCAM-1^{15, 93, 168}, resultando numa cascata de ativação celular e inflamação difusa^{44, 95}.

A peroxidação lipídica pode ainda contribuir para a injúria tecidual por outros mecanismos, incluindo dano ao DNA, oxidação de enzimas e alterações degenerativas, como necrose e destruição do osso alveolar na região do infiltrado inflamatório²¹⁸. Tal condição de dano tecidual pode ser agravada em pacientes com diabetes pelo fato de que, além dos lipídios no plasma e das membranas celulares serem fontes de peróxido de lipídios, o acúmulo de AGEs

(produtos finais da glicação avançada) também pode gerar produtos de peroxidação lipídica⁷⁴. Sabe-se que os AGEs estão diretamente associados ao nível de controle metabólico e à duração da hiperglicemia e têm a capacidade de alterar a estrutura e função das membranas celulares, inclusive levando a um aumento do metabolismo oxidativo (ROS) acima do fisiológico²⁰². Tal mecanismo de estresse oxidativo e produção de peróxido de lipídios induzido por AGEs contribuem para a diminuição da capacidade antioxidante¹⁵⁶, disfunção vascular difusa e ativação de células mononucleares^{44, 203}. Sendo a doença periodontal uma condição que se desenvolve frente a um desafio bacteriano, o acúmulo periférico ou local de AGEs pode contribuir para dano aos tecidos periodontais⁶ e por este motivo, tal acúmulo tem sido investigado na doença periodontal²⁰². Estudos demonstram que existem receptores RAGEs no tecido gengival^{109, 202} de pacientes com diabetes e a interação de AGEs com seus receptores RAGEs, que ocorre em vários órgãos²⁵³, também pode ocorrer no tecido gengival^{109, 202}. Tal interação pode levar à supressão da produção de colágeno por fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal^{164, 183}, liberação de mediadores inflamatórios como interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α)^{127, 253}, estímulo à osteoclastogênese^{55, 255} e atraso da reparação tecidual⁸⁰.

É bem estabelecido que pacientes com diabetes, especialmente com inadequado controle metabólico, apresentam níveis aumentados de citocinas no plasma e no fluido sulcular gengival^{61, 171, 188, 191} levando a dano tecidual^{38, 210} e

influenciando nas complicações relacionadas ao diabetes^{138, 184}. No entanto, os poucos estudos que investigaram a peroxidação lipídica como um possível mecanismo adicional para a severidade da resposta inflamatória e da doença periodontal em pacientes com diabetes^{43, 202, 220}, não consideraram o perfil imunoinflamatório local e/ou sistêmico do indivíduo, tornando difícil, estabelecer uma correlação entre achados clínicos periodontais e de peroxidação lipídica com a magnitude da resposta inflamatória gerada.

No presente estudo, em relação aos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e IL-10) no fluido sulcular gengival, além de confirmar que pacientes com DM e pobre controle metabólico apresentam maior expressão de tais marcadores em sítios com periodontite crônica, também foi verificada uma significativa correlação entre níveis plasmáticos de MDA e a expressão local de citocinas, especialmente em relação ao TNF- α , dado este ainda não relatado na literatura. Além disso, os resultados da regressão logística sugerem que o aumento da peroxidação lipídica, local e sistêmica, pode aumentar o risco de expressão de marcadores inflamatórios locais, particularmente TNF- α . Estes achados demonstram um papel potencial da peroxidação lipídica quanto ao aumento na expressão de citocinas no tecido inflamado e, conseqüente, destruição periodontal.

Em se tratando de marcadores inflamatórios plasmáticos, no presente estudo foram avaliadas 12 citocinas e estas foram correlacionadas com condições sistêmicas. Poucos estudos que avaliaram marcadores inflamatórios categorizaram os pacientes com DM de acordo com o controle metabólico,

baseado nos níveis de HbA1c^{30, 70, 100, 120, 186}. No presente estudo, foi observado que a expressão das citocinas seguiu um padrão decrescente do grupo 1 ao grupo 4 tanto para citocinas pró- quanto anti-inflamatórias, sendo esta diferença significativa para IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e TNF- α . Esta diferença ocorreu em maior magnitude na comparação do grupo 1 em relação aos demais grupos, embora nos pacientes portadores de diabetes com adequado controle metabólico os níveis destas citocinas também estivessem mais elevados em relação aos pacientes saudáveis. Tais resultados estão em concordância com outros estudos que mostraram um elevado padrão de citocinas inflamatórias em pacientes com inadequado controle metabólico^{6, 39, 40}. Além disso, conforme demonstrado por outros autores^{70, 251}, no presente estudo a expressão de adipocitocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , foi maior em pacientes com dislipidemia (grupos 1, 2 e 3).

Dados relevantes foram encontrados nos pacientes com adequado controle metabólico. Este grupo de pacientes geralmente é considerado de menor risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e complicações relacionadas ao diabetes, quando comparados aos pacientes com inadequado controle metabólico^{3, 167} e, por essas razões, não é avaliado frequentemente em relação ao perfil lipídico e às proteínas de fase aguda. Entretanto, os resultados verificados neste estudo em relação ao grupo 2, como maiores níveis de proteína C-reativa e de circunferência abdominal, altos níveis de peroxidação lipídica e de citocinas inflamatórias plasmáticas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α),

demonstram que há um erro de premissa. Neste contexto, alguns autores enfatizam que o aumento do metabolismo oxidativo pode levar ao início ou à progressão do diabetes^{77, 237} e a que peroxidação lipídica pode ser um evento precoce importante na patogênese do desenvolvimento das complicações associadas ao DM, mesmo em pacientes com bom controle metabólico³⁰. Desta forma, os resultados do presente estudo apontam para a importância de que sejam estabelecidas também para pacientes com adequado controle metabólico, metas de prevenção devem ser tomadas buscando evitar um pobre controle metabólico no futuro.

Apesar dos pacientes com DM serem considerados obesos (BMI>30) e apresentarem altos valores de circunferência abdominal, de resistência insulínica e de citocinas (IL-6 e TNF- α), não houve correlação significativa entre citocinas plasmáticas e parâmetros físicos, diferente dos resultados de alguns estudos^{33, 242}. Além disso, foram observadas correlações significativas fracas (0.2) citocinas (IL-6 e o TNF- α) com a resistência insulínica (HOMA IR). Apesar de estudos prévios demonstrarem associação entre resistência insulínica e a expressão de citocinas inflamatórias^{242, 250, 251}, outros estudos não encontraram tal relação e afirmam que o nível de citocinas circulantes está mais relacionado à hiperglicemia⁶³ ou à presença de tecido adiposo^{33, 243} do que à resistência insulínica propriamente dita²⁵¹.

No presente estudo foram verificadas correlações moderadas e significantes entre citocinas, como IL1- β , TNF- α e IL-6, e marcadores de

peroxidação lipídica, como MDA e LDLox. As análises de regressão também mostraram que a peroxidação lipídica possui um importante papel no aumento do risco de expressão de citocinas plasmáticas, em especial IL1- β e TNF- α . No entanto, foram observadas correlações significativas, porém fracas, entre a expressão das citocinas plasmáticas e o perfil lipídico. Este achado sugere que, apesar da dislipidemia contribuir efetivamente para a ocorrência de peroxidação lipídica, seu papel no aumento da expressão de marcadores inflamatórios é mais significativo quando esta é associada ao diabetes.

O mecanismo preciso pelo qual a peroxidação lipídica pode levar à maior expressão de citocinas ainda não é bem elucidado em estudos clínicos. No entanto, alguns estudos sugerem que o aumento do metabolismo oxidativo ativa fatores de transcrição como o (NF- κ B) ²⁵³ e aumenta a expressão de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) ⁶³, sendo um mecanismo que pode levar à hiperglicemia aguda e a complicações do diabetes⁷⁷. Além disso, foi demonstrado⁸ que a inibição da peroxidação lipídica é capaz de normalizar a expressão de citocinas angiogênicas como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), melhorando a cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Desta forma, pode-se sugerir que a peroxidação lipídica pode ser um mecanismo adicional importante na expressão aumentada de marcadores inflamatórios em pacientes com diabetes e dislipidemia.

Apesar deste estudo apresentar limitações, inerentes a um estudo transversal, que não permitem conclusões generalizadas ou de causalidade, foi possível observar que marcadores de peroxidação lipídica no plasma e no

periodonto estão aumentados nos pacientes com diabetes que apresentam dislipidemia, particularmente quando há pobre controle metabólico. Além disso, níveis locais e sistêmicos de peroxidação lipídica aumentaram a expressão de citocinas plasmáticas e locais, o que pode contribuir para a ocorrência de inflamação difusa e dano a diversos tecidos, dentre esses o periodonto.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- 1- A peroxidação lipídica plasmática, mesmo em pacientes com adequado controle metabólico, esteve associada a níveis elevados de citocinas plasmáticas, sugerindo um possível mecanismo adicional na modulação da resposta inflamatória em pacientes com diabetes e dislipidemia.
- 2- Foi possível quantificar um importante marcador de peroxidação lipídica no fluido sulcular gengival utilizando cromatografia líquida de alta performance, com exatidão e precisão.
- 3- A avaliação do MDA no fluido sulcular gengival, inclusive de sítios saudáveis, podendo ser avaliada como possível marcador de risco para periodontite crônica.
- 4- A peroxidação lipídica pode ser um mecanismo importante para a expressão aumentada de marcadores inflamatórios no fluido sulcular gengival e maior severidade da periodontite crônica do paciente portador de diabetes com dislipidemia.
- 5- A presença de maiores níveis de peroxidação lipídica, e meramente a dislipidemia, em pacientes com diabetes sugere que a associação diabetes/dislipidemia possa afetar a magnitude da inflamação local e sistêmica.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS*

1. AAP. International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-112.
2. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta.* 2001; 306: 1-17.
3. ADA. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011; 34 Suppl 1: S11-61.
4. Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 558-65.
5. Al Habashneh R, Khader Y, Hammad MM, Almuradi M. Knowledge and awareness about diabetes and periodontal health among Jordanians. *J Diabetes Complications.* 2009; 24: 409-14.
6. Allen EM, Matthews JB, DJ OH, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011; 38: 894-901.
7. Allen EM, Matthews JB, O'Connor R, O'Halloran D, Chapple IL. Periodontitis and type 2 diabetes: is oxidative stress the mechanistic link? *Scott Med J.* 2009; 54: 41-7.
8. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes.* 2001; 50: 667-74.
9. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab.* 1992; 18: 264-71.
10. Andriankaja OM, Barros SP, Moss K, Panagakos FS, DeVizio W, Beck J, et al. Levels of serum interleukin (IL)-6 and gingival crevicular fluid of IL-1beta and prostaglandin E(2) among non-smoking subjects with gingivitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2009; 80: 307-16.
11. Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycosylated sites. *J Biol Chem.* 1987; 262: 16969-72.
12. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998; 160: 403-9.
13. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med.* 1978; 298: 659-68.
14. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32: 239-49.

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

15. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et biophysica acta*. 1991; 1072: 63-80.
16. Bandyopadhyay D, Marlow NM, Fernandes JK, Leite RS. Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 501-9.
17. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontal Res*. 1984; 19: 390-400.
18. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 189-94.
19. Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 183: 1153-8.
20. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991; 40: 405-12.
21. Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *J Orthop Res*. 2002; 20: 1210-6.
22. Bierman EL. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 647-56.
23. Bird RP, Hung SS, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1983; 128: 240-4.
24. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab*. 2000; 26: 163-76.
25. Borges I, Jr., Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007: 45794.
26. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol*. 1996; 67: 1185-92.
27. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 515-21.
28. Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*. 1994; 43: 836-41.
29. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-20.
30. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab*. 2005; 31: 551-7.
31. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005; 76: 418-25.
32. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70: 619-28.

33. Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia*. 2004; 47: 1029-37.
34. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Lefebvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabet Med*. 1991; 8: 540-2.
35. Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010; 81: 1708-24.
36. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2006; 35: 491-510.
37. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 287-96.
38. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007; 43: 160-232.
39. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent*. 2009; 7: 107-27.
40. Chirico S, Smith C, Marchant C, Mitchinson MJ, Halliwell B. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Radic Res Commun*. 1993; 19: 51-7.
41. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc*. 1982; 104: 653-60.
42. Colas R, Pruneta-Deloche V, Guichardant M, Luquain-Costaz C, Cugnet-Anceau C, Moret M, et al. Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients. *Lipids*. 2010; 45: 723-31.
43. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*. 2000; 35: 259-65.
44. Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*. 1993; 68: 499-508.
45. Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SR. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 53-8.
46. Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Gustafsson A, Orrico SR. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of interleukin-1beta and proteases in gingival crevicular fluid from patients with type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2008; 79: 2143-50.
47. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol*. 1999; 70: 1313-21.
48. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: 3989-94.

49. DCCT. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993; 329: 977-86.
50. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 202-26.
51. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991; 14: 173-94.
52. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; 15: 316-28.
53. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med.* 1997; 14: 29-34.
54. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res.* 2010; 89: 609-14.
55. Ding KH, Wang ZZ, Hamrick MW, Deng ZB, Zhou L, Kang B, et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340: 1091-7.
56. Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004; 237: 57-89.
57. Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007; 13: 594-9.
58. Elbim C, Pillet S, Prevost MH, Preira A, Girard PM, Rogine N, et al. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load. *J Virol.* 1999; 73: 4561-6.
59. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol 2000.* 2000; 24: 193-214.
60. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62: 123-31.
61. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004; 75: 1203-8.
62. Engelgau MM, Geiss LS, Saaddine JB, Boyle JP, Benjamin SM, Gregg EW, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 945-50.
63. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002; 106: 2067-72.
64. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.
65. Fentoglu O, Oz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykac Y, Bozkurt FY. Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol.* 2009; 80: 267-73.
66. Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life.* 2001; 52: 3-6.

67. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J.* 2003; 17: 1762-4.
68. Fukunaga K, Takama K, Suzuki T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Anal Biochem.* 1995; 230: 20-3.
69. Furukawa T, Wakai K, Yamanouchi K, Oshida Y, Miyao M, Watanabe T, et al. Associations of periodontal damage and tooth loss with atherogenic factors among patients with type 2 diabetes mellitus. *Intern Med.* 2007; 46: 1359-64.
70. Gambino R, Uberti B, Alemanno N, Pisu E, Pagano G, Cassader M. In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control. *Atherosclerosis.* 2004; 173: 103-7.
71. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990; 85: 632-9.
72. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53: 169-80.
73. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol.* 2005; 76: 2075-84.
74. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus? *Med Hypotheses.* 1989; 29: 47-50.
75. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care.* 1991; 14: 839-55.
76. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998; 39: 1529-42.
77. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996; 19: 257-67.
78. Golub LM, Nicoll GA, Iacono VJ, Ramamurthy NS. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun.* 1982; 37: 1013-20.
79. Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, Balian G, Hurwitz SR. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. *Connect Tissue Res.* 2000; 41: 81-91.
80. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol.* 2001; 159: 513-25.
81. Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci.* 2008; 13: 1227-39.
82. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res.* 2011; 90: 143-53.
83. Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000.* 2007; 45: 128-37.

84. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1995; 98: 469-75.
85. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003; 31: 32-42.
86. Griffiths R, Barbour S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism in periodontal disease. *Clin Lipidol.* 2010; 5: 397-411.
87. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol.* 2001; 6: 138-45.
88. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 51-61.
89. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charao MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43: 619-24.
90. Haffner SM. Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Am J Cardiol.* 2002; 90: 55i-61i.
91. Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207: 280-7.
92. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis.* 2000; 6: 136-7.
93. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 2003; 540: 3-6.
94. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280: 1-8.
95. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004; 18: 2195-224.
96. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology.* 2004; 145: 447-52.
97. Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1998; 42: 440-52.
98. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem.* 2000; 33: 619-25.
99. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 923-34.
100. Hussein OA, Gefen Y, Zidan JM, Karochero EY, Luder AS, Assy NN, et al. LDL oxidation is associated with increased blood hemoglobin A1c levels in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 2007; 377: 114-8.
101. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995; 1: 214-29.

102. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000; 71: 1375-84.
103. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem.* 1989; 264: 21340-5.
104. Jennings PE, McLaren M, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJ. The relationship of oxidative stress to thrombotic tendency in type 1 diabetic patients with retinopathy. *Diabet Med.* 1991; 8: 860-5.
105. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol.* 2005; 4: 5.
106. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 1573-9.
107. Kaji H, Kurasaki M, Ito K, Saito T, Saito K, Niioka T, et al. Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic women. *Klin Wochenschr.* 1985; 63: 765-8.
108. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, et al. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia.* 1994; 37: 264-9.
109. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 40-4.
110. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13: 2829-32.
111. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 2000; 26: 387-92.
112. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications.* 2006; 20: 59-68.
113. Khalili J, Biloklytska HF. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis.* 2008; 14: 754-60.
114. Kim EJ, Jin BH, Bae KH. Periodontitis and obesity: a study of the Fourth Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2011; 82: 533-42.
115. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 278-93.
116. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell SE. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med.* 1994; 45: 179-88.

117. Klein RL, Laimins M, Lopes-Virella MF. Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 1995; 44: 1093-8.
118. Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*. 1988; 34: 2433-8.
119. Koromantzou PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol*. 2011; 38: 142-7.
120. Kostolanska J, Jakus V, Barak L. HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2009; 22: 433-42.
121. Krauss RM, Siri PW. Dyslipidemia in type 2 diabetes. *Med Clin North Am*. 2004; 88: 897-909, x.
122. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 1998; 82: 67U-73U; discussion 85U-6U.
123. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 200: 248-54.
124. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2006; 77: 1803-8.
125. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3665-73.
126. Kushiyama M, Shimazaki Y, Yamashita Y. Relationship between metabolic syndrome and periodontal disease in Japanese adults. *J Periodontol*. 2009; 80: 1610-5.
127. Lalla E. Periodontal infections and diabetes mellitus: when will the puzzle be complete? *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 913-6.
128. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 7: 738-48.
129. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1098: 216-29.
130. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139 Suppl: 19S-24S.
131. Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, Hodge PJ. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 634-41.
132. Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol*. 1998; 38: 981-93.
133. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 216-26.

134. Li K, Shang X, Chen Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clin Chim Acta*. 2004; 346: 199-203.
135. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 2327-34.
136. Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 118-23.
137. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 1999; 13: 347-52.
138. Liu J, Shi B, He S, Yao X, Willcox MD, Zhao Z. Changes to tear cytokines of type 2 diabetic patients with or without retinopathy. *Molecular vision*. 2010; 16: 2931-8.
139. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. 2006; 85: 510-4.
140. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*. 2004; 145: 2997-3003.
141. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16: 329-34.
142. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005; 76: 2106-15.
143. Losche W, Karapetow F, Pohl A, Pohl C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 537-41.
144. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003; 144: 346-52.
145. Luqman S, Rizvi SI. Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytother Res*. 2006; 20: 303-6.
146. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: S58-65.
147. Mahamed DA, Marleau A, Alnaeli M, Singh B, Zhang X, Penninger JM, et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2005; 54: 1477-86.
148. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol*. 1981; 52: 410-5.
149. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull*. 1995; 51: 419-36.
150. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17: 24-38.
151. Marjani A. Age-related alterations of plasma lipid peroxidation and erythrocyte superoxide dismutase activity in different age groups of Gorgan City, Iran. *Saudi Med J*. 2005; 26: 1647-8.

152. Marjani A. Lipid peroxidation alterations in type 2 diabetic patients. *Pak J Biol Sci.* 2010; 13: 723-30.
153. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ.* 1999: 17-27.
154. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28: 412-9.
155. Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol.* 2009; 44: 625-33.
156. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, LeGuen C, Baxter MA, Thorpe GH, et al. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem.* 1997; 34 (Pt 6): 638-44.
157. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1004-8.
158. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77: 1289-303.
159. Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today.* 2003; 22: 107-13.
160. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009; 5: 150-9.
161. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res.* 1983; 24: 1070-6.
162. Morita M, Horiuchi M, Kinoshita Y, Yamamoto T, Watanabe T. Relationship between blood triglyceride levels and periodontal status. *Community Dent Health.* 2004; 21: 32-6.
163. Morita T, Yamazaki Y, Mita A, Takada K, Seto M, Nishinoue N, et al. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. *J Periodontol.* 2010; 81: 512-9.
164. Murillo J, Wang Y, Xu X, Klebe RJ, Chen Z, Zardeneta G, et al. Advanced glycation of type I collagen and fibronectin modifies periodontal cell behavior. *J Periodontol.* 2008; 79: 2190-9.
165. Nacitarhan S, Ozben T, Tuncer N. Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19: 893-6.
166. Nakhjavani M, Khalilzadeh O, Khajeali L, Esteghamati A, Morteza A, Jamali A, et al. Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol. *Lipids.* 2010; 45: 321-7.
167. NCEP. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106: 3143-421.
168. Neurath MF, Becker C, Barbusescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut.* 1998; 43: 856-60.

169. Nibali L, D'Aiuto F, Griffiths G, Patel K, Suvan J, Tonetti MS. Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 931-7.
170. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338: 668-76.
171. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 245-53.
172. Niskanen LK, Salonen JT, Nyyssonen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabet Med.* 1995; 12: 802-8.
173. Njajou OT, Kanaya AM, Holvoet P, Connelly S, Strotmeyer ES, Harris TB, et al. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009; 25: 733-9.
174. Noma H, Sakamoto I, Mochizuki H, Tsukamoto H, Minamoto A, Funatsu H, et al. Relationship between periodontal disease and diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2004; 27: 615.
175. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Machigashira M, Matsuyama T, Matsuguchi T. Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 43-51.
176. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett.* 2005; 10: 255-64.
177. Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23: 3-13.
178. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem.* 1996; 271: 13422-9.
179. Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 287-305.
180. Polson AM, Goodson JM. Periodontal diagnosis. Current status and future needs. *J Periodontol.* 1985; 56: 25-34.
181. Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Bonavita MS, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide triggers activation of human platelets selectively exposed to nonaggregating concentrations of arachidonic acid and collagen. *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 364-70.
182. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011; 38 Suppl 11: 60-84.
183. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L. Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2009; 80: 1166-73.
184. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000; 101: 2149-53.

185. Rittie L, Monboisse JC, Gorisse MC, Gillery P. Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. *J Cell Physiol.* 2002; 191: 227-36.
186. Rytter E, Vessby B, Asgard R, Johansson C, Sjodin A, Abramsson-Zetterberg L, et al. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *The British journal of nutrition.* 2009; 101: 1423-6.
187. Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 24-9.
188. Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 254-66.
189. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res.* 2004; 83: 485-90.
190. Sakiyama Y, Kato R, Inoue S, Suzuki K, Itabe H, Yamamoto M. Detection of oxidized low-density lipoproteins in gingival crevicular fluid from dental patients. *J Periodontal Res.* 2010; 45: 216-22.
191. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 40-50.
192. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 8-16.
193. Sampi M, Veneskoski M, Ukkola O, Kesaniemi YA, Horkko S. High plasma immunoglobulin (Ig) A and low IgG antibody titers to oxidized low-density lipoprotein are associated with markers of glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 2467-75.
194. Sanchez-Hernandez PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gomez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velazquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2010; 17: 522-9.
195. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Ordonez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 329-35.
196. Santo Faulin Tdo E, de Sena KC, Rodrigues Telles AE, de Mattos Grosso D, Bernardi Faulin EJ, Parra Abdalla DS. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: 1769-75.
197. Santos VR, Lima JA, Goncalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010; 81: 1455-65.
198. Saremi A, Nelson RG, Tulloch-Reid M, Hanson RL, Sievers ML, Taylor GW, et al. Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28: 27-32.
199. Sastrowijoto SH, Hillemans P, van Steenberghe TJ, Abraham-Inpijn L, de Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 316-22.
200. Saxlin T, Ylostalo P, Suominen-Taipale L, Mannisto S, Knuutila M. Association between periodontal infection and obesity: results of the Health 2000 Survey. *J Clin Periodontol.* 2011; 38: 236-42.

201. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1395-403.
202. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 508-15.
203. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2155-68.
204. Schneir M, Imberman M, Ramamurthy N, Golub L. Streptozotocin-induced diabetes and the rat periodontium: decreased relative collagen production. *Coll Relat Res.* 1988; 8: 221-32.
205. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; 10: 2247-58.
206. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61: 137-43.
207. Sen CK. Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1995; 39: 177-96.
208. Seppala B, Sorsa T, Ainamo J. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. *J Periodontol.* 1997; 68: 1237-45.
209. Shapira L, Gordon B, Warbington M, Van Dyke TE. Priming effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on superoxide production by neutrophils from healthy and rapidly progressive periodontitis subjects. *J Periodontol.* 1994; 65: 129-33.
210. Sheikhi M, Bouhafs RK, Hammarstrom KJ, Jarstrand C. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from *Fusobacterium*-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis.* 2001; 7: 41-6.
211. Shimazaki Y, Egami Y, Matsubara T, Koike G, Akifusa S, Jingu S, et al. Relationship between obesity and physical fitness and periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81: 1124-31.
212. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc.* 1990; 121: 532-6.
213. Shultis WA, Weil EJ, Looker HC, Curtis JM, Shlossman M, Genco RJ, et al. Effect of periodontitis on overt nephropathy and end-stage renal disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30: 306-11.
214. Sima C, Rhourida K, Van Dyke TE, Gyurko R. Type 1 diabetes predisposes to enhanced gingival leukocyte margination and macromolecule extravasation in vivo. *J Periodontal Res.* 2010; 45: 748-56.
215. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341: 738-46.

216. Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia*. 2010; 53: 378-88.
217. Slatter DA, Paul RG, Murray M, Bailey AJ. Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem*. 1999; 274: 19661-9.
218. Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit*. 2000; 6: 875-81.
219. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000. 1994; 5: 7-25.
220. Sonoki K, Nakashima S, Takata Y, Naito T, Fujisawa K, Ootsubo T, et al. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol*. 2006; 77: 1907-13.
221. Spitz DR, Malcolm RR, Roberts RJ. Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and 2-nonenal in H₂O₂-resistant cell lines. Do aldehydic by-products of lipid peroxidation contribute to oxidative stress? *Biochem J*. 1990; 267: 453-9.
222. Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol*. 2005; 205: 1-16.
223. Svensson PA, Asea A, Englund MC, Bausero MA, Jernas M, Wiklund O, et al. Major role of HSP70 as a paracrine inducer of cytokine production in human oxidized LDL treated macrophages. *Atherosclerosis*. 2006; 185: 32-8.
224. Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, et al. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol*. 2006; 77: 15-20.
225. Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 1992; 93: 237-44.
226. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 2008; 14: 191-203.
227. 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.
228. Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 946-51.
229. Tervonen T, Knuutila M. Relation of diabetes control to periodontal pocketing and alveolar bone level. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986; 61: 346-9.
230. Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res*. 1994; 35: 417-27.
231. Thorstensson H, Kuylenstierna J, Hugoson A. Medical status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 194-202.

232. Timonen P, Niskanen M, Suominen-Taipale L, Jula A, Knuuttila M, Ylostalo P. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries. *J Dent Res.* 2010; 89: 1068-73.
233. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 378-84.
234. Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, et al. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 2002; 39: 117-22.
235. UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998; 352: 837-53.
236. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.
237. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metab Rev.* 1995; 11: 181-92.
238. van der Poll T, Braxton CC, Coyle SM, Boermeester MA, Wang JC, Jansen PM, et al. Effect of hypertriglyceridemia on endotoxin responsiveness in humans. *Infect Immun.* 1995; 63: 3396-400.
239. VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem.* 2001; 34: 265-70.
240. Varani J, Fligiel SE, Till GO, Kunkel RG, Ryan US, Ward PA. Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils. Possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest.* 1985; 53: 656-63.
241. Velazquez E, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KG, Laker MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med.* 1991; 8: 752-8.
242. Vinik AI. The metabolic basis of atherogenic dyslipidemia. *Clinical cornerstone.* 2005; 7: 27-35.
243. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity research.* 2001; 9: 414-7.
244. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* 2000; 6: 138-51.
245. Wang ML, Hauschka PV, Tuan RS, Steinbeck MJ. Exposure to particles stimulates superoxide production by human THP-1 macrophages and avian HD-11EM osteoclasts activated by tumor necrosis factor-alpha and PMA. *J Arthroplasty.* 2002; 17: 335-46.
246. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010; 55: 70-8.

247. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000; 17: 171-80.
248. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1047-53.
249. Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science.* 1985; 227: 640-2.
250. Winkler G, Salamon F, Salamon D, Speer G, Simon K, Cseh K. Elevated serum tumour necrosis factor-alpha levels can contribute to the insulin resistance in Type II (non-insulin-dependent) diabetes and in obesity. *Diabetologia.* [Letter]. 1998; 41: 860-1.
251. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2004; 15: 2792-800.
252. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids.* 1987; 45: 337-51.
253. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994; 269: 9889-97.
254. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes.* 2001; 50: 1495-504.
255. Yoshida T, Flegler A, Kozlov A, Stern PH. Direct inhibitory and indirect stimulatory effects of RAGE ligand S100 on sRANKL-induced osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2009; 107: 917-25.
256. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem.* 1991; 28 (Pt 5): 504-8.
257. Yu H, Li Q, Herbert B, Zinna R, Martin K, Junior CR, et al. Anti-inflammatory effect of MAPK phosphatase-1 local gene transfer in inflammatory bone loss. *Gene Ther.* 2011; 18: 344-53.

APÊNDICE

Apêndice 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da Amostra

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Protocolo nº 50/06) (Anexo A) e foi conduzido entre Maio de 2009 e Novembro de 2010. Os pacientes foram selecionados dentre os que buscam atendimento na Faculdade de Odontologia de Araraquara e os que foram encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde do município e região.

Após esclarecimento da natureza e objetivos da pesquisa, os pacientes confirmaram sua aceitação para participar do estudo mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Os participantes desta pesquisa receberam orientação sobre a doença periodontal e, após as coletas de material, foram encaminhados para tratamento periodontal. Os pacientes portadores de diabetes, quando necessário, foram encaminhados ao endocrinologista responsável para acompanhamento e eventual tratamento da condição metabólica.

Grupos

O cálculo da amostra foi baseado em um estudo piloto conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, em que observando uma diferença de 3.0 unidades na concentração de um determinado marcador de peroxidação lipídica (MDA) e usando um desvio padrão de 1.4 unidades, poderia ser observada uma diferença significativa entre o um grupo de pacientes com diabetes quando comparado a

um grupo sem diabetes. Desta forma, foi calculado que seriam necessários pelo menos 20 pacientes em cada grupo para termos um poder de 90% com um intervalo de confiança de 95%. Tendo em vista a possibilidade de desistência dos pacientes em participar do estudo durante as fases de execução, cada grupo foi constituído de 30 pacientes.

Sendo assim, a amostra foi composta por 120 pacientes, divididos em quatro grupos:

GRUPO 01 (n=30)- Indivíduos portadores de Diabetes mellitus tipo 2, descompensados metabolicamente ($HbA_{1c} < 8,0\%$), com periodontite crônica³ e com dislipidemia⁴;

GRUPO 02 (n=30)- Indivíduos portadores de Diabetes mellitus tipo 2, compensados metabolicamente ($HbA_{1c} \geq 8,0\%$), com periodontite crônica³ e com dislipidemia⁴);

GRUPO 03 (n=30)- Indivíduos sistemicamente saudáveis, com periodontite crônica³ e com dislipidemia⁴.

GRUPO 04 (n=30)- Indivíduos sistemicamente saudáveis, com periodontite crônica³ e sem dislipidemia⁴.

Para o grupo de indivíduos portadores de diabetes, foi realizado exame laboratorial para avaliação da HbA_{1c} e, a partir deste resultado, o paciente foi alocado no grupo 01 (descompensado metabolicamente) ou no grupo 02

(compensado metabolicamente). Para o grupo 03, indivíduos sistemicamente saudáveis, o exame de glicemia de jejum foi realizado para confirmação da ausência do diabetes, sendo considerados normoglicêmicos aqueles com resultado inferior a 100mg/dl.

O critério de $HbA_{1c} \geq 8,0\%$, no grupo de pacientes metabolicamente descompensados, foi escolhido para evitar a inclusão de pacientes com descompensação metabólica transitória e foi baseado em estudos prospectivos e randomizados^{1,2} que definem o limite de 7% da HbA_{1c} como controle metabólico aceitável. Assim, a inclusão de pacientes com 1% acima do limite superior objetivou eliminar a interferência de possíveis alterações metabólicas transitórias.

Critérios de Inclusão

- Ambos os sexos
- Idade de 35 a 60 anos
- Presença de, no mínimo, 15 dentes
- Apresentar pelo menos 4 sítios com profundidade de sondagem (PS) \geq 5mm, nível de inserção (NI) \geq 4mm e sangramento à sondagem (SS), em dentes não-adjacentes.

Critérios de Exclusão

- Antibioticoterapia nos seis meses anteriores e de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos três meses antecessores ao estudo
- Gestação e lactação
- Uso de anticoncepcional ou qualquer outra forma de hormônio
- Tabagismo
- Presença de anemia
- Tratamento periodontal nos últimos 6 meses
- Uso de drogas hipolipemiantes: vastatinas, estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, resinas de troca, fibratos, ácido nicotínico, ômega-3, ácido acetilsalicílico (AAS), inibidores da enzima de conversão (IECA), betabloqueadores (BB)
- Uso de drogas que interferem no metabolismo lipídico: imunossupressores, esteróides, anticonvulsivantes, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, amiodarona, alopurinol, glitazonas
- História de doenças que interferem no metabolismo lipídico: hipotireoidismo, hipopituitarismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, atresia biliar congênita, doenças de armazenamento, lúpus eritematoso sistêmico.

Procedimentos Clínicos

Anamnese:

Todos os pacientes foram submetidos a um questionário estruturado com relação aos dados demográficos, história de saúde geral e bucal. Os

pacientes portadores de diabetes foram avaliados quanto à história pregressa da doença, presença de complicações associadas ao diabetes⁶, medicações utilizadas para controle metabólico, dentre outras informações por meio de uma ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes da Faculdade de Odontologia de Araraquara (anexo 7.5).

Exame Físico

A amostra foi submetida a um exame físico no qual foram avaliados: circunferência abdominal, proporção cintura/quadril e peso e altura para obtenção do índice de massa corporal (IMC) de cada paciente.

Exame Clínico Intrabucal e Radiográfico

Todos os pacientes foram submetidos a exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado ($\kappa=0.89$), usando instrumental da marca Hufriedy[®].

A avaliação periodontal foi composta de índice de placa visível (IPV), índice de sangramento marginal (ISM), sangramento à sondagem (SS), mensuração da profundidade de sondagem, posição da margem gengival e nível clínico de inserção (NI). Foi realizado ainda um exame radiográfico de boca toda para avaliação da perda óssea periodontal.

Índice de placa visível (IPV): presença ou não de placa bacteriana visível a olho nu, após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes.

Índice de sangramento marginal (ISM): presença ou ausência de sangramento marginal após percorrer o espaço do sulco de uma proximal a outra, com a sonda periodontal milimetrada inclinada em 60 graus em relação ao dente.

Posição da margem gengival (NG): distância da margem gengival à junção cimento-esmalte.

Mensuração da profundidade de sondagem(PS): distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, medida com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e disto-lingual.

Sangramento à sondagem (SS): presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem.

Avaliação do nível clínico de inserção (NI): corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio de cada elemento dentário.

Procedimentos radiográficos: o exame radiográfico intra-oral de cada paciente foi composto por radiografias periapicais de boca toda realizadas com auxílio de posicionadores autoclaváveis da marca RINN; filme periapical kodak e um aparelho de raio-X odontológico convencional. Posteriormente, os filmes

radiográficos foram processados na processadora automática Dent – X 9000 utilizando soluções químicas kodak e montados em cartelas apropriadas para interpretação das imagens em negatoscópio.

Uma classificação de periodontite crônica severa foi definida para aqueles pacientes que apresentavam profundidade de sondagem (PS) ≥ 6 mm, nível de inserção (NI) ≥ 5 mm e sangramento à sondagem em pelo menos 8 sítios distribuídos em diferentes quadrantes¹¹⁰.

Todas as mensurações foram realizadas em uma sessão anterior à coleta do fluido sulcular gengival para evitar o estímulo do fluido ou sangramento o que poderia interferir com o processo de coleta.

Coleta do Fluido Sulcular Gengival

Para cada paciente foram selecionados, em dentes não adjacentes:

- 4 sítios com periodontite crônica: PS ≥ 5 mm, perda de inserção ≥ 4 mm e com sangramento à sondagem

- 4 sítios sem doença periodonal: PS ≤ 3 mm, sem perda de inserção e sem sangramento à sondagem,

A placa bacteriana supragengival foi removida dos sítios selecionados e a região foi isolada com rolos de algodão estéreis e gentilmente seca com jato de ar.

O fluido sulcular foi coletado com a introdução de um filtro especial* para fluido gengival mantido durante 1 minuto, sendo descartada a amostra contaminada visivelmente com sangue. A seguir, o volume de fluido foi quantificado utilizando-se um equipamento† específico para esta metodologia.

Para a análise imunológica, as tiras contendo o fluido sulcular gengival dos sítios selecionados foram acondicionadas em um único tubo (pool) contendo 300 µl de solução de PBS (phosphate-buffered saline).

Após um intervalo de uma hora, outra amostra de fluido gengival foi coletada para a análise do MDA, sendo que as tiras obtidas dos mesmos sítios também foram acondicionadas em um único tubo (pool) contendo 300 µl de solução de PBS.

Procedimentos Laboratoriais

Análise laboratorial do controle metabólico e perfil lipídico

Após um jejum de 12 horas, os pacientes foram encaminhados a um Laboratório de Análises Clínicas com experiência na realização dos exames solicitados, onde foram realizadas as seguintes análises: Hemograma‡,

* Periopaper[®], Oraflow Inc. (EUA)

† Periotron[®], Oraflow Inc. (EUA)

‡ ABX Micros 60

Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado)[§], HbA_{1c} (método de imunoenensaio de inibição turbidimétrica)^{**}, Proteína C-reativa ultrasensível (método nefelometria). O nível de insulina foi determinado pelo método de quimioluminescência (uUI/mL), permitindo calcular o índice de resistência insulínica HOMA (HOMA IR)¹⁴¹. O perfil lipídico foi avaliado por meio triglicérides (método enzimático-Trinder)^{††}, Colesterol Total (método enzimático-Trinder)^{‡‡} e HDL-colesterol (método enzimático)^{§§}.

As frações do VLDL e LDL-colesterol foram calculadas segundo a equação de Friedewald (válida se Triglicérides <400mg/dl)⁴:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{triglicérides} / 5$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

Para evitar a inclusão de pacientes com dislipidemia transitória, para os grupos 1, 2 e 3, foram considerados os limites superiores de cada fração lipídica, de acordo com o National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III)⁴:

Colesterol Total (CT): Considerado alto para valores ≥ 240 mg/dl.

LDL (Low density lipoprotein): Considerado alto para valores ≥ 160 mg/dl.

[§] Kit Labtest

^{**} Kit Roche

^{††} Kit Labtest

^{‡‡} Kit Labtest

^{§§} Kit Labtest

HDL (High density lipoprotein): Considerado baixo para valores ≤ 40 mg/dl.

Triglicérides (TG): Considerado alto para valores ≥ 200 mg/dl.

Coleta das Amostras de Plasma Sangüíneo

Foram coletados no mesmo Laboratório de Análises Clínicas sangue de cada paciente em tubos com EDTA de cada paciente para posterior análise imunológica e dos níveis de peroxidação lipídica (LDL oxidada e MDA).

Processamento das amostras para análise de Peroxidação Lipídica

Análise da LDL-oxidada

- **Amostras de plasma sangüíneo:**

A amostra de sangue total foi centrifugada (3000g durante 10 minutos a 4°C) para obtenção do plasma sangüíneo e este foi aliqotado e congelado em freezer a -80°C para posterior determinação do LDL oxidada.

As amostras de plasma sangüíneo foram processadas por meio de kit ELISA, disponível comercialmente (MercoDIA AB oxidized LDL ELISA kits[®] - Sweden) seguindo as recomendações do fabricante. A absorbância foi medida por meio de espectofotômetro em 450 nm por um leitor de placas (Synergy Mx, Biotek Instruments Inc, USA)

Análise do MDA

A avaliação das amostras foi realizada no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-high performance chromatography), (Shimadzu, Tokyo, Japan) quantificando a reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA), para formação do produto dosado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/PDA), com detecção na absorvância de 532 nm. Antes do processamento das amostras foi construída uma curva de calibração utilizando uma solução estoque de MDA, preparada no mesmo dia da avaliação e foi incluída paralelamente às amostras para comparação. Os níveis de MDA no fluido sulcular gengival e no plasma foram determinadas de acordo com o método descrito por Hong et al.⁸⁹.

▪ Amostras de fluido sulcular gengival:

Após um período de 40 minutos da coleta das amostras do fluido sulcular gengival, à temperatura ambiente, as tiras foram removidas dos tubos e as amostras foram imediatamente congeladas em freezer a -80°C para posterior análise.

Brevemente, a cada tubo contendo 300 µL da solução de fluido sulcular gengival e PBS foram adicionados 36 µL Butylated hydroxytoluene (BHT) (0,2% em etanol 95%) e 100 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 0.44 M. Os tubos

foram levados ao vórtex e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, 150 µL de uma solução preparada com 0.6% de ácido tiobarbitúrico (TBA) em H₃PO₄ 0.44 M foram adicionados a todos os tubos, levados ao vórtex e incubadas em banho-maria a 90°C por 45 minutos. Após incubação os tubos foram deixados à temperatura ambiente e o aduto (fase rosa) foi extraído com n-butanol (150 µL). A fase n-butanólica foi então injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/PDA.

▪ **Amostras de plasma sanguíneo:**

As amostras de sangue total foram centrifugadas (3000g durante 10 minutos a 4°C) para obtenção do plasma sanguíneo, aliquotado e congelado em freezer a -80°C para posterior avaliação no mesmo laboratório em que foi realizada análise do fluido sulcular gengival

Aos tubos contendo 250 µl de plasma foram adicionados 36 µL de BHT (0,2% em etanol 95%) e 12.5 µl de 10N NaOH e incubados a 60 °C por 30 min com agitação (Vortemp[®]). A esta solução foi adicionado 1.5 mL de 7.2% ácido tricloracético (TCA) contendo 1% de iodeto de potássio (KI) e esta mistura foi colocada em gelo por 10 minutos e centrifugada (1.000 xg, 10 min). 1ml do sobrenadante foi transferido para um outro tubo com roscas, para evitar abertura durante incubação, foi adicionado a 500 µl de 0.6% TBA e a mistura foi incubada a 95 °C por 30 min. A fase n-butanólica foi extraída com 250µl de n-butanol e injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/PDA.

Processamento das amostras para análise imunológica

▪ Amostras de fluido sulcular gengival

Após 40 minutos da coleta das amostras do fluido sulcular gengival, à temperatura ambiente, as tiras foram removidas dos tubos e as amostras foram imediatamente centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e congelado em freezer a -80°C para posterior análise.

No fluido sulcular gengival foi avaliada a quantidade total de interleucina (IL)-6, IL-10 e TNF- α .

▪ Amostras de plasma sanguíneo

A amostra de sangue total foi centrifugada (3000g durante 10 minutos a 4°C) para obtenção do plasma sanguíneo, o qual foi congelado em freezer a -80°C para posterior análise.

No plasma sanguíneo foi mensurada a quantidade total de: (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13 e TNF- α .

Tendo em vista a grande quantidade de marcadores a serem avaliados, as amostras coletadas tanto de fluido sulcular gengival quanto de plasma sanguíneo foram processadas no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo utilizando-se a tecnologia Luminex^{***}. Esta metodologia utiliza dois lasers, sendo um específico para micropartícula (qualitativo) enquanto o outro determina a magnitude do sinal

^{***} Luminex Corporation (Austin, TX)

derivado da ficoeritrina (quantitativo). Todos os marcadores foram mensurados por kits comercialmente disponíveis^{†††} seguindo as orientações do fabricante.

Brevemente, micropartículas diluídas (50µL), padrão (50µL) e amostras do plasma ou fluido sem diluição (50µL) foram pipetadas nos poços e incubadas por duas horas. Após três lavagens, um coquetel de anticorpos biotinizados específicos (50µL) foi adicionado e incubado por uma hora à temperatura ambiente. Após outra lavagem, o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (50µL) foi adicionado, incubado por 30 minutos e as micropartículas foram resuspensas em tampão. A análise dos dados foi realizada com software Bio-Plex Manager^{®‡‡‡} utilizando o analisador Luminex.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no programa Excel[®] 2007 e foram submetidos à análise estatística descritiva e analítica pelo programa GraphPad Prism 5.0. A distribuição e normalidade dos dados foram avaliadas pelo teste de D'Agostino & Pearson. As características gerais de cada grupo foram descritas utilizando media e desvio padrão (DP) e as citocinas inflamatórias foram expressas como mediana e 25% / 75% quartil. As diferenças entre os grupos para dados paramétricos foram avaliadas pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni e os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Testes

^{†††} Bio-Plex system, Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, EUA)

^{‡‡‡} Bio-Rad laboratories (Hercules, Califórnia, EUA)

de correlação de Pearson foram utilizados para dados com distribuição normal e de Spearman para dados não-normais, para investigar a correlação entre as diferentes variáveis, ajustando para possíveis fatores de confundimento como idade, gênero e índice de massa corporal. Modelos de regressão logística e linear foram construídos para cada variável independente separadamente para avaliar a influência da peroxidação lipídica e do status do diabetes nos parâmetros de severidade da periodontite crônica e na expressão de citocinas inflamatórias locais e sistêmicas. Variáveis que estavam altamente correlacionadas com as variáveis dependentes e independentes, e consequentemente, como fatores de confundimento foram incluídas nos modelos para avaliar o peso de cada uma delas. As análises de correlação e de regressão foram realizadas no programa SPSS® IBM versão 19. O nível de significância estabelecido foi de 5%. A hipótese de nulidade foi rejeitada se $p \leq 0.05$.

Apêndice 2- RESULTADOS ADICIONAIS

1- AVALIAÇÃO PERIODONTAL

Tabela 1- Média (\pm Desvio-Padrão) dos Parâmetros Clínicos Periodontais

	GRUPO 1 n=30	GRUPO 2 n=30	GRUPO 3 n=30	GRUPO 4 n=30
Número de dentes*	22.3 (\pm 4.2)	21.6 (\pm 4.5)	23.2 (\pm 3.8)	24.3 (\pm 3.1)
IPV (% sítios)	76.5 (\pm 17.4) ^a	69.8 (\pm 13.0)	70.1 (\pm 15.7)	60.8 (\pm 17.4)
ISM (% sítios)	60.9 (\pm 15.2) ^{b,c,d}	46.9 (\pm 15.9)	40.4 (\pm 14.8)	41.3 (\pm 12.9)
SS (% sítios)	69.3 (\pm 12.8) ^{e,c,d}	53.9 (\pm 13.8)	53.0 (\pm 13.7)	51.4 (\pm 13.2)
PS (mm)	4.1 (\pm 0.5) ^{e,f,c}	3.7 (\pm 0.6)	3.4 (\pm 0.5)	3.7 (\pm 0.4)
PS \leq 3mm (% sítios)	43.3 (\pm 14.8) ^{c,g,h}	57.0 (\pm 15.0)	61.9 (\pm 14.0)	53.3 (\pm 12.5)
PS 4-5mm (% sítios)	31.9 (\pm 11.6) ^a	31.0 (\pm 11.0) ^a	31.0 (\pm 10.6) ^a	41.0 (\pm 10.0)
PS \geq 6mm (% sítios)	24.8 (\pm 15.9) ^{b,c,d}	12.0 (\pm 10.8) ⁱ	7.0 (\pm 10.6)	5.7 (\pm 5.9)
NI (mm)	4.4 (\pm 0.7) ^{e,c,d}	3.9 (\pm 0.7)	3.6 (\pm 0.5)	3.8 (\pm 0.4)
NI \leq 2mm (% sítios)	13.1 (\pm 8.8) ⁱ	16.5 (\pm 15.1)	24.8 (\pm 16.2) ^d	10.3 (\pm 10.0)
NI 3-4mm (% sítios)	39.8 (\pm 15.3) ^{j,d}	48.8 (\pm 14.2) ^d	51.6 (\pm 10.7)	61.3 (\pm 10.0) ⁱ
NI \geq 5mm % (% sítios)	47.1 (\pm 16.2) ^{e,c,d}	34.7 (\pm 17.6) ⁱ	23.8 (\pm 14.0)	28.4 (\pm 10.5)
Supuração (n° sítios)	6.8 (\pm 7.0) ^{e,c,d}	4.0 (\pm 3.3)	2.0 (\pm 3.0)	2.0 (\pm 3.7)

IPV: índice de placa visível; ISM: índice de sangramento marginal; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção.

* ns-diferença não significativa (Teste Kruskal Wallis; $\alpha=5\%$)^a $p<0.01$ em relação ao grupo 4; ^b $p<0.05$ em relação ao grupo 2; ^c $p<0.0001$ em relação ao grupo 3; ^d $p<0.0001$ em relação ao grupo 4; ^e $p<0.01$ em relação ao grupo 2; ^f $p<0.01$ em relação ao grupo 4; ^g $p<0.0001$ em relação ao grupo 2; ^h $p<0.05$ em relação ao grupo 4; ⁱ $p<0.05$ em relação ao grupo 3; ^j $p<0.01$ em relação ao grupo 3.

2- ANÁLISE DA LDL ELETRONEGATIVA (LDL-) OU MINIMAMENTE OXIDADA

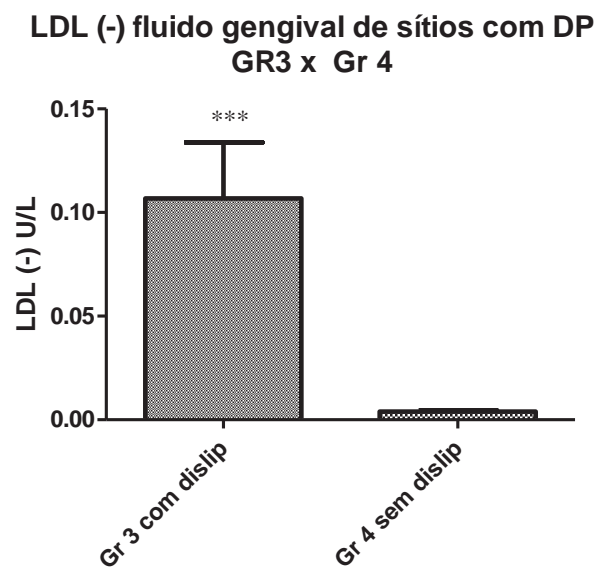
Os resultados da análise de LDL(-) ou minimamente oxidada, no plasma e fluido gengival estão apresentados abaixo (Tabela 01). Foi observado que o grupo com diabetes descompensado apresentou os menores valores quando comparado aos demais grupos tanto no plasma quanto no fluido gengival.

Tabela 1 Média \pm Desvio-Padrão dos níveis de LDL (-) no plasma e no fluido sulcular gengival

	GRUPO 1 n=30	GRUPO 2 n=30	GRUPO 3 n=30	GRUPO 4 n=30
Plasma (U/L)	1.69 (\pm 1.58)	1.99 (\pm 1.91)	2.23 (\pm 1.75)	3.46 (\pm 2.34)* ##
sítio saudável (U/L)	0.0006 (\pm 0.0005)	0.0007 (\pm 0.0017)	0.0006 (\pm 0.0005)	0.001 (\pm 0.0008)
sítio com doença periodontal (U/L)	0.001 (\pm 0.002)	0.001 (\pm 0.003)	0.048 (\pm 0.13)***	0.0042 (\pm 0.003)

*p<0.05 em relação ao grupo 1; ## p<0.01 em relação ao grupo 2 ***p<0.0001 em relação ao grupo 1,2,4 (Teste Kruskal Wallis; α =5%)

Considerando a análise de LDL eletronegativa, um achado relevante foi o fato de ser o primeiro estudo a detectar tal marcador no fluido sulcular gengival e que o grupo portador de dislipidemia (G3) apresentou valores maiores no fluido de sítios com periodontite crônica (DP) em comparação ao fluido de sítios com DP de pacientes sem dislipidemia (G4), podendo ser avaliado seu emprego como marcador de risco à periodontite crônica (Figura 4).



**
p<0.0001 em relação ao grupo 4 (Teste Mann-Whitney; $\alpha=5\%$)

Figura 1 – Gráfico representativo da expressão de LDL eletronegativa no fluido sulcular gengival de sítios com periodontite crônica para os grupos sem diabetes.

3- ANÁLISE IMUNOLÓGICA

CITOCINAS FLUIDO SULCULAR GENGIVAL

3.1- SÍTIOS SAUDÁVEIS

Tabela 1- Média (\pm Desvio-Padrão) dos níveis de marcadores inflamatórios (pg/ μ l) no fluido sulcular gengival de sítios saudáveis

Citocinas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
IL-1β	0.53 (\pm 0.4)***	0.34 (\pm 0.32)	0.25 (\pm 0.21)	0.15 (\pm 0.15)
IL-2	0.004 (\pm 0.014)	0.002 (\pm 0.005)	0.001 (\pm 0.003)	0.0003 (\pm 0.001)
IL-4	0.009 (\pm 0.012)*	0.006 (\pm 0.005)	0.005 (\pm 0.004)	0.004 (\pm 0.003)
IL-5	0.025 (\pm 0.05)	0.015 (\pm 0.02)	0.013 (\pm 0.012)	0.006 (\pm 0.008)
IL-6	0.063 (\pm 0.13)*	0.031 (\pm 0.056)	0.019 (\pm 0.019)	0.012 (\pm 0.016)
IL-7	0.016 (\pm 0.031)*	0.010 (\pm 0.009)	0.009 (\pm 0.01)	0.005 (\pm 0.004)
IL-8	1.63 (\pm 1.15)**	1.11 (\pm 0.94)	0.97 (\pm 0.63)	0.79 (\pm 0.56)
IL-10	0.02 (\pm 0.04)*	0.013 (\pm 0.024)	0.013 (\pm 0.015)	0.005 (\pm 0.007)
IL-12 (p70)	0.009 (\pm 0.016)	0.005 (\pm 0.005)	0.007 (\pm 0.006)	0.005 (\pm 0.004)
IL-13	0.02 (\pm 0.02)*** ##	0.020 (\pm 0.016) ^{¥¥}	0.018 (\pm 0.012)	0.013 (0.014)
GM-CSF	0.069 (\pm 0.07)	0.068 (\pm 0.094)	0.056 (\pm 0.048)	0.040 (\pm 0.035)
TNF-α	0.033 (\pm 0.099)*	0.007 (\pm 0.024)	0.003 (\pm 0.009)	0.0001 (\pm 0.001)

*** p< 0.0001 em relação ao grupo 4; ** p< 0.01 em relação ao grupo 4; * p< 0.05 em relação ao grupo 4; ## p< 0.01 em relação ao grupo 3 ^{¥¥} p< 0.0001 em relação ao grupo 3 e 4 (Teste Kruskal Wallis $\alpha=5\%$)

Em relação aos marcadores inflamatórios locais, avaliados no fluido sulcular gengival de sítios com periodontite crônica, os resultados estão descritos na tabela 02.

3.2 SÍTIOS COM PERIODONTITE CRÔNICA

Tabela 2- Média (\pm Desvio-Padrão) dos níveis de marcadores inflamatórios no fluido sulcular de sítios com periodontite crônica

Citocinas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
IL-1β	5.86 (\pm 2.77)	5.50 (\pm 3.59)	5.20 (\pm 3.24)	5.24 (\pm 1.75)
IL-2	0.072 (\pm 0.096)	0.067 (\pm 0.10)	0.062(\pm 0.08)	0.047 (\pm 0.062)
IL-4	0.075 (\pm 0.05)	0.070 (\pm 0.04)	0.073 (\pm 0.045)	0.070 (\pm 0.04)
IL-5	0.20 (\pm 0.22)	0.22 (\pm 0.19)	0.20 (\pm 0.17)	0.15 (\pm 0.13)
IL-6	1.09 (\pm 0.88) [*]	0.56 (\pm 0.52)	0.58 (\pm 0.52)	0.49 (\pm 0.38)
IL-7	0.14 (\pm 0.11)	0.14 (\pm 0.12)	0.12 (\pm 0.073)	0.13 (\pm 0.09)
IL-8	12.74 (\pm 6.18)	10.3 (\pm 5.75)	11.75 (\pm 6.38)	11.92 (\pm 3.66)
IL-10	0.31 (\pm 0.27) [*]	0.17 (\pm 0.19)	0.18 (\pm 0.18)	0.11 (\pm 0.09)
IL-12 (p70)	0.07 (\pm 0.06)	0.073 (\pm 0.06)	0.075 (\pm 0.06)	0.072 (\pm 0.05)
IL-13	0.18 (\pm 0.14)	0.23 (\pm 0.13)	0.23 (\pm 0.12)	0.21 (\pm 0.15)
GM-CSF	0.44 (\pm 0.53)	0.42 (\pm 0.41)	0.43 (\pm 0.41)	0.35 (\pm 0.50)
TNF-α	0.86 (\pm 0.91) [*]	0.52 (\pm 0.74)	0.49 (\pm 0.62)	0.19 (\pm 0.18)

^{*} p< 0.05 em relação ao grupo 4 (Teste Kruskal Wallis $\alpha=5\%$)

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

 Comitê de Ética em Pesquisa 

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**DIABETES MELLITUS E DOENÇA PERIODONTAL: ANÁLISE CLÍNICA, GENÉTICA, MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E BIOQUÍMICA**", sob o protocolo nº 50/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) **SILVANA REGINA PEREZ ORRICO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 04 (quatro) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**DIABETES MELLITUS AND PERIODONTAL DISEASE: CLINICAL, GENETICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS**", protocol number 50/06, under Dr **SILVANA REGINA PEREZ ORRICO**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 04 (four)-years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 23 de abril de 2007.

Prof^ª Dr^ª  **Mirian Aparecida Onofre**
Coordenadora

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Grupo com Diabetes mellitus

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____ (profissão) _____, portador do R.G. _____, residente à Rua/Av _____, na cidade de _____, Estado

de _____, concordo em participar da pesquisa intitulada “Diabetes Mellitus e Doença Periodontal: análise clínica, genética, microbiológica, imunológica e bioquímica” e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1- Fui informado que o objetivo desta pesquisa é estudar a associação do Diabetes Mellitus, com a presença de alterações nos meus dentes e gengiva que possam levar à doença de gengiva, comparando os achados em pacientes não portadores de diabetes e se minha carga genética (herdada dos pais) pode modificar o quadro de doença da gengiva. Para tanto, deverei responder a um questionário de saúde, ser submetido a exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva, exame radiográfico de todos os dentes, coleta de amostras de saliva, de fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) e de placa bacteriana (depósito de bactérias localizado abaixo da gengiva). Fui esclarecido que, se for necessário fazer alguma cirurgia para tratar meu problema de gengiva ou tiverem que retirar algum dente para o meu tratamento, serei convidado a doar uma pequeníssima porção de gengiva para o desenvolvimento da pesquisa acima citada. Ciente de que esta pequena porção de gengiva não fará falta para o meu restabelecimento e cicatrização do local, já que ela seria jogada fora. Além disso, autorizo a coleta de uma amostra de sangue para avaliação dos exames hemograma, glicemia de jejum (taxa de glicose presente no sangue), nível de insulina, colesterol e triglicérides. Fui informado que todo material coletado será utilizado apenas nesta pesquisa.

2- Fui informado, em relação à coleta da amostra de sangue, de que será realizada pelo Centro de Referência Diagnóstica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, utilizando material apropriado, estéril e descartável. Este Laboratório possui recursos e profissionais capacitados para oferecer assistência integral para minimizar riscos diante de possíveis reações adversas que, embora raras, possam vir a ocorrer durante a coleta, tais como: hematoma, náuseas, vômitos, hipoglicemia, desmaio e convulsão. Entretanto, fui informado de que os riscos serão minimizados com a realização da coleta de sangue por um profissional devidamente treinado e habilitado para realizar o procedimento e que terei assistência integral em caso de ocorrência dos danos previstos.

3- Fui informado que o estudo proporcionará uma avaliação criteriosa clínica e radiográfica da minha condição bucal, com maior destaque aos tecidos gengivais e às lesões de mucosa e serei encaminhado para tratamento gengival adequado, o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário, e que consistirá de limpeza dos dentes para remoção de tártaro e placa bacteriana e instruções de higiene bucal. Além disso, através do exame de sangue terei oportunidade de receber uma avaliação atual e completa que incluirá tanto exames laboratoriais de rotina

quanto exames mais complexos, os quais por esta razão são esporadicamente solicitados pelos médicos. Assim, será dada ao paciente e ao médico a oportunidade de conhecer a real condição sistêmica do indivíduo e caso necessite de tratamento, será orientado e encaminhado ao médico.

4- Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos aos quais serei submetido estão relacionados à utilização de anestésicos locais de rotina no atendimento odontológico. Complicações relacionadas ao uso de anestésicos serão evitadas pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anestésico ou alterações na pressão arterial. Caso seja informada alguma alteração, serei encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver autorização do profissional. Quanto à realização de radiografias e os riscos de exposição à radiação, usarei avental e colar de chumbo como medida de proteção, o exame será realizado dentro da quantidade de radiação permitida e por técnico capacitado, o que evitará as tomadas repetidas e desnecessárias.

5- Como existem riscos particulares para o grupo portador de Diabetes mellitus tipo 2, somente poderei participar da pesquisa com autorização por escrito do médico endocrinologista responsável pelo meu tratamento. Além disso, caso necessite tomar antibiótico para realização dos exames clínicos, não poderei ser incluído na pesquisa. Continuarei sob acompanhamento com o meu endocrinologista e este estará ciente que receberei tratamento periodontal. Se houver complicações metabólicas decorrente do Diabetes e meu médico julgar importante a minha exclusão da pesquisa, serei imediatamente excluído da mesma.

6- Torno ciente que recebi todas as informações sobre a minha participação nesta pesquisa e receberei novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da mesma. Fui esclarecido que não terei gastos extras, a não ser o deslocamento, e que meu consentimento não tira a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa.

7- Estou ciente que minha participação é voluntária e tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

8 - Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia de que a minha identidade não será divulgada, assegurando a minha privacidade.

Caso haja qualquer problema ou dúvida durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, pelo telefone Profa. Dra. Silvana, (16) 3301-6377 e que posso consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (16) 3301-6432/6434.

Desta forma, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino.

Araraquara, ____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Grupo sem Diabetes mellitus

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome)

_____,(nacionalidade)_____(profissão)_____
_____, portador do R.G. _____, residente à
Rua/Av _____, na cidade de _____,

Estado de __, concordo em participar da pesquisa intitulada “Diabetes Mellitus e Doença Periodontal: análise clínica, genética, microbiológica, imunológica e bioquímica” e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1- Fui informado que o objetivo desta pesquisa é estudar a associação do Diabetes Mellitus, com a presença de alterações nos dentes e gengiva que possam levar à doença de gengiva, comparando os achados em pacientes sem diabetes e que apresentam doença de gengiva e se minha carga genética (herdada dos pais) pode modificar o quadro de doença da gengiva. Para tanto, deverei responder a um questionário de saúde, ser submetido a exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva, exame radiográfico de todos os dentes, coleta de amostras de saliva, de fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) e de placa bacteriana (depósito de bactérias localizado abaixo da gengiva). Fui esclarecido que, se for necessário fazer alguma cirurgia para tratar meu problema de gengiva ou tiverem que retirar algum dente para o meu tratamento, serei convidado a doar uma pequeníssima porção de gengiva para o desenvolvimento da pesquisa acima citada. Ciente de que esta pequena porção de gengiva não fará falta para o meu restabelecimento e cicatrização do local, já que ela seria jogada fora. Além disso, autorizo a coleta de amostra de sangue para avaliação dos exames hemograma, glicemia de jejum (taxa de glicose presente no sangue), nível de insulina, colesterol e triglicérides.

2- Fui informado que todo material coletado será utilizado apenas nesta pesquisa.

3- Em relação à coleta da amostra de sangue, estou ciente de que será realizada no Centro de Referência Diagnóstica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, utilizando material apropriado, estéril e descartável. Este Laboratório possui recursos e profissionais capacitados para oferecer assistência integral diante de possíveis reações adversas que, embora raras, possam vir a ocorrer durante a coleta, tais como: hematoma, náuseas, vômitos, hipoglicemia, desmaio e convulsão. Entretanto, fui informado de que os riscos serão minimizados com a realização da coleta de sangue por um profissional devidamente treinado e habilitado para realizar o procedimento e que terei assistência integral em caso de ocorrência dos danos previstos.

4- Fui informado também, que o estudo proporcionará uma avaliação criteriosa clínica e radiográfica da minha condição bucal, com maior destaque aos tecidos gengivais e às lesões de mucosa e serei encaminhado para tratamento gengival adequado, o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário,

e que consistirá de limpeza dos dentes para remoção de tártaro e placa bacteriana e instruções de higiene bucal. Além disso, através do exame de sangue terei oportunidade de receber uma avaliação atual e completa que incluirá tanto exames laboratoriais de rotina quanto exames mais complexos, os quais por esta razão são esporadicamente solicitados pelos médicos. Assim, será dada ao paciente e ao médico a oportunidade de conhecer a real condição sistêmica do indivíduo e caso necessite de tratamento, será orientado e encaminhado ao médico.

5- Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos aos quais serei submetido estão relacionados à utilização de anestésicos locais de rotina no atendimento odontológico. Complicações relacionadas ao uso de anestésicos serão evitadas pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anestésico ou alterações na pressão arterial. Caso seja informada alguma alteração, serei encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver autorização do profissional. Quanto à realização de radiografias e os riscos de exposição à radiação, usarei avental e colar de chumbo como medida de proteção, o exame será realizado dentro da quantidade de radiação permitida e por técnico capacitado, o que evitará as tomadas repetidas e desnecessárias.

6- Torno ciente que recebi todas as informações sobre a minha participação nesta pesquisa e receberei novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da mesma. Fui esclarecido que não terei gastos extras, a não ser o deslocamento, e que meu consentimento não tira a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa.

7-Estou ciente que minha participação é voluntária e tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

8- Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia de que a minha identidade não será divulgada, assegurando a minha privacidade.

Caso haja qualquer problema ou dúvida durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar o pesquisador responsável, Profa. Dra. Silvana, pelo telefone: (16) 3301-6377 e que posso consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (16) 3301-6432/6434.

Desta forma, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino.

Araraquara, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente
Responsável

Assinatura da Pesquisador

ANEXO C
(Documentos comprobatórios)



Submissions with an Editorial Office Decision for Author Silvana Regina Perez Orrico, DDS, MSc, PhD, Professor

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
Action Links	ABIO-11-1097	Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method	Oct 19, 2011	Jan 19, 2012	Completed	Jan 19, 2012	Accept

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.



The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

Lipid Peroxidation is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JC-11-3397
Full Title:	Lipid Peroxidation is Associated with the Severity of Periodontal Disease and Local Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes
Short Title:	Lipid peroxidation in patients with diabetes and periodontitis
Article Type:	Original Article
Keywords:	Lipid peroxidation; diabetes mellitus type 2; periodontal diseases; cytokines.
Corresponding Author:	Silvana Regina Orrico, PhD, Professor State University of São Paulo (UNESP) Araraquara, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	State University of São Paulo (UNESP)
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Alliny Souza Bastos, PhD student
First Author Secondary Information:	
All Authors:	Alliny Souza Bastos, PhD student Dana Thomas Graves, PhD, Professor Ana Paula de Melo Loureiro, PhD, Professor Carlos Rossa Júnior, PhD, Professor Dulcinéia Saes Parra Abdalla, PhD, Professor Tanize do Espírito Santo Faulin, PhD Niels Olsen Câmara, PhD, Professor Oelisoa Mireille Andriankaja, PhD Silvana Regina Orrico, PhD, Professor
All Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Context: Periodontitis is the most common lytic disease of bone and is recognized as a common complication of diabetes. Lipid peroxidation (LPO) is increased in diabetes and may be related to modulation of the inflammatory response. LPO levels in patients with diabetes (DM) and periodontal disease have not been evaluated.</p> <p>Objective: The aim of this study was to evaluate the association of LPO with periodontal status and to establish a potential mechanism by assessing inflammatory cytokines in type 2 diabetic and non-diabetic patients.</p> <p>Design and Setting: This is a cross-sectional study of 18 months' duration involving Brazilian patients recruited at the State University of São Paulo.</p> <p>Patients: The sample was comprised of 120 patients divided into four groups based upon diabetic and dyslipidemic status: poorly controlled diabetics with dyslipidemia, well-controlled diabetics with dyslipidemia, normoglycemic individuals with dyslipidemia, and healthy individuals.</p> <p>Main Outcome Measure(s): Blood analyses were carried out for fasting plasma glucose, HbA1c, and lipid profile. Periodontal examinations were performed, and gingival crevicular fluid was collected. LPO levels were evaluated by measuring oxLDL (ELISA) and malondialdehyde (MDA, HPLC). Cytokines were evaluated by the multiplex bead technique.</p>

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

Araraquara, 12 de março de 2012.

ALLINY DE SOUZA BASTOS