



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Relação do potencial mutagênico, doença periodontal e perfil glicêmico

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Karen Basilia Rivera Poquechoque

Relação do potencial mutagênico, doença periodontal e perfil glicêmico

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Odontologia de Araraquara, do
Programa de Odontologia, na Área de
Periodontia.

**Orientador: Profa. Dra. Ticiane Sidorenko
de Oliveira Capote**

**Coorientadora: Profa. Dra. Raquel
Mantuanelli Scarel-Caminaga**

Araraquara

2020

Poquechoque, Karen Basilia Rivera

Relação do potencial mutagênico, doença periodontal e perfil glicêmico / Karen Basilia Rivera Poquechoque.- Araraquara: [s.n.], 2020

57 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote

Coorientador.: Profa. Dra. Raquel Mantuanelli Scarel-Caminaga

1. Doenças periodontais 2. Diabetes Mellitus
3. Mutagênese I. Título

Karen Basilia Rivera Poquechoque

Relação do potencial mutagênico, doença periodontal e perfil glicêmico

Comissão julgadora

Exame de Qualificação de Mestrado

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote

1º Examinador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

2º Examinador: Profa. Dra. Rosemay Adriana Chiérizi Mancantonio

Araraquara, 23 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Karen Basília Rivera Poquechoque

NASCIMENTO 05 de Setembro de 1993 – Rio de Janeiro – RJ

FILIAÇÃO Mary Vicitacion Rivera Rendon de Poquechoque
 Freddy Poquechoque Morales

2012/2015 Curso de Graduação em Odontologia no Centro Universitário de Araraquara - UNIARA.

2018/2020 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico esta dissertação, aos meus pais, Freddy e Mary, que são minha base, me repassaram todos seus valores e ideais, me apoiaram e deram força nessa etapa.

Às minhas irmãs, Marizol e Carolina, que sempre estão comigo me protegendo desde pequena, me aconselhando em vários momentos, e desejando o sucesso na vida. Aos meus cunhados, Rodrigo e Renato, que estão sempre apoiando minhas irmãs e proporcionaram momentos agradáveis e felizes. E para minhas sobrinhas, a Alanna e a Alexia, as quais dão energia e alegria para nossa família.

Minha sincera dedicação e agradecimento por estarem comigo em mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por resguardar toda minha família a seus cuidados, por nos proteger e por seu amor incondicional.

Ao Arcanjo São Miguel, guardião e anjo protetor da minha família.

À minha orientadora Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote, agradeço por passar seus ensinamentos, sendo sempre muito atenciosa e paciente comigo. Aprendi muito tanto no profissional como também na sua essência pessoal, como ter mais empatia com as pessoas ao redor. Sou imensamente grata por todo esforço que você fez para que este trabalho fosse concluído.

À equipe do laboratório de Genética Molecular, que tive a honra de fazer parte: Diego, Ingra, Marco e, principalmente, Thamiris, que me passou todo seu conhecimento e sempre estava disposta a ajudar, e que através do seu projeto de pesquisa (financiado pela FAPESP – nº 2016/08070-6) contribuiu para realização da minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcell Medeiros, pelos ensinamentos e treinamento transmitidos no início das atividades da pesquisa.

A todos os professores da pós-graduação em Odontologia da FOAr/UNESP pelos seus ensinamentos e incentivarem a todos os alunos a serem excelentes mestres.

À Profa. Dra. Raquel M. Scarel-Caminaga por ter me acolhido, me dado a oportunidade de participar desta experiência na minha vida e ter me ensinado sobre a área que trabalhei, me ajudando a expandir meus conhecimentos.

À Profa. Dra. Silvana R. Perrez Orrico por toda colaboração, auxílio, disponibilidade e esclarecimentos passados para melhor compreensão da minha pesquisa, me repassando todo seu conhecimento científico e profissional.

Aos Prof. Dr. Fabio Renato Manzolli Leite e Prof. Dr. Gustavo Giacomelli Nascimento, da Universidade de Aarhus (Dinamarca), pela colaboração e enriquecimento da pesquisa.

Aos meus amigos de mestrado por proporcionarem momentos felizes e agradáveis. Mesmo sendo uma turma heterogênea, estávamos sempre unidos e sendo companheiros com todos. Especialmente, Dania, Flávia, Lorena e Renata, que levarei comigo a amizade, agradeço a compreensão e carinho que criamos neste período.

Ao Departamento de Morfologia e Clínica Infantil: Margarete Bueno de Moraes, Marcelo Brito Conte, Prof. Dra. Marcela de Almeida Gonçalves, por sempre estarem dispostos a ajudar e por um convívio diário agradável.

A todos funcionários da FOAr: a equipe da limpeza, porteiros, equipe da seção de pós-graduação, equipe de laboratório da Periodontia, equipe de recepção aos pacientes, pelo convívio diário na faculdade e que sempre estiveram à disposição para nos ajudar.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas – “Centro de referência diagnóstica” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, que foram atenciosos e muito colaboradores durante o processo de coleta dos exames bioquímicos.

Ao programa de pós-graduação em Odontologia em nome do Prof. Dr. Joni Cirelli, coordenador do programa, pela oportunidade de realização do mestrado e contribuição na minha vida profissional.

A todos os pacientes que participaram da pesquisa, foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - Unesp, na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e de seu Vice-Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, por proporcionarem uma estrutura de qualidade e ensino de excelência.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/03753-8, 2016/08070-6) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

*"Don't only practice your art, but force your way into its secrets,
for it and knowledge can raise men to the Divine"*

Ludwig van Beethoven (1770-1827)

Poquechoque KBR. Relação do potencial mutagênico, doença periodontal e perfil glicêmico. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma desordem imunoinflamatória, disbiótica, multifatorial e com suscetibilidade genética. Estudos demonstraram a associação entre periodontite e diabetes mellitus (DM). Considerando que tanto o DM como a DP estão associadas a um estado de inflamação crônica e a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, elas podem estar relacionadas à produção de danos no DNA. Portanto, o objetivo deste projeto foi investigar a relação da periodontite crônica com perfil glicêmico e danos no DNA. Foram realizados exames bioquímicos (Hemoglobina glicada - HbA1c; Glicemia jejum; Insulina; Colesterol total; Triglicérides) e periodontais, avaliação de indicadores antropométricos de obesidade (IMC e relação quadril/cintura), e avaliação do dano ao DNA pelo ensaio de micronúcleo pelo bloqueio da citocinese (CBMN) em linfócitos, observando a frequência de células binucleadas com micronúcleo (FBMN) e a frequência de micronúcleo (FMN). Os pacientes foram divididos conforme seus níveis glicêmicos e seu perfil periodontal em três grupos: grupo A, n=37, sem periodontite e sem DM tipo 2 - DM2; grupo B, n=47, com periodontite, sem DM2; grupo C, n=19, com periodontite e com DM2. Regressão multivariada de Poisson foi realizada utilizando a FBMN ou a FMN como variáveis dependentes. Os valores foram estimados em razão de taxa com seus respectivos intervalos de confiança definidos em 95% (IC 95%). Os parâmetros periodontais dos pacientes diabéticos e com periodontite estavam significativamente alterados em relação aos grupos controle e grupo com periodontite, além de apresentarem valores significativamente maiores para triglicérides, índice HOMA e hemoglobina glicada. Não foram observadas diferenças quanto ao IMC e a relação quadril/cintura. O potencial mutagênico não aumentou de acordo com a idade, colesterol total e triglicérides. A presença de periodontite, o diagnóstico de DM e o índice HOMA elevado contribuiu para o aumento de FBMN e FMN, porém quando avaliado a interação entre periodontite e diabetes, e periodontite e HOMA elevado, houve uma diminuição de FBMN e FMN. Pôde-se concluir que a periodontite e o DM isoladamente levaram ao aumento do potencial mutagênico.

Palavras-chave: Doença periodontal. Diabetes Mellitus. Mutagênese

Poquechoque KBR. Relation of mutagenic potential, periodontal disease and glycemic. [master's degree dissertation]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is an immunoinflammatory, dysbiotic, multifactorial disorder with genetic susceptibility. Studies demonstrated the association between periodontitis and diabetes mellitus (DM). Considering that both DM and PD are associated with chronic inflammation and an increased production of reactive oxygen species, they may be related to the production of DNA damage. Therefore, the aim of this study was to verify the relation between chronic periodontitis, glycemic profile and DNA damage. Biochemical tests (glycated hemoglobin - HbA1c; fasting glycemia; insulin; total cholesterol; triglycerides) and periodontal examination, evaluation of anthropometric indicators of obesity (BMI and waist/hip ratio - WHR), and DNA damage evaluation by cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in lymphocytes, observing the frequency of binucleated cells with micronucleus (FBMN), and frequency of micronucleus (FMN). The patients were divided according to their glycemic levels and periodontal profile into three groups (group A, n = 37, without periodontitis and without type 2 DM - DM2; group B, n = 47, with periodontitis, without DM2; group C, n = 19, with periodontitis and DM2). Poisson Multivariate Regression was performed using FBMN or FMN as dependent variables. The values were estimated as rate ratio (RR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI). Poor periodontal parameters were observed in diabetic and periodontitis patients compared to the control group and periodontitis group, besides presenting significantly higher values for triglycerides, HOMA index and glycated hemoglobin. There were no differences in BMI and hip/waist ratio. The mutagenic potential did not increase according to age, total cholesterol and triglycerides. The presence of periodontitis, the diagnosis of DM and the high HOMA index contributes to an increase in FBMN and FMN, however when the interaction between periodontitis and diabetes, and periodontitis and high HOMA index was evaluated, there was a reduction in FBMN and FMN. It was concluded that isolated periodontitis and DM increased the mutagenic potential.

Keywords: Periodontal disease. Diabetes Mellitus. Mutagenesis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	22
3 PUBLICAÇÃO	23
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A (Materiais e métodos)	53

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma desordem imunoinflamatória complexa de natureza multifatorial ¹. O estágio inicial da DP é a gengivite e tem como principal característica a inflamação do tecido gengival ². A inflamação ocorre nos tecidos gengivais devido à presença do biofilme bacteriano aderente às superfícies dentárias ². O tratamento à gengivite pode ser prevenida por meio de higiene oral regular que inclui escovação e uso de fio dental ^{3,4}. Assim, na ausência de tratamento, a progressão da doença pode levar à destruição do tecido gengival e das estruturas que compõem o periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), ocorrendo perda de inserção periodontal, associada ao sangramento à sondagem e à reabsorção do osso alveolar, tornando-se evidente radiograficamente ⁵, diagnosticando-se assim, a periodontite ⁵⁻⁷. Os estudos demonstram que a periodontite é a consequência da gengivite ^{3,4}.

A DP é formada por um grupo bacteriano específico ², sendo o fator etiológico primário da DP os micro-organismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ^{8,9}. Sabe-se, porém, que somente essas bactérias são insuficientes para que a doença seja gerada, sendo que a resposta do hospedeiro contribui, principalmente, no dano tecidual na DP e não pela ação bacteriana direta e de seus produtos ⁹⁻¹¹. A cascata inflamatória tem como função primordial proteger o organismo contra agentes estranhos, entretanto, quando a resposta imune é incapaz de eliminar esses microrganismos, os mediadores inflamatórios prevalecem nos tecidos gengivais podendo levar a danos, como a consequência da formação de bolsa periodontal, perda de tecido conjuntivo, destruição do ligamento periodontal e reabsorção de osso alveolar, podendo resultar na perda dentária ¹².

Estudos apontam que diversos fatores, tais como doenças sistêmicas, fatores ambientais (tabagismo) e herança genética, estão relacionados com o início e progressão da DP do hospedeiro ^{1,10,13}.

A relação entre DP e as doenças sistêmicas tem sido extensamente examinada durante muito tempo. Na classificação de doenças periodontais, a Academia Americana de Periodontia e a Federação Europeia de Periodontia

(2018)⁶ incluem a periodontite como manifestação de doenças sistêmicas. A associação da periodontite ao diabetes pode ser reconhecida como a sexta maior complicação ¹⁴⁻¹⁶, sendo que foi detectada maior extensão e severidade da doença periodontal em indivíduos portadores de diabetes do que naqueles não portadores da doença ^{6,13}.

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica que envolve primariamente os carboidratos, seguido dos lipídeos e proteínas, sendo caracterizado pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou ambos. Como resultado direto da hiperglicemia e do desequilíbrio osmótico, as características clínicas dos sintomas são desenvolvidas, poliúria, polidipsia, perda de peso e algumas vezes polifagia, e visão embaçada ¹⁷. O desenvolvimento do DM tem relação a fatores de risco ambientais, genéticos e comportamentais ¹⁸. Estima-se que atualmente aproximadamente 463 milhões de pessoas em todo o mundo apresentem diabetes, e esse número deve aumentar para 700 milhões em 2045 ^{18,19}.

Atualmente, os tipos mais comuns de DM são tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). Esses dois tipos de diabetes possuem etiopatogenias diferentes. O DM1 está relacionado à destruição autoimune das células beta do pâncreas, levando a uma deficiência absoluta de insulina. Normalmente, o diabetes tipo 1 é diagnosticado em crianças e adolescentes. Já o DM2, apresenta graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina ^{13,14,19,20}. O diabetes mellitus tipo 1 representa 5% a 10% dos casos diagnosticados; já o diabetes mellitus tipo 2 é o tipo mais comum, constituindo cerca de 90% de todos os casos de diabetes mellitus ^{14,17}.

1.1 Relação doença periodontal e diabetes mellitus

A DP e o DM são doenças crônicas muito prevalentes e complexas ¹⁶. Indivíduos com DM2 apresentam duas vezes o risco de desenvolver periodontite em comparação com não diabéticos ²¹. Segundo Baeza et al. (2020)²¹, quase todos os pacientes com DM2 apresentam periodontite simultaneamente. Há interações entre as duas doenças que têm implicações clínicas importantes para profissionais de odontologia, médicos e, principalmente pacientes ¹⁶.

Os fatores de risco para ambas doenças incluem idade elevada, sexo masculino, baixo nível socioeconômico, predisposição genética, principalmente relacionado a respostas imunológicas deficientes, tabagismo, obesidade, baixa atividade física e dieta não saudável ¹⁸.

Há uma relação bidirecional entre diabetes mellitus e periodontite ^{16,18,21-23}. O diabetes, particularmente se o controle glicêmico é deficiente, está associado a um aumento da prevalência e gravidade da periodontite e a periodontite severa está associada ao controle glicêmico comprometido ¹⁶.

O mecanismo específico que associa DM e DP ainda não foi totalmente elucidado.

Estudos confirmaram uma associação significativa entre hiperglicemia crônica e uma alta prevalência de periodontite. Embora essa evidência se concentre particularmente nos efeitos do DM2, o efeito parece ser semelhante, embora menos investigado no DM1 ²⁴⁻²⁶. No início da doença, muitos pacientes com DM2 apresentam pouca sintomatologia geral devido à hiperglicemia aparecer gradualmente, permanecendo sem diagnóstico por um longo tempo ¹⁰. O controle glicêmico parece ser particularmente importante no desenvolvimento e severidade da periodontite. No entanto, há indicações de que outros distúrbios metabólicos também desempenham um papel, como a dislipidemia, a resistência à insulina e, especialmente, a disfunção imunológica ²⁷.

O DM provoca uma resposta hiperinflamatória em resposta aos microrganismos presentes no periodonto e prejudica os processos reparadores, levando à exacerbação da alteração periodontal. A desregulação metabólica no diabetes como resultado da exposição prolongada à hiperglicemia crônica pode levar à glicação de proteínas e lipídios (AGEs) e pelo receptor para AGEs (RAGES) ^{21,22,28}. Os AGEs são produzidos fisiologicamente pelo organismo, mas em condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo aumentado, sua presença é amplamente aumentada ^{2,28}. O DM prejudica os processos reparadores pela ativação de RAGE e citocinas inflamatórias, que exacerbam a destruição periodontal por microrganismos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*. Por outro lado, a periodontite promove um estado inflamatório sistêmico e exacerba a resistência à insulina e o controle glicêmico ^{22,28}. A infecção periodontal pode causar inflamação sistêmica por bacteremia contínua de baixo grau ou por liberação de citocinas pró-inflamatórias na corrente

sanguínea produzidas na gengiva. Por sua vez, AGEs são produzidos, o que contribui para o aparecimento de diabetes por meio de aumento da desregulação do controle metabólico ^{18,28}. Assim, acaba existindo uma via de mão dupla e a relação bidirecional entre DM e DP.

A destruição local do tecido periodontal pode ser uma consequência de uma resposta inflamatória monocítica exagerada induzida pelo acúmulo de AGEs e resultar em secreção exagerada de mediadores locais e sistêmicos, levando à periodontite severa. A ligação dos AGEs aos receptores de monócitos induz a produção de interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de crescimento semelhante à insulina-1, proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento derivado de plaquetas ^{21,23,28}. Além disso, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse oxidativo e interações entre AGEs nos tecidos periodontais e seus receptores (RAGES) contribuem para o aumento da inflamação nos tecidos periodontais em pessoas com diabetes ^{16,28}.

1.2 Estresse oxidativo e periodontite

A periodontite severa também está associada à dislipidemia e elevações nos marcadores de estresse oxidativo em indivíduos com DM2 ²³.

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção excessiva de algumas espécies de moléculas altamente reativas e o mecanismo de defesa antioxidante ²⁹⁻³¹, significativamente implicado na patogênese de doenças degenerativas e inflamatórias crônicas, como a DP crônica e DM ³¹. As espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres de oxigênio são produtos do metabolismo celular normal, no entanto, seus níveis aumentados desequilibrados interrompem a função celular normal ²⁹.

Os radicais livres, apesar de desempenharem funções fisiológicas, têm sido associados à patogênese de diversas desordens ³². Sabe-se que em sítios de inflamação crônica ocorre uma produção anormal de espécies reativas de oxigênio (EROs) ³³ e que tais compostos passam a contribuir para a injúria inflamatória dos tecidos do hospedeiro, deixando de exercer uma função meramente fisiológica ³⁴.

Apesar de haver outros processos envolvidos, o excesso de glicose é o principal responsável pela grande produção de radicais livres em pacientes

diabéticos. Além disso, pacientes com DM2 apresentam uma defesa antioxidante deficiente em relação a indivíduos normais ^{35,36}.

O aumento na produção de ERO também tem sido atribuído à glicação de proteínas ^{37,38} e/ou a uma auto-oxidação da glicose durante o processo de hiperglicemia ³⁹. Portanto, além dos AGEs, o estresse oxidativo passa a apresentar um papel importante tanto na patogênese como nas complicações do diabetes ⁴⁰. A hiperglicemia pode acarretar a glicação de enzimas antioxidantes, causando sua inativação ⁴¹.

As EROs causam danos aos tecidos por meio de múltiplos mecanismos, incluindo danos ao DNA, danos à peroxidação lipídica e oxidação enzimática. A peroxidação lipídica destrói os lipídios da membrana celular e inicia uma via de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, sintetizando o malondialdeído (MDA), mantendo as reações em cadeia ³⁰. A peroxidação lipídica apresenta um importante papel no envelhecimento, na aterosclerose ³³, no desenvolvimento de complicações do diabetes como alterações micro e macrovasculares ^{42,43}, na artrite reumatóide ⁴⁴, na doença pulmonar obstrutiva crônica ⁴⁵, na AIDS ⁴⁶ e ainda na doença periodontal ⁴⁷⁻⁵⁰.

O MDA, que pode indicar o nível de estresse oxidativo, é o produto primário e mais estável da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados ³⁰. Foi observado um nível de MDA acentuadamente aumentado tanto em saliva como no fluido gengival crevicular de pacientes com DP, sendo demonstrado que quanto mais severa a inflamação periodontal, maior produção de MDA ³⁰. Indivíduos diabéticos têm níveis mais altos de MDA em seus tecidos periodontais, sugerindo um aumento da peroxidação lipídica no caso de DM ²⁹. Os níveis de MDA correlacionaram-se positivamente com a profundidade da bolsa em todos os pacientes com periodontite avaliados por Patil et al. (2016) ⁵¹.

As EROs provocam destruição tecidual periodontal ou pela degradação da substância fundamental ou pela liberação de collagenases ou pela liberação de vários mediadores inflamatórios ⁵¹.

Segundo D'Aiuto et al. (2010) ⁵², a periodontite está associada a um estado sistêmico de estresse oxidativo e à capacidade antioxidante global reduzida. A gravidade da destruição do tecido devido à ERO excessiva é maior

quando a DP está associada ao DM2, indicando que o estresse oxidativo é um fator comum envolvido na destruição do tecido ⁵¹

Masi et al. (2018) ⁵³ verificaram que uma produção reduzida de EROs mitocondriais de células imunoinflamatórias está associada a uma função endotelial melhorada em pacientes com DM2 e DP. Além disso, uma produção mais adequada de EROs mitocondriais é acompanhada por uma melhoria significativa do controle metabólico.

Sob condições fisiológicas normais, há um equilíbrio entre EROs e antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre apenas quando o sistema de defesa antioxidante não pode neutralizar a produção elevada de ERO. Os antioxidantes podem ser classificados em duas categorias com base em seu modo de função. A primeira categoria compreende antioxidantes preventivos, incluindo antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase e enzimas de reparo do DNA, bem como alguns sequestradores de íons metálicos, como a albumina. A segunda categoria compreende antioxidantes eliminadores ou antioxidantes de quebra de cadeia, como ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides (incluindo retinol-vitamina A), ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E), glutathione reduzida e polifenóis ⁵⁴.

Assim, além da produção excessiva de ERO, o paciente pode apresentar uma diminuição de antioxidantes para combater os radicais livres. Chen et al. (2019) ³⁰ verificaram um nível mais baixo da capacidade antioxidante total (CAT) em pacientes com DP, comparado a pacientes sem DP. Isso sugeriu que a progressão da periodontite prejudica o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, reduzindo a capacidade dos antioxidantes em regular o estresse oxidativo.

A periodontite pode influenciar a ação local e sistêmica de antioxidantes, podendo acarretar uma diminuição de antioxidantes enzimáticos, como SOD e catalase, e aumento da ação de antioxidantes enzimáticos entre pessoas com periodontite como reação protetora. Os resultados para antioxidantes não enzimáticos e catalase são consistentes e indicam capacidade antioxidante comprometida em pacientes com periodontite ⁵⁴. Vincent et al. (2019) ³¹ avaliaram a capacidade antioxidante total (CAT) e o estado oxidante total (EOT) no fluido gengival crevicular em paciente com DP e DM2.

Os autores verificaram que a CAT foi significativamente menor nos participantes com DP, DM e com ambas as condições da doença quando comparado ao grupo controle. Mostraram um evidente desequilíbrio entre o EOT e a atividade antioxidante, com a inclinação a favor de oxidantes elevados, provavelmente relacionados ao aumento do estresse oxidativo implicado nos dois processos da doença. Além disso, dos grupos estudados, o grupo de paciente com DP e DM foi o que apresentou menor valor de CAT. Isso pode ser atribuído à hiperglicemia, a principal causa de inflamação em diabéticos, e acredita-se também que aumenta a inflamação nos tecidos periodontais. Níveis excessivos de glicose induzem a produção de radicais livres e aumentam o estresse oxidativo. Esses mecanismos patológicos no diabetes, juntamente com a doença periodontal preexistente, podem ser responsáveis pela destruição periodontal exacerbada observada em diabéticos e também podem explicar o maior risco de periodontite em diabéticos. Assim, a coexistência de ambas as condições da doença reduziu ainda mais a capacidade antioxidante ³¹.

Uma diminuição da capacidade antioxidante (catalase, vitamina C, SOD) foi observada em indivíduos diabéticos e com periodontite de forma altamente significativa. Houve uma forte correlação positiva entre a produção excessiva de EROs e a profundidade da bolsa periodontal em indivíduos diabéticos com periodontite diabética, além desse grupo apresentar uma diminuição significativa da CAT e atividade da SOD ⁵¹.

Pode-se concluir que a gravidade da destruição do tecido devido à ERO excessiva é maior quando a doença periodontal está associada ao DM tipo 2, indicando que o estresse oxidativo é um fator comum envolvido na destruição do tecido ⁵¹.

1.3 Danos do DNA relacionados à DP e DM

Danos oxidativos ao material genético podem causar quebras na fita de DNA e micronúcleos (MN), e esses tipos de danos podem ter efeitos teratogênicos ou consequências cancerígenas ⁵⁵.

O teste do micronúcleo é considerado um dos métodos preferidos para avaliar o dano cromossômico, porque permite uma avaliação confiável de quebras e perdas cromossômicas.

Micronúcleos são pequenos núcleos adicionais formados a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que aparecem durante a divisão celular mitótica no citoplasma das células em intérfase ⁵⁶. Devido à confiabilidade do ensaio CBMN e sua boa reprodutibilidade, tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos ⁵⁷.

Na literatura, encontram-se estudos que avaliaram o dano ao DNA, utilizando teste do micronúcleo em diabéticos ^{55,58-65}, em pacientes com periodontite ⁶⁶⁻⁶⁹, e os que avaliaram ambas as patologias ^{70,71}.

O DM2 tem sido associado a níveis elevados de danos ao DNA, aumento da suscetibilidade a mutações e diminuição da eficácia do reparo do DNA ^{36,58,59,61,65}. Maior dano ao DNA nos diabéticos estão relacionados à hiperglicemia que acarreta no aumento do estresse oxidativo e da ERO ^{59,62,72}.

Maior frequência de micronúcleos foram observadas em pacientes com DM2 comparado a pacientes saudáveis ^{59-62,64,65}. Entretanto, Silva et al., (2013) ⁶³ demonstraram que a glicemia e a HbA1c não estavam significativamente correlacionados com o aumento de frequência de micronúcleos.

Karaman et al. (2015)⁶¹ observaram um aumento na frequência de micronúcleos em pacientes com síndrome metabólica. Outros fatores que acarretaram número elevado de micronúcleos foram tercis mais altos da circunferência da cintura, glicose em jejum, hemoglobina glicada e risco de doença cardiovascular ⁶⁰. A obesidade também foi associada a maior frequência de micronúcleos em indivíduos obesos, sendo que o dano genômico promovido pela obesidade pode estar associada a um risco aumentado de câncer, porque um aumento na frequência de MN é um preditor de risco de câncer ⁷³.

A periodontite também pode ser um fator que eleva os danos oxidativos e ao DNA, sendo que foi constatado uma correlação positiva entre o estresse oxidativo produzido pela periodontite e micronúcleos ⁶⁹. Foi observado um aumento médio de 2,3 vezes na frequência de micronúcleos no grupo com periodontite moderada a severa ⁶⁶. Porém, Brandão et al. (2015) ⁶⁸ não observaram aumento do número de micronúcleos em decorrência da periodontite.

Ambos estudos que avaliaram o DM associado à periodontite verificaram que a associação dessas patologias promoveu aumento no número de micronúcleos comparada à presença isolada das doenças ^{70,71}.

Dos estudos que utilizaram o ensaio de micronúcleos como biomarcador de danos no DNA em indivíduos com diabetes e doença periodontal, como mencionado anteriormente, foram encontrados somente dois que avaliaram as duas patologias na mesma pesquisa ^{70,71}. Dentro desse contexto, propõe-se realizar esta pesquisa para contribuir efetivamente com o maior conhecimento do assunto, buscando-se verificar possíveis associações entre doença periodontal, DM tipo 2 e danos no DNA.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo primário: O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial mutagênico relacionados à doença periodontal e o perfil glicêmico.

Objetivos secundários: Avaliação do potencial mutagênico em relação à idade, triglicérides, indicadores antropométricos de obesidade e cigarro.

3 PUBLICAÇÃO^{1*}

Original Research Article

Is there relation between glycemic profile, chronic periodontitis and DNA damage?

Running title: DNA damage in diabetes and periodontitis

Karen B. R. Poquechoque¹, Thamiris Cirelli¹, Marco Antonio Rimachi Hidalgo¹, Ingra Gagno Nicchio¹, Raquel M. Scarel-Caminaga¹, Fabio Renato Manzolli Leite², Gustavo Giacomelli Nascimento², Silvana Regina Perez Orrico¹, Ticiania S. O. Capote¹

¹São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Department of Morphology, Humaita St, 1680, CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil

² Aarhus University, Department of Dentistry and Oral Health, Vennelyst Boulevard 9, building 1610, office 2.88, Denmark

Corresponding author: Karen Basilia Rivera Poquechoque

Department of Morphology, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo, Brazil. Rua Humaitá, 1680 (street), Zip Code 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brazil, Tel.: +55 (16) 3301-6518.

Email: karenpoquechoque@gmail.com

^{1*} O artigo segue as normas da revista Journal of Clinical Periodontology, o qual será submetido para publicação.

Abstract

Aim: To verify the relation of glycemic profile, chronic periodontitis and DNA damage.

Materials and methods: Biochemical tests (glycated hemoglobin - HbA1c; fasting glycemia; insulin; total cholesterol; triglycerides) and periodontal examination, evaluation of anthropometric indicators of obesity (BMI and waist/hip ratio - WHR), and DNA damage evaluation by cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in lymphocytes, observing the frequency of binucleated cells with micronucleus (FBMN) and frequency of micronucleus (FMN). The patients were divided according to their glycemic levels and periodontal profile into three groups (group A, n = 37, without periodontitis and without type 2 DM - DM2; group B, n = 47, with periodontitis, without DM2; group C, n = 19, with periodontitis and DM2). Poisson Multivariate Regression was performed using the frequency of binucleated cells with micronuclei FBMN or FMN as dependent variables. The values were estimated as rate ratio (RR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI).

Results: Poor periodontal parameters were observed in diabetic and periodontitis patients compared to the control group and periodontitis group, besides presenting significantly higher values for triglycerides, HOMA index and glycated hemoglobin. There were no differences in BMI and hip/waist ratio. The mutagenic potential did not increase according to age, total cholesterol and triglycerides. The presence of periodontitis, the diagnosis of DM and the high HOMA index contributes to an increase in FBMN and FMN, however when the interaction between periodontitis and diabetes, and periodontitis and high HOMA index was evaluated, there was a reduction in FBMN and FMN.

Conclusion: Isolated periodontitis and DM contributed to increased DNA damage.

Keywords

periodontal diseases, diabetes, dna damage, micronucleus

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) is an relevant way to evaluate the mutagenesis potential, with the possibility of verifying if individuals with periodontitis and/or diabetes presents higher mutagenic biomarkers in lymphocytes.

Principal findings: Isolated periodontitis and diabetes increased the mutagenic potential.

Practical implications: Health professionals should advise and accompany patients presenting periodontitis and diabetes for having healthy life habits, seeking to reduce contact with agents that increase DNA damage.

1 | INTRODUCTION

The relation between PD and systemic diseases has been studied for several years. The association of periodontitis with diabetes mellitus (DM) can be recognized as the sixth major complication (Casanova et al., 2014), and a greater extent and severity of periodontal disease was detected in individuals with diabetes compared to individuals without diabetes (Mealey & Oates, 2006; Caton et al., 2018).

The most common types of DM are type 1 (DM1), in which pancreatic beta cells are destroyed by autoimmunity, leading to absolute insulin deficiency, and type 2 (DM2). In DM1, the cause is an absolute deficiency in insulin secretion that affects 5 to 10% of people with diabetes, and results from cell-mediated autoimmune destruction of the beta cells of the pancreas. DM2, much more prevalent category (90 to 95% of people with diabetes), the cause is a combination of insulin resistance and an inadequate compensatory insulin secretory response. In DM2, a degree of hyperglycemia sufficient to cause pathological and functional changes in various target tissues, but without clinical symptoms, may be present for a long period of time before diabetes is detected. It covers individuals who have insulin resistance instead of absolute insulin deficiency. The risk of developing this form of diabetes increases with age, obesity and lack of physical activity. It is often associated with a strong genetic predisposition (ADA, 2014). It is estimated that currently approximately 463 million people worldwide have diabetes, and that number is expected to increase to 700 million by 2045 (International Diabetes Federation, 2019; Kebede et al., 2018).

PD and DM are very prevalent and complex chronic diseases (Casanova et al., 2014). Individuals with DM2 present twice the risk of developing periodontitis compared to non-diabetics (Baeza et al., 2020). According to Baeza et al. (2020), almost all patients with DM2 have periodontitis simultaneously. There are interactions between the two diseases that have important clinical implications for dental professionals, doctors and, especially, patients (Casanova et al., 2014).

There is a bidirectional relationship between DM and periodontitis (Casanova et al., 2014; Akazawa, 2018; Kebede et al., 2018; Sanz et al., 2018; Baeza et al., 2020). Diabetes, particularly if glycemic control is deficient, is associated with an increase in the prevalence and severity of periodontitis and severe periodontitis is associated with impaired glycemic control (Casanova et al., 2014).

The specific mechanism that associates DM and PD has not yet been fully elucidated. DM causes a hyperinflammatory response in response to microorganisms

present in the periodontium and impairs repair processes, leading to exacerbation of periodontal changes. Metabolic dysregulation in diabetes as a result of prolonged exposure to chronic hyperglycemia can lead to protein and lipid glycation with subsequent formation of Advanced Glycation End-products (AGEs) and the AGE receptor (RAGES) (Akawasa, 2018; Baeza et al., 2020). AGEs are produced physiologically by the body, but under conditions of hyperglycemia or increased oxidative stress, their presence is greatly increased (Marchetti et al., 2012). DM impairs repair processes by activating RAGE and inflammatory cytokines, which exacerbate periodontal destruction by periodontal microorganisms, such as *Porphyromonas gingivalis*. On the other hand, periodontitis promotes a systemic inflammatory state and exacerbates insulin resistance and glycemic control (Akazawa, 2018). Periodontal infection can cause systemic inflammation by continuous low-grade bacteremia or by the release of pro-inflammatory cytokines into the bloodstream produced in the gums. In turn, AGEs are produced, which contributes to the onset of diabetes by increasing the dysregulation of metabolic control (Kebede et al., 2018).

The accumulation of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress and interactions between AGEs in periodontal tissues and their receptors (RAGES) contribute to increased inflammation in periodontal tissues in diabetics (Casanova et al., 2014).

ROS cause tissue damage through multiple mechanisms, including DNA damage, damage to lipid peroxidation and enzymatic oxidation (Chen et al., 2019). In addition to the excessive production of ROS, periodontitis as well as DM can lead to a reduced antioxidant capacity (Blasiak et al., 2004; D'Aiuto et al., 2010; Chen et al., 2019; Vincent et al., 2019), and the severity of tissue destruction due to excessive ROS is greater when both pathologies are present (Patil et al., 2016). The coexistence of both conditions further reduces antioxidant defense (Vincent et al., 2018).

Oxidative damage to the genetic material can cause breaks in the DNA strand and micronuclei (MN), and these types of damage may have teratogenic or carcinogenic consequences (Zúñiga-González et al, 2007).

DM2 has been associated with high levels of DNA damage, increased susceptibility to mutations, and decreased effectiveness of DNA repair (Martínez-Pérez et al., 2007).

Micronucleus assay is considered one of the preferred methods for assessing chromosomal damage because it allows reliable assessment of chromosome breaks and chromosome loss. Due to the reliability of the Cytokinesis-block micronucleus assay

(CBMN) and its good reproducibility, it has become one of the standard cytogenetic tests for human and mammalian genetic toxicology tests (Fenech, 2007).

Researching the scientific literature, studies have investigated DNA damage by micronucleus assay in diabetic patients (Zúñiga-González et al., 2007; Martínéz-Perez et al., 2007; Shettigar et al., 2012; Müllner et al., 2013; Silva et al., 2013; Karaman et al., 2015; Salimi et al., 2016; Grindel et al., 2017; Ojeda et al., 2018), in patients with periodontitis (Bastos-Aires et al., 2013; D'Agostini et al., 2013; Brandão et al., 2015; Zamora-Perez et al., 2015; and those which evaluated both pathologies (Corbi et al., 2014; Rathod et al., 2016).

Higher frequency of micronuclei was observed in patients with DM2 compared to healthy patients (Mullner et al., 2013; Shettigar et al., 2012; Karaman et al., 2015; Salimi et al., 2016; Grindel et al., 2017; Ojeda et al., 2018). However, Silva et al., (2013) demonstrated that blood glucose and HbA1c were not significantly correlated with the increase in the frequency of micronuclei.

Periodontitis can also be a factor that increases oxidative and DNA damage, with a positive correlation between oxidative stress produced by periodontitis and micronuclei (Zamora Perez et al., 2015). An average increase of 2.3 times in the frequency of micronuclei was observed in the group with moderate to severe periodontitis (Bastos-Aires et al., 2013). However, Brandão et al. (2015) did not observe an increase in the number of micronuclei due to periodontitis.

Both studies which evaluated DM associated with periodontitis demonstrated that the association of these pathologies promoted an increase in the number of micronuclei compared to the isolated diseases (Corbi et al., 2014; Rathod et al., 2016).

Among the studies that used the micronucleus assay as a biomarker of DNA data in patients with diabetes and periodontal disease, only two evaluated both pathologies in the same research (Corbi et al., 2014; Rathod et al., 2016). In light of this context, the purpose of this study was to verify the relation of glycemic profile, chronic periodontitis and DNA damage.

2 | MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the School of Dentistry (UNESP - São Paulo State University, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06).

One hundred and forty patients were selected from those who requested for dental treatment at São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo, Brazil, of both sexes, without distinction of race, and at least 20 years-old. From the 140 selected patients, 103 completed the study and constituted the final sample (Figure 1).

Patients were divided according to their glycemic levels and periodontal profile into three groups: Group A - patients without type DM2 and without periodontitis (control group - 37 patients); Group B - patients without DM2 and with periodontitis (47 patients); Group C - patients with DM2 mellitus and with periodontitis (19 patients). Inclusion criteria were individuals with minimum age of 20 years, and presenting at least 15 natural teeth. Exclusion criteria were antibiotic therapy and/or nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in the previous 3 months, pregnant or lactating patients, hepatitis and HIV infection.

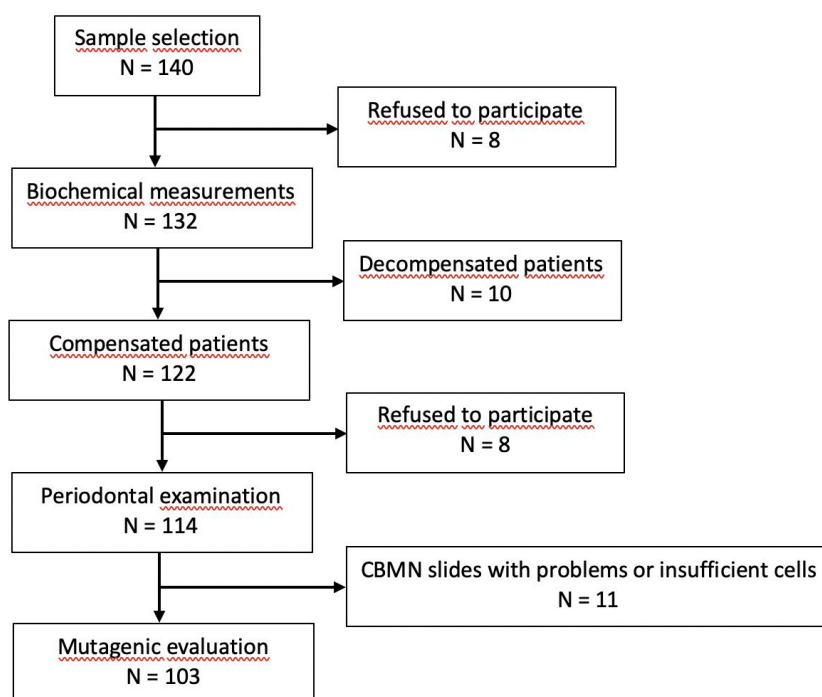


Figure 1. Flowchart of the study.

Periodontal examination

Periodontal clinical examination (periodontal pocket depth, clinical attachment loss, and bleeding on probing) was performed in six sites per tooth. Visible plaque index (VPI), marginal bleeding index (MBI), gingival margin position (GMP), pocket probing depth (PPD), bleeding on probing (BOP), clinical attachment level (CAL) were also evaluated. Periodontitis was classified according to the criteria defined by the CDC/AAP (Centers for Disease Control and Prevention/American Academy of Periodontology) (92). For inclusion in groups B and C, patients presented moderate periodontitis (2 or more sites with interproximal insertion loss greater than 3mm in different teeth or at least two sites with probing depth greater than 4 mm in different teeth) or severe periodontitis (2 or more sites with interproximal insertion loss greater than 5mm on different teeth and at least one site with probing depth greater than 4mm) (Page & Eke, 2007).

Biochemical measurements

Blood samples were collected after a 12h overnight fast for the evaluation of fasting plasma glucose (mg/dl) by modified Bondar & Mead method, glycated hemoglobin (HbA1c) by enzymatic immunoturbidimetry, insulin levels by the chemiluminescence method (U/ml), triglycerides (TGs), and total cholesterol (mg/dl) by enzymatic methods.

Patients with DM2 (group C) were diagnosed by the physician, and the results of recent laboratory tests according to the American Diabetes Association (2019) were also considered. For HbA1c $\geq 7.1\%$, it was considered decompensated diabetes, and $< 7.0\%$ compensated diabetes. Patients without DM2 (normoglycemic - groups A and B) had their glycemic profile tests verified to confirm the absence of diabetes, which was considered as a result of fasting glucose lower than 100 mg/dL and HbA1c $\leq 6.4\%$ (ADA, 2019).

Insulin resistance was calculated by the HOMA index, using the formula: Glycemia (mmol) x Insulin (U/ml) $\div$ 22.5. The values were obtained in fasting and, because the glycemia was measured in mg/dl, to use the above mentioned formula, it was necessary to obtain the glycemia value in mmol/l, by the calculation: glycemia (mg/dl) x 0,0555.

Anthropometric indicators of obesity

Two indicators of anthropometric of obesity were used: BMI and waist:hip ratio. BMI, used as an indicator of overall adiposity, was computed from weight in kilograms.

The waist to hip ratio (WHR) is a measure of abdominal fat accumulation calculated as the ratio of waist circumference to hip circumference.

Cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN)

Fenech & Moley (1985) protocol was used with some modifications. Blood (5 ml) was collected in heparinised vacutainer tubes (Becton–Dickinson, NJ, USA) by venipuncture under sterile conditions. The samples were kept in the refrigerator at 4°C in the dark and processed for micronuclei assay. The cultures were prepared by adding 0.5 ml of isolated lymphocytes with plasma to 5 ml of complete medium containing 78% RPMI cell culture medium (Sigma–Aldrich Co., USA), 20% inactivated foetal bovine serum (Gibco-Invitrogen, Denmark), antibiotics (penicillin and streptomycin, Sigma–Aldrich Co., USA), and 2% phytohaemagglutinin (PHA; Gibco-Invitrogen, Denmark). Cultures were incubated at 37°C for 72 h before harvesting. After 44 h, cytochalasin B (6 µg/ml, Sigma–Aldrich Co., USA) was added to the cultures to stop cytokinesis. At 72 h of seeding, the cells were washed with PBS, trypsinized, and centrifuged. The cells were subjected to a mild hypotonic treatment (1% sodium citrate), fixed twice with methanol:acetic acid (3:1), smeared on a precleaned microscope slides and air-dried. Staining was performed with Giemsa (5% in Sorensen buffer). The frequency of binucleated cells with micronuclei (MNBCF), and the micronucleus frequency (MNF) were analyzed in 1000 binucleated cells according to Fenech (2000). The nuclear division index (NDI) was calculated by scoring 500 cells with 1, 2, 3 or 4 nuclei using the formula: $NDI = M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)/N$; where, M1–M4 stands for the number of cells with 1–4 nuclei, and N is the total number of viable cells.

Statistical analysis

The data were exported from the Microsoft Excel 2016 program to the Stata 14.2 software program (StataCorp, College Station, TX, USA). Descriptive statistical analysis was performed using frequency for categorical variables and descriptive analysis for continuous variables. Poisson Multivariate Regression was performed using the frequency of binucleated cells with micronuclei (FBMN) or the frequency of micronuclei (FMN) as dependent variables. The main independent variables used were the diagnosis of periodontitis (dichotomized without periodontitis or mild periodontitis, and moderate or severe periodontitis) and measurements associated with the diagnosis or control of diabetes (values of the HOMA index and HbA1c). HOMA scores were divided into

tertiles and this variable was dichotomized (highest tertile vs. two lower tertiles). Therefore, according to data distribution the HOMA cut-off point was established at 4.0. The analyzes were adjusted for age, total cholesterol, triglycerides and smoking (dichotomized in smokers and never/former-smokers). An interaction term was included in the analyzes to explore a possible combined effect between periodontitis diagnosis and HOMA or HbA1c values. The values were estimated as rate ratio (RR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI).

3 | RESULTS

Table 1 shows the characteristics of the sample: age, biochemical data, physical data, frequency of micronucleus in binucleated cells, frequency of micronucleus, and periodontal data.

Never smokers and former-smokers with smoking cessation over than one year were joined in the same category (Leite et al., 2019). The number of smokers was 4 (10.8%), 2 (4.25%) and 1 (5.26%) for groups A, B and C, respectively, with no difference between groups ($p = 0.482$). The number of women was 54.05%, 68.08%, 68.4% for groups A, B and C, respectively, with no statistical difference between them ($p = 0.369$).

The Nuclear Division Index (NDI) is not an indicator of mutagenic potential. It demonstrates cell kinetics. In the micronucleus test, it is expected no difference between groups. The mean value of the NDI was 1.69, 1.61 and 1.64, for groups A, B and C, respectively, with no difference between them ($p = 0.952$).

Figure 2 show binucleated cells obtained by CBMN assay.

Table 1. Sample characteristics: age, biochemical data, physical data, frequency of micronucleus in binucleated cells (FBMN), frequency of micronucleus (FMN), periodontal data of the groups A, B and C (mean $\pm$ SD). Araraquara, 2020.

	Group A n=37	Group B n=47	Group C n=19	p-value
Age (years)	45.84 (12.27) ^a	50.47 (13.06) ^{ab}	55.32 (8.47) ^b	0.020
Triglycerides (mg/dl)	143.27 (76.98) ^a	157.72 (107.34) ^a	235.21 (183.41) ^b	0.017
HOMA	3.07 (2.49) ^a	2.85 (1.69) ^a	6.79 (4.90) ^b	0.001
HbA1c (1%)	5.62 (0.83) ^a	5.57 (0.46) ^a	7.87 (2.31) ^b	0.001
WHR	1.14 (0.14)	1.14 (0.13)	1.07 (0.12)	0.122
BMI (m/kg²)	28.23 (4.97)	26.61 (5.53)	29.97 (6.71)	0.082
Total Cholesterol (mg/dl)	180.68 (38.17)	181.40 (33.27)	167.47 (28.68)	0.299
FBMN	14.32 (9.56)	16.60 (8.99)	17.79 (13.62)	0.419
FMN	15.65 (11.03)	18.40 (10.22)	20.21 (16.72)	0.354
BOP (%)	8.78 (11.10) ^a	46.57 (28.86) ^b	56.63 (38.58) ^b	0.001
PPD 5 mm (%)	0.0 (0.0) ^a	8.21 (11.75) ^b	19.95 (21.64) ^c	0.001
CAL $\leq$ 3mm (%)	98.65 (1.86) ^a	73.22 (20.69) ^b	55.48 (28.25) ^c	0.001
CAL 4-5mm (%)	1.23 (1.69) ^a	17.15 (12.34) ^b	26.11 (14.86) ^c	0.001
CAL $\geq$ 6mm (%)	0.14 (0.34) ^a	9.62 (1.33) ^b	18.41 (18.39) ^c	0.001
Number of teeth	25.43 (3.99) ^a	23.21 (3.52) ^b	19.90 (5.67) ^c	0.001

Different letters indicate a statistically significant difference. $p < 0.05$.

Among the participants with diabetes diagnose (n=19), 13 (68.4%) also presented HOMA $\geq$ 4.0; while among those without diabetes diagnose (n=84), 22 (26.2%) presented HOMA $\geq$ 4.0.

The mean age of diabetics (group C) was higher compared to the other groups. The mean triglycerides was also higher for diabetics, as well as the mean HOMA Index, HbA1c, BOP, PPD, CAL 4-5 mm, CAL $\geq$ 6mm. The number of teeth was lower in group C. There was no difference in WHR, BMI, total cholesterol, FBMN and FMN.

Table 2 shows the rate ratio (RR) for an increase in the frequency of binucleated cells with micronucleus (FBMN) and an increase in the frequency of micronuclei (FMN), in the presence of periodontitis, according to HbA1c, HOMA, age and smoking for the total sample. Age, total cholesterol and triglycerides did not show statistically significant results.

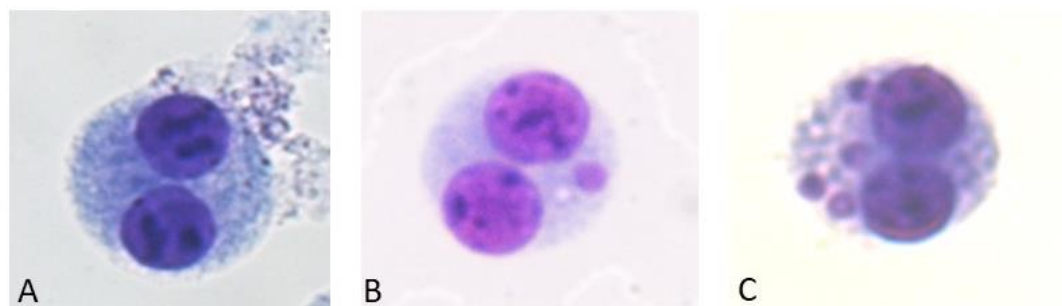


Figure 2. Binucleated cells obtained in CBMN assay. A. Binucleated cell without micronucleus. B. Binucleated cell with one micronucleus. C. Binucleated cell with four micronuclei.

Table 2. Rate ratio with respective 95% confidence interval (RR and 95% CI) for increased FBMN and FMN in the presence of periodontitis, according to diabetes diagnosis, HOMA, age and smoking (n=103). Araraquara, 2020.

Variable	RR for FBMN (95% CI)	RR for FMN (95% CI)
Periodontitis (healthy/mild vs. moderate/severe)	1.28 (1.21;1.47)	1.30 (1.14;1.48)
DM diagnosis	1.29 (0.75;2.20)	1.40 (0.84;2.31)
HOMA ≥ 4.0	1.64 (1.36;1.98)	1.67 (1.39;1.99)
Smoking (yes/no)	1.36 (1.11;1.67)	1.40 (1.14;1.68)
Interaction of periodontitis and DM diagnosis	0.74 (0.42;1.31)	0.69 (0.41;1.17)
Interaction of periodontitis and HOMA ≥ 4.0	0.78 (0.62;0.97)	0.77 (0.62;0.95)

The results related to the rate ratio for the increase in the frequency of micronuclei were similar to the ones for the frequency of micronuclei in the presence of periodontitis, considering the diagnosis of diabetes, HOMA ≥ 4.0 and smoking (Table 2). The presence of moderate and severe periodontitis, a diagnosis of diabetes, presenting HOMA ≥ 4.0 and smoking increased the number of micronuclei in 30, 40, 67 and 40 cells, respectively.

Oppositely, the combination of presenting a diagnosis of moderate/severe periodontitis with HOMA ≥ 4.0 or diabetes diagnose resulted in a reduction in the number of cells with micronuclei of 23 and 31 cells, respectively. RR shows that the direction of the association is towards a reduction of FBMN and FMN.

4 | DISCUSSION

It is estimated that over the years there will be an increase in the number of diabetics (International Diabetes Federation, 2019; Kebede et al., 2018). The bidirectional relationship between DM and periodontitis is evident (Casanova et al., 2014; Kebede et al., 2018; Baeza et al., 2020; Akazawa, 2018; Sanz et al., 2018). Studies have confirmed a significant association between chronic hyperglycemia and a high prevalence of periodontitis, particularly in DM2 (Hodge et al., 2012; Lappin et al., 2015; Meenawat et al., 2013). The hyperglycemia seen in DM2 was associated with increased oxidative stress and production of reactive oxygen species, both of which are factors that can provoke DNA damage (Silva et al., 2013).

Our study observed an increase in DNA damage in diabetic and periodontitis patients. FBMN and FMN was higher in group C, but there was no statistically significant difference between groups. However, when Poisson Multivariate Regression was performed, the diagnosis of DM and $\text{HOMA} \geq 4.0$ led to an increase in FBMN and FMN. Higher frequencies of micronucleus were observed in almost all DM1 and DM2 patients compared to controls (Ojeda et al., 2018). In DM2, the frequency of micronuclei significantly increased with the duration of diabetes, which could be due to the increasing susceptibility of the patients to DNA damage with the increase of the duration of diabetes (Ojeda et al., 2018). The occurrence of micronuclei was significantly increased in DM2 patients (Müllner et al., 2013; Grindel et al., 2017). MN frequency was also significantly increased in patients with metabolic syndrome (Karaman et al., 2015). The increased glycosylation seems to induce oxidative damage in the DNA of the diabetic patients, which manifests as an increased micronuclei frequency (Shettigar et al., 2012). DM2 may be associated not only with the elevated level of oxidative DNA damage, but also with the increased susceptibility to mutagens and the decreased efficacy of DNA repair (Blasiak et al., 2004).

In diabetic patients, there is a direct and dose-dependent relation between periodontitis severity and diabetes complications (Mealey & Rose, 2008; Chapple & Genco, 2013), with a clear relation between degree of hyperglycemia and severity of periodontitis (Preshaw et al., 2012; Sanz et al., 2018). This relation is evident in our results. In general, the parameters that indicate the presence and severity of periodontitis were altered in diabetic patients. Group C showed worse periodontal conditions compared to the other groups, even the group with periodontitis without diabetes (group B), i.e.,

higher BOP, PPD, CAL values, and reduced number of teeth. Periodontal indices including BOP, CAL, PPD and plaque index were also significantly higher in the patients with diabetes (Bazyar et al., 2019). According to Casanova et al. (2014), the magnitude of the increased risk of periodontitis is known to be dependent on the level of glycemic control, as it is with the risk of all complications of diabetes. Contrary to the currently available literature, no convincing evidence was found of any potential association between periodontitis and diabetes incidence or HbA1c change by Kebede et al. (2018).

HbA1C has consistently been used as the measure of glycemia and it is considered as the outcome measure of diabetes control (Chapple & Genco, 2013). Our results showed that diabetic patients presented the highest values for HbA1c, and HOMA compared to non-diabetic patients, with a statistically significant difference. Also, as expected, HbA1c levels were significantly higher in patients with DM2 compared to healthy subjects (Akalin et al., 2007; Karaman et al., 2015; Ojeda et al., 2018; Bazyar et al., 2019).

Triglycerides level was higher in group C with a statistically significant difference. Triglycerides level usually is higher in diabetic groups compared to healthy non-diabetic groups (Akalin et al., 2007). Metabolic syndrome patients also presented higher serum levels of triglycerides (Karaman et al., 2015).

In our study, the presence of moderate and severe periodontitis led to an increase in FBMN and FMN. Bastos-Aires et al. (2013) observed an average 2.3-fold increase in the MN frequency in the group with medium to severe periodontitis. Also, subjects with periodontitis exhibited an increase in the frequency of micronuclei (Zamora Perez et al., 2015). Different results were showed by Brandão et al. (2015), who verified no statistically significant difference in the occurrence of micronucleus between gingivitis, periodontitis and control groups.

When the interaction of periodontitis and diagnosis of diabetes, periodontitis and $\text{HOMA} \geq 4.0$ was evaluated, there was a reduction in FBMN and FMN. The periodontitis associated with diabetes activates an exaggerated systemic inflammatory response to subgingival bacteria and leads to an acute phase protein burst and systemically elevated levels of proinflammatory mediators which facilitate insulin resistance (Baeza et al., 2020). This elevated inflammatory response may have promoted apoptosis of the cells, and because of this, the cells did not undergo mitosis and there was no formation of micronuclei. According to Brandão et al. (2015), the greater occurrence of apoptosis in individuals with periodontitis points to genotoxic effects associated with the inflammatory process and may suggest that this process could have masked the

occurrence of chromosomal damage by elimination of genetically impaired cells. Another explanation for the reduced FBMN and FMN with the interaction, could be *ex vivo* cell death of damaged cells or their failure to divide in culture because they already contain MN induced by both chronic diseases (Fenech & Bonassi, 2011).

The rate of apoptosis in hyperglycemic test groups was significantly higher than other patients (Ojeda et al., 2018). Different results were demonstrated in studies that evaluated the frequency of micronuclei related to periodontitis and diabetes, which found a greater increase in the number of micronuclei when pathologies were associated (Corbi et al., 2014; Ratoh et al., 2016).

According to Fenech & Bonassi (2011), smokers generally do not experience an overall increase in micronucleus frequency, although when the interaction with occupational exposure is taken into account, heavy smokers (≥ 30 cigarettes/day) were the only group showing a significant increase in genotoxic damage as measured by the micronucleus assay in lymphocytes. Heavy smoking (>20 cigarettes/day) was positively associated with micronucleus frequency in buccal mucosa cells (Wu et al., 2004). Naderi et al. (2012) verified that the number of micronuclei in buccal mucosa cells of smokers was higher than nonsmokers. The authors observed that the prevalence of micronucleus in individuals with the smoking history of more than 10 years was very higher than the persons with the history of smoking less than 10 years. Our results showed that smoking increased FBMN e FMN, however we failed in evaluating the quantity of cigarettes were smoked by day. Similar results were detected in other study, in which significantly higher frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes was observed in smokers, and the authors verified no significant correlations for age, duration and intensity of smoking (Haveric et al., 2010). Aging is associated both with a progressive decline in glucose tolerance and coincidentally with increasing prevalence of periodontitis (Kocher et al., 2018). Chronic low-grade sterile inflammation is associated with age- related diseases, such as diabetes, cancer, and cardiovascular disease, and has been postulated to have a central role in accelerating these disease processes (Shimizu et al., 2014). Our results showed that group C presented statistically higher mean age compared to the other groups (mean age 55.32 years). Despite the higher age of group C, age did not interfere in the increase of micronuclei. Age is a factor that normally leads to an increase in micronuclei (Fenech & Bonassi, 2011), however, this did not occur in our study. This fact may have occurred due to the difference in the genotype, which may influence the degree to which age affect the frequency of micronuclei (Fenech & Bonassi, 2011). Other micronucleus

study detected no significant relationship between age and frequency of micronuclei (D'Agostini et al., 2013).

Body mass index is an important risk factor for a wide range of chronic diseases and injuries, including cardiovascular disease and DM2 (Huxley et al., 2010). Although BMI has traditionally been the method of measuring body size in epidemiological studies, alternative measures such as waist circumference and hip/waist ratio, which measures abdominal fat accumulation, have been suggested to be higher than BMI in predicting of the risk of cardiovascular disease (Schneider et al., 2007; Huxley et al., 2010). A systematic review and meta-analysis showed that WHR was a better predictor than BMI and waist circumference for hypertension, dyslipidemia, diabetes, and cardiovascular risk (Ashwell et al., 2012). An increased BMI, among over-weight individuals, has been shown to be associated with increased risk of DNA damage due to oxidative stress and of cardiovascular disease (Al-Aubaidy & Jelinek, 2011). Studies have demonstrated higher BMI in hyperglycemic individuals (Karaman et al., 2015; Grindel et al., 2016; Ojeda et al., 2018; Bazzyar et al., 2019). However, no major disparities regarding oxidative stress, damage to DNA and DNA repair were present which might be due to good medical treatment with regular health checks in DM2 patients in Austria (Grindel et al., 2016). BMI and WHR were evaluated in our sample, and no differences were observed between the groups.

This clinical study showed that periodontitis and DM increased the number of mutagenic biomarkers. Health professionals should advise and accompany patients presenting periodontitis and diabetes for having healthy life habits, seeking to reduce contact with agents that increase DNA damage. One of the limitations of our study is the smaller number of the group of diabetic patients. Increasing the sample could give greater precision to the confidence intervals. Other limitation of our study is the absence of information regarding the DM duration. In DM2, the frequency of micronuclei significantly increased with the duration of diabetes, which could be due to the increasing susceptibility of the patients to DNA damage with the increase of the duration of diabetes (Ojeda et al., 2018).

Therefore, in view of our results and the limitations of this study, it was concluded that periodontitis and diabetes mellitus, when categorized separately, present mutagenic potential. Future studies with a larger number of patients and a more detailed anamnesis form are needed for accuracy of the results.

REFERENCES

- Akalin, F. A., Baltacioğlu, 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. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(7), 558–565.
- Akazawa H. (2018). Periodontitis and Diabetes Mellitus: Be true to your teeth. *International heart journal*, 59(4), 680–682.
- Al-Aubaidy, H. A., & Jelinek, H. F. (2011). Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*, 164(6), 899–904. <https://doi.org/10.1530/EJE-11-0053>
- American Diabetes Association (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(Supp 1): S81-S90.
- American Diabetes Association (2019). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes care*, 42(Suppl 1), S13–S28.
- Ashwell, M., Gunn, P., & Gibson, S. (2012). Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13(3), 275–286. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00952.x>
- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G., Isamitt, Y., Pino, P., & Gamonal, J. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *Journal of applied oral science: revista FOB*, 28, 1-13.
- Bastos-Aires, D., Azevedo, Á., De Lurdes Pereira, M., Pérez-Mongiovi, D., & Teixeira, A. (2013). Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *Journal of Dental Sciences*, 8(2), 200–204.
- Bazyar, H., Adibmanesh, A., Javid, A. Z., Maghsoumi-Norouzabad, L., Gravand, E., Alipour, M., & Sadeghi, N. (2019). The relationship between metabolic factors and anthropometric indices with periodontal status in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis. *Obesity Medicine*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100138>
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M. Drzewoski, J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes

- mellitus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1-2), 297-304.
- Brandão, P., Gomes-Filho, I. S., Cruz, S. S., Passos-Soares, J., Trindade, S. C., Souza, L., Meireles, J. R., & Cerqueira, E. (2015). Can periodontal infection induce genotoxic effects?. *Acta odontologica Scandinavica*, 73(3), 219–225.
- Casanova, L., Hughes, F. J., & Preshaw, P. M. (2014). Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *British dental journal*, 217(8), 433–437.
- Caton, J.G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I.L.C., Jepsen, S., Kornman, K.S., et al. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri - implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. 2018; 45 Suppl 20: S1 – S8.
- Chapple, I. L., Genco, R., & Working Group 2 of the Joint EFP/AAP Workshop. (2013). Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, S106-S112.
- Chen, M., Cai, W., Zhao, S., Shi, L., Chen, Y., Li, X., Sun, X., Mao, Y., He, B., Hou, Y., Zhou, Y., Zhou, Q., Ma, J., & Huang, S. (2019). Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*, 46(6), 608–622.
- Corbi, S. C., Bastos, A. S., Orrico, S. R., Secolin, R., Dos Santos, R. A., Takahashi, C. S., & Scarel-Caminaga, R. M. (2014). Elevated micronucleus frequency in patients with type 2 diabetes, dyslipidemia and periodontitis. *Mutagenesis*, 29(6), 433-439.
- D'Agostini, F., Calcagno, E., Micale, R. T., La Maestra, S., De Flora, S., & Cingano, L. (2013). Cytogenetic analysis of gingival epithelial cells, as related to smoking habits and occurrence of periodontal disease. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(1), 71–75.
- D'Aiuto, F., Nibali, L., Parkar, M., Patel, K., Suvan, J., & Donos, N. (2010). Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *Journal of dental research*, 89(11), 1241–1246.
- Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.

- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084.
- Fenech, M., & Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43-49.
- Grindel, A., Guggenberger, B., Eichberger, L., Pöppelmeyer, C., Gschaidner, M., Tosevska, A., Wagner, K. H. (2016). Oxidative stress, DNA Damage and DNA repair in female patients with diabetes mellitus type 2. *PLoS ONE*, 11(9), 1-17 .
- Grindel, A., Brath, H., Nersesyan, A., Knasmueller, S., & Wagner, K. H. (2017). Association of Genomic Instability with HbA1c levels and Medication in Diabetic Patients. *Scientific Reports*, 1-9.
- Haveric, A., Haveric, S., & Ibrulj, S. (2010). Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(5), 260–266.
- Hodge, P. J., Robertson, D., Paterson, K., Smith, G. L., Creanor, S., & Sherriff, A. (2012). Periodontitis in non-smoking type 1 diabetic adults: a cross-sectional study. *Journal of clinical periodontology*, 39(1), 20–29.
- Huxley, R., Mendis, S., Zheleznyakov, E., Reddy, S., & Chan, J. (2010). Body mass index, waist circumference and waist: hip ratio as predictors of cardiovascular risk—a review of the literature. *European journal of clinical nutrition*, 64(1), 16.
- International Diabetes Federation (2019). *IDF Diabetes atlas (9 ed.)*. Brussels: IDF. [WWW document]. Available at: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019.pdf
- Karaman, A., Aydin, H., Geçkinli, B., Çetinkaya, A., & Karaman, S. (2015). DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 782, 30–35.
- Kebede, T. G., Pink, C., Rathmann, W., Kowall, B., Völzke, H., Petersmann, A., Meisel, P., Dietrich, T., Kocher, T., & Holtfreter, B. (2018). Does periodontitis affect diabetes incidence and haemoglobin A1c change? An 11-year follow-up study. *Diabetes & metabolism*, 44(3), 243–249..

- Kocher, T., König, J., Borgnakke, W. S., Pink, C., & Meisel, P. (2018, October 1). Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/prd.12235>.
- Lappin, D. F., Robertson, D., Hodge, P., Treagus, D., Awang, R. A., Ramage, G., & Nile, C. J. (2015). The Influence of Glycated Hemoglobin on the Cross Susceptibility Between Type 1 Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Journal of periodontology*, 86(11), 1249–1259.
- Leite, F., Nascimento, G. G., Baake, S., Pedersen, L. D., Scheutz, F., & López, R. (2019). Impact of Smoking Cessation on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Longitudinal Observational and Interventional Studies. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 21(12), 1600–1608.
- Marchetti, E., Monaco, A., Procaccini, L., Mummolo, S., Gatto, R., Tetè, S., Baldini, A., Tecco, S., & Marzo, G. (2012). Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*, 9(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-88>.
- Martínez-Pérez, L. M., Cerda-Flores, R. M., Gallegos-Cabriales, E. C., Dávila-Rodríguez, M. I., Ibarra-Costilla, E., Cortés-Gutiérrez, E. I. (2007). Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Medical Report*, 108(3), 248-55.
- Mealey, B.L., Oates, T.W. (2006) American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 77(8): 1289-303.
- Mealey, B. L., & Rose, L. F. (2008). Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 15(2), 135-141.
- Meenawat, A., Pun, K., Srivastava, V., Meenawat, A. S., Dolas, R. S., & Govila, V. (2013). Periodontal disease and type I diabetes mellitus: Associations with glycemic control and complications. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(5), 597–600.
- Müllner, E., Brath, H., Nersesyan, A., Nitz, M., Petschnig, A., Wallner, M., ... Wagner, K. H. (2014). Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. *Mutagenesis*, 29(1), 1–6.

- Naderi, N.J, Farhadi, S., Sarshar, S. (2012). Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. . Indian Journal of Pathology and Microbiology, v. 55, n. 4, p. 433, 2012.
- Ojeda, J. E. Q., Aguilar-Medina, M., Olimón-Andalón, V., Jau, R. A. G., Ham, A. A., Quintana, J. G. R., ... Ramos-Payán, R. (2018). Increased micronuclei frequency in oral and lingual epithelium of treated diabetes mellitus patients. *BioMed Research International*, 2018.
- Patil, V. S., Patil, V. P., Gokhale, N., Acharya, A., & Kangokar, P. (2016). Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: Oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(4), BC12–BC16.
- Page, R. C., Eke, P. I. (2007). Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 78, 1387-1399.
- Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., & Taylor, R. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21-31.
- Rathod, S., Raj, A., Jadhav, P., & Sarda, T. (2016). Assessment of cytogenic damage in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus subjects through micronucleus test. *Saudi Journal of Oral Sciences*, 3(2), 75.
- Salimi, M., Broumand, B., & Mozdarani, H. (2016). Association of elevated frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of type 2 diabetes patients with nephropathy complications. *Mutagenesis*, 31(6), 627–633.
- Sanz, M., Ceriello, A., Buysschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., Herrera, D., Jepsen, S., Lione, L., Madianos, P., Mathur, M., Montanya, E., Shapira, L., Tonetti, M., & Vegh, D. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Diabetes research and clinical practice*, 137, 231–241.
- Schneider, H. J., Glaesmer, H., Klotsche, J., Bohler, S., Lehnert, H., Zeiher, A. M., Marz, W., Pittrow, D., Stalla, G. K., Wittchen, H. & DETECT Study Group. (2007). Accuracy of anthropometric indicators of obesity to predict cardiovascular risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(2), 589-594.

- Shettigar, S. K. G., Shailaja, C., & Kulkarni, R. K. (2012). Elevated micronuclei frequency in type 2 diabetes with high glycosylated hemoglobin. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 95(2), 246–250.
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Suda, M., & Minamino, T. (2014, December 2). DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metabolism*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.008>
- Silva, B. S., Rovaris, D. L., Bonotto, R. M., Meyer, J. B. F., Grohe, R. E., Perassolo, M. S., De Andrade, F. M. (2013). The influence on DNA damage of glycaemic parameters, oral antidiabetic drugs and polymorphisms of genes involved in the DNA repair system. *Mutagenesis*, 28(5), 525–530.
- Vincent, R. R., Appukuttan, D., Victor, D. J., & Balasundaram, A. (2018). Oxidative stress in chronic periodontitis patients with type II diabetes mellitus. *European journal of dentistry*, 12(2), 225–231.
- Wu, P. A., Loh, C. H., Hsieh, L. L., Liu, T. Y., Chen, C. J., & Liou, S. H. (2004). Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutation research*, 562(1-2), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.05.004>
- Zamora-Perez, A. L., Ortiz-García, Y. M., Lazalde-Ramos, B. P., Guerrero-Velázquez, C., Gómez-Meda, B. C., Ramírez-Aguilar, M. A., & Zúñiga-González, G. M. (2015). Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 50(1), 28–36
- Zúñiga-González, G. M., Batista-González, C. M., Gómez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, M. L., Zamora-Perez, A. L., Munoz-Magallanes, T., Ramos-Valdes, C., Gallegos-Arreola, M. P. (2007). Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634(1-2), 126-134.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/03753-8, 2016/08070-6).

CAPES.- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a periodontite e o diabetes isoladamente levam ao aumento do potencial mutagênico, porém, quando associados, ocorre anulação do fator mutagênico. Indivíduos fumantes apresentaram aumento de micronúcleos. O IMC e a relação quadril-cintura, assim como a idade e triglicérides não interferiram no potencial mutagênico. Devido aos poucos estudos realizados em pacientes, futuras pesquisas serão necessárias com amostras maiores para maior precisão dos intervalos de confiança.

REFERÊNCIAS*

1. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. J Clin Periodontol. 2018; 89 Suppl 1: S9-S16
2. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. Nutr Metab (Lond). 2012; 9(1): 88
3. Sambunjak D, Nickerson JW, Poklepovic T, Johnson TM, Imai P, Tugwell P, et al. Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults. Cochrane database Syst Rev. 2011; (12): CD008829.
4. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. Lab Invest. 1976; 34(3): 235–49.
5. Sima C, Glogauer M. Diabetes mellitus and periodontal diseases. Curr Diab Rep. 2013; 13(3): 445–52.
6. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri - implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. 2018; 45 Suppl 20: S1 – S8.
7. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. Aust Dent J. 2009; 54 Suppl 1: S11-26. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x. PMID: 19737262.
8. Andriankaja OM, Sreenivasa S, Dunford R, DeNardin E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. Aust Dent J. 2010; 55(3): 252–9.
9. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23(3): 196–205.
10. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000. 1997; 14: 9–11.
11. 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(1):403-9. PMID: 9551997.
12. Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. J Clin Periodontol. 2010; 37(2): 137–44.
13. Mealey BL, Oates TW. American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. J Periodontol. 2006; 77(8): 1289-303. doi: 10.1902/jop.2006.050459. PMID: 16881798

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

14. Almeida BB, Ferreira ACR, Queiroz APG, Dornelas GN, Coelho MMST. Condições periodontais em portadores de diabetes mellitus atendidos no centro de referencia sul fluminense de diabetes e hipertensão de vassouras - RJ. J Periodontol Braz. 2014; 24(04): 14–23.
15. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes Care. 1993; 16(1): 329–34.
16. Casanova L, Hughes FJ, Preshaw PM. Diabetes and periodontal disease : a two-way relationship. Br Dent J. 2014; 217(8):433-7.
17. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes - 2019. Diabetes Care. 2019; 42 (1): S13–28.
18. Kebede TG, Pink C, Rathmann W, Kowall B, Völzke H, Petersmann A, et al. Does periodontitis affect diabetes incidence and haemoglobin A1c change? An 11-year follow-up study. Diabetes Metab. 2018; 44(3): 243-249.
19. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas. 9 ed. Brussels: IDF; 2019. [acesso em 01 mar. 2020]. Disponível em: [https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF Atlas 9th Edition 2019.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF%20Atlas%209th%20Edition%202019.pdf)
20. Brandão D, Silva A, Penteado L. Relação bidirecional entre a doença periodontal e a diabetes mellitus. Odontol Clínico-Cient. 2011; 10(2): 117–20.
21. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. J Appl oral Sci Rev FOB. 2020; 28: 1–13.
22. Akazawa H. Periodontitis and Diabetes Mellitus. Int Heart J 2018; 59: 680-682.
23. Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. Diabetes Res Clin Pract. 2018; 137: 231–41.
24. Hodge PJ, Robertson D, Paterson K, Smith GL, Creanor S, Sherrieff A. Periodontitis in non-smoking type 1 diabetic adults: a cross-sectional study. J Clin Periodontol. 2012; 39(1): 20-9.
25. Lappin DF, Robertson D, Hodge P, et al. The Influence of Glycated Hemoglobin on the Cross Susceptibility Between Type 1 Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. J Periodontol. 2015; 86(11): 1249–1259.

26. Meenawat A , Pun K , Srivastava V , Meenawat AS , Dolas RS G V. Periodontal disease and type I diabetes mellitus: Associations with glycemic control and complications. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(5): 597–600.
27. Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, Teeuw WJ. Evaluating all potential oral complications of Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol*. 2019; 10:1–49.
28. Bascones-Martinez A, Matesanz-Perez P, Escribano-Bermejo M, González-Moles MÁ, Bascones-Ilundain J, Meurman JH. Periodontal disease and diabetes-Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(6): 722-9.
29. Monea A, Mezei T, Popsor S, Monea M. Oxidative Stress : A link between Diabetes Mellitus and periodontal disease. *Int J Endocrinol*. 2014; 2014: 1-4.
30. Chen M, Cai W, Zhao S, Shi L, Chen Y, Li X, et al. Oxidative stress - related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis : A systematic review and meta - analysis. *J Clin Periodontol*. 2019;46(6):608–622.
31. Vincent RR, Appukuttan D, Victor DJ, Balasundaram A. Oxidative stress in chronic periodontitis patients with type II diabetes mellitus. *Eur J Dent*. 2018; 12(2): 225-231..
32. Saintot M, Astre C, Pujol H, Gerber M. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Carcinogenesis*. junho de 1996;17(6):1267–71.
33. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species : a missed opportunity ? *Oral Dis*. 2000; 6(3): 136–137.
34. Sen CK. Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1995; 39(3): 177–96.
35. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404(6779): 787–90.
36. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res*. 2004; 554(1–2): 297–304.
37. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991; 40(4): 405–12.
38. 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.
39. Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39(11): 1420–4.

40. 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 Nov; 26(5): 387-92.
41. Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 2003; 29(6): 579–85.
42. Mooradian AD. Increased serum conjugated dienes in elderly diabetic patients. *J Am Geriatr Soc.* 1991; 39(6): 571–4.
43. 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.
44. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull.* 1995;51(2):419–36.
45. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(5 Pt 2): S58-65.
46. 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(6): 4561–6.
47. 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(7): 558–65.
48. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000; 71(8): 1375–84.
49. Teng Y-TA. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 237–52.
50. 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(5): 378–84.
51. Patil VS, Patil VP, Gokhale N, Acharya A, Kangokar P. Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetes Mellitus : Oxidative Stress as a Common Factor in Periodontal Tissue Injury. 2016; 10(4): 12–6.
52. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89(11): 1241-6.

53. Masi S, Orlandi M, Parkar M, et al. Mitochondrial oxidative stress, endothelial function and metabolic control in patients with type II diabetes and periodontitis: A randomised controlled clinical trial. *Int J Cardiol.* 2018; 271: 263–268.
54. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-fan X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol.* 2017; 8: 1-13.
55. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, et al. Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2007; 634(1–2): 126–34.
56. Surralls J, Xamena N, Creus A, Marcos R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res.* 1995; 342(1-2): 43-59.
57. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007; 2(5): 1084–104.
58. Martínez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabriaes EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep.* 2007;108(3):248–55.
59. Shettigar SKG, Shailaja C, Kulkarni RK. Elevated micronuclei frequency in type 2 diabetes with high glycosylated hemoglobin. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 95(2): 246–50.
60. Müllner E, Brath H, Nersesyan A, Nitz M, Petschnig A, Wallner M, et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. *Mutagenesis.* 2014; 29(1): 1-6.
61. Karaman A, Aydın H, Gec B, Arda C. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 782: 30-5.
62. Salimi M, Broumand B, Mozdarani H. Association of elevated frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of type 2 diabetes patients with nephropathy complications. *Mutagenesis.* 2016; 31(6): 627-633.
63. Silva B, Rovaris DL, Bonotto RM, Brasil J, Meyer F, Grohe RE, et al. The influence on DNA damage of glycaemic parameters, oral antidiabetic drugs and polymorphisms of genes involved in the DNA repair system. *Mutagenesis.* 2013; 28(5): 525–30.
64. Grindel A, Brath H, Nersesyan A, Knasmueller S, wagner K. Association of Genomic Instability with HbA1c levels and Medication in Diabetic Patients. *Sci Rep.* 2017; 7: 41985.

65. Ojeda JEQ, Aguilar-Medina M, Olimón-Andalón V, Jau RAG, Ham AA, Quintana VO, et al. Increased micronuclei frequency in oral and lingual epithelium of treated Diabetes Mellitus Patients. *BioMed Res Int*. 2018; 2018(1): 1-8.
66. Bastos-Aires D, Azevedo Á, De Lurdes Pereira M, Pérez-Mongiovi D, Teixeira A. Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *J Dent Sci*. 2013; 8(2): 200–204.
67. Agostini FD, Calcagno E, Micale RT, La S, Flora S De, Cingano L. International Journal of Hygiene and Cytogenetic analysis of gingival epithelial cells , as related to smoking habits and occurrence of periodontal disease. *Int J Hyg Environ Health*. 2013; 216(1): 71–5.
68. Brandão Pde T, Gomes-Filho IS, Cruz SS, Passos-Soares Jde S, Trindade SC, Souza Lda C, et al. Can periodontal infection induce genotoxic effects? *Acta Odontol Scand*. 2015; 73(3): 219-25.
69. Zamora-Perez AL, Ortiz-García YM, Lazalde-Ramos BP, Guerrero-Velázquez C, Gómez-Meda BC, Ramírez-Aguilar MA, et al. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 2015; 50(1): 28–36.
70. Corbi SC, Bastos AS, Orrico SR, Secolin R, Dos Santos RA, Takahashi CS et al. Elevated micronucleus frequency in patients with type 2 diabetes, dyslipidemia and periodontitis. *Mutagenesis*. 2014; 29(6): 433-9.
71. Rathod SR, Raj A, Jadhav P, Sarda T. Assessment of cytogenic damage in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus subjects through micronucleus test. *Saudi J of Oral Sciences*. 2016; 3: 75–80.
72. Grindel A, Guggenberger B, Eichberger L, Pöppelmeyer C, Gschaidner M, Tosevska A, et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS One*. 2016; 11(9): 1–17.
73. Donmez-altuntas H, Sahin F, Bayram F, Bitgen N, Mert M, Guclu K, et al. Evaluation of chromosomal damage , cytostasis , cytotoxicity , oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014; 771: 30–6.
74. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. julho de 2007; 78(7 Suppl): 1387–99.
75. American Diabetes Association. 6. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019; 42 (Suppl. 1): S61–70.
76. Arboleda S, Vargas M, Losada S, Pinto A. Review of obesity and periodontitis: an epidemiological view. *Br Dent J*. 2019; 227(3): 235–9.

77. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985; 147(1–2): 29–36.
78. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2): 81-95.

APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (50/06).

Cento e quarenta pacientes foram selecionados dentre os que buscavam atendimento na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), de ambos os sexos, sem distinção de raça, e com idade mínima de 20 anos. Os pacientes receberam esclarecimento dos objetivos e puderam tirar quaisquer possíveis dúvidas da pesquisa. Dos 140 pacientes selecionados e que constituíam a amostra inicial, 103 completaram todos os dados do estudo e constituíram a amostra final. A diminuição da amostra ocorreu devido ao não comparecimento do paciente para a realização de um dos exames, pacientes descompensados e ausência de dados relacionados ao potencial mutagênico que ocorreu devido a problemas durante confecção das lâminas para o teste do micronúcleo e quantidade insuficiente de células para a contagem.

Os pacientes foram divididos conforme seus níveis glicêmicos e seu perfil periodontal nos seguintes grupos:

- Grupo A - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e sem periodontite (37 pacientes)
- Grupo B - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite (47 pacientes)
- Grupo C - Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite (19 pacientes)

A seguir estão citados os critérios de inclusão e exclusão referentes aos grupos A, B e C.

Grupo A

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: indivíduos acima de 20 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade oral e de qualquer grupo étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado). Sem

diabetes mellitus tipo 2 e sem presença de periodontite conforme descrito a seguir.

- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: pacientes com história de diabetes e periodontite, hepatite e infecção por HIV, com pré-medicação antibiótica ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias durante 3 meses, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Grupo B

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: indivíduos acima de 20 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade oral e de qualquer grupo étnico-racial. Com presença de periodontite (conforme descrito a seguir).
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: pacientes com história de diabetes, hepatite e infecção por HIV, com pré-medicação antibiótica ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias durante 3 meses, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Grupo C

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: indivíduos com DM2 acima de 20 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade oral e de qualquer grupo étnico-racial. Com presença de periodontite (conforme descrito a seguir).
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: indivíduos normoglicêmicos com história de hepatite e infecção por HIV, com anemia, com pré-medicação antibiótica ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias durante 3 meses, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Exame Periodontal

Como mencionado na seleção dos pacientes, todos os indivíduos foram submetidos a um exame periodontal completo e avaliados quanto ao seu

histórico médico. Os exames clínicos periodontais foram realizados com a utilização da sonda periodontal (tipo Williams - Trinity® – Campo Mourão, Paraná, Brazil), sendo obtidos os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, além de sangramento à sondagem.

Foi considerado nesse estudo:

- Índice de placa visível: 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: 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: distância da margem gengival à junção cimento-esmalte;
- Mensuração da profundidade de sondagem: 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: presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem;
- Avaliação do nível clínico de inserção: corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio de cada elemento dentário.

Após o exame periodontal, os indivíduos foram classificados em dois diferentes grupos, de acordo com os critérios definidos pela CDC/AAP (Centers for Disease Control and Prevention/ American Academy of Periodontology) ⁷⁴:

Grupo A: pacientes sem periodontite crônica (pacientes que não se enquadram nos critérios de periodontite severa ou moderada e sem manifestações de doenças sistêmicas) ⁷⁴;

Grupo B e C: pacientes com periodontite moderada (2 ou mais sítios com perda de inserção interproximal maior que 3mm em dentes diferentes ou pelo menos dois sítios com profundidade de sondagem maior que 4mm em dentes diferentes) ou periodontite severa (2 ou mais sítios com perda de inserção interproximal maior que 5mm em dentes diferentes e pelo menos um sítio com profundidade de sondagem maior que 4mm) ⁷⁴.

Exames Bioquímicos

Os pacientes foram encaminhados a um Laboratório de Análises Clínicas para coleta do sangue por punção venosa para realização dos exames: Hemograma (ABX Micros 60), Insulina (método quimioluminescência), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), Hemoglobina glicada - HbA1c (método de imunoensaio de inibição turbidimétrica) (Kit Roche), Triglicérides (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest) e Colesterol Total (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest). Foi utilizado o equipamento COBAS MIRA plus.

Os portadores de DM2 (grupo C) tiveram tal diagnóstico do médico que os acompanham, além de também ser considerado os resultados dos exames laboratoriais realizados de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA)(2019) ⁽¹⁷⁾. Para a HbA1c $\geq 7,1\%$. Os níveis estabelecidos acima de 7% estão associados com risco maior de complicações crônicas; 7% é definido como o limite superior do do valor aceitável para um paciente com diabetes bem controlado ⁷⁵. Os pacientes sem DM2 (grupos A e B) tiveram seus exames do perfil glicêmico verificados conforme o exame da HbA1c por ser a principal ferramenta para avaliar a medida indireta dos níveis médios da glicose no sangue evitando diagnósticos errôneos e a confirmação da ausência do diabetes, sendo considerado o resultado da HbA1c $\leq 6,4\%$ ¹⁷.

Foi calculado a resistência à insulina por meio da obtenção do índice Homa, utilizando a fórmula: $\text{Glicemia (mmol)} \times \text{Insulina (ui/ml)} \div 22,5$. Os valores foram obtidos em jejum e, devido à glicemia ter sido medida em mg/dl, para usar a fórmula citada, foi necessário obter o valor da glicemia em mmol/L, fazendo o cálculo: $\text{glicemia (mg/dL)} \times 0,0555$.

Índice de massa corporal

Para determinação do índice de massa corporal (IMC), os pacientes foram pesados em balança digital e altura medida com uso de fita métrica, com o paciente encostado em uma parede e descalço. Foi calculado com a fórmula $\text{IMC} = \frac{\text{peso}}{\text{altura}^2}$. A interpretação do IMC foi baseada na classificação elaborada pela Organização Mundial de Saúde: normais (18.5-24.9 kg/m²), sobrepeso (25.0-29.9 kg/m²), obesidade classe 1 (30.0-34.9 kg/m²), obesidade classe 2 (35.0-39.9 kg/m²), obesidade classe 3 (≥ 40 kg/m²) ⁷⁶.

Relação quadril-cintura

Para calcular a relação cintura-quadril, foi utilizada fita métrica para avaliar o tamanho da cintura, medido na parte mais estreita do abdome e o tamanho do quadril, que deve ser medido na parte mais larga do quadril. Em seguida, foi dividido o valor que se obteve do tamanho da cintura pelo tamanho do quadril.

Avaliação da Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) foi realizado em linfócitos do sangue periférico dos pacientes dos diferentes grupos. A metodologia do teste do micronúcleo foi realizada baseando-se no estudo de Fenech e Morley (1985) ⁷⁷.

Os linfócitos obtidos a partir de 5mL de sangue coletado em tubo com heparina foram cultivados em duplicata em 5mL meio de cultura completo constituído de 78% de meio RPMI 1640 (Sigma), 20% de soro bovino fetal

(Gibco) e 2% de fitohemaglutinina (Gibco), suplementado com antibióticos penicilina (0,005 mg/mL) e estreptomicina (0,01 mg/mL). O tempo total de cultivo foi de 72hs em estufa de CO₂ a 37°C sendo que, após 44h de cultivo, foi adicionado a cada cultura 6µg/mL de citocalasina B (Sigma) para a inibição da citocinese. As culturas voltaram à estufa por mais 28h até que foram completadas as 72h de cultivo.

Para a colheita das células em cultivo, as culturas foram centrifugadas por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento celular foi homogeneizado com 3mL de uma solução hipotônica de citrato de sódio (1%) gelada e imediatamente as células foram fixadas com 3mL de fixador metanol:ácido acético (3:1) e 4 gotas de formaldeído (37%). Esse material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o sedimento celular foi lavado mais uma vez em 5mL de fixador metanol:ácido acético (3:1). Após a última lavagem o material foi centrifugado e descartado o sobrenadante, ressuspensando em apenas 0,5mL de pellet de células. Essa suspensão celular foi gotejada sobre lâminas previamente limpas, o qual foram mantidas em água destilada gelada.

A coloração do material foi feita usando-se solução de Giemsa diluído em tampão Sörensen (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ a 0,06M, pH 6,8) na proporção 1:20 por 5 minutos, quando então as lâminas foram enxaguadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e armazenadas até o momento da análise. Após a coloração, foi determinado a frequência de micronúcleos (FMN), a frequência de células binucleadas com micronúcleos (FBMN), o índice de divisão nuclear (IDN), pontes nucleoplasmáticas (PN) e brotos avaliados em 1000 células binucleadas, de acordo com Fenech et al.⁷⁸. O NDI foi calculado marcando células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos usando a fórmula $NDI = M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4) / N$; onde, M1-M4 representa o número de células com 1-4 núcleos e N é o número total de células viáveis observadas (500 células).

Análise estatística dos dados

Os dados foram exportados do programa Microsoft Excel 2016 para o programa Stata 14.2 software (StataCorp, College Station, TX, USA). Análise estatística descritiva foi realizada utilizando frequência para variáveis categóricas e análise descritiva para variáveis contínuas. Regressão

multivariada de Poisson foi realizada utilizando a frequência de micronúcleos (FMN) ou a frequência de células binucleadas com micronúcleos (FBMN) como variáveis dependentes. As principais variáveis independentes utilizadas foram diagnóstico de periodontite (dicotomizado em sem periodontite ou com periodontite leve, e periodontite moderada ou severa) e medidas associadas ao diagnóstico ou controle do diabetes (valores do índice HOMA e de HbA1c). Os escores do índice HOMA foram divididos em tercís e essa variável foi dicotomizada (tercil mais alto versus dois tercís mais baixos). Portanto, de acordo com a distribuição dos dados, o ponto de corte do HOMA foi estabelecido em 4,0. As análises foram ajustadas para idade, colesterol total, triglicerídeos e fumo (dicotomizado em fumantes e nunca/ex-fumantes). Para explorar um possível efeito combinado entre diagnóstico de periodontite e os valores de HOMA ou HbA1c, um termo de interação foi incluído nas análises. Os valores foram estimados em razão de taxa (RT) com seus respectivos intervalos de confiança definidos em 95% (IC 95%).

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Certificado

Certificamos que o relatório final do projeto de pesquisa intitulado "*AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E O PERFIL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM PERIODONTITE CRÔNICA. ESTUDO CLÍNICO, IMUNOLÓGICO E GENÉTICO*", sob o protocolo nº **50/2006**, de responsabilidade do Pesquisador **RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA** está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 12/12/2012, publicada no DOU de 13/06/2013, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr-UNESP.

This is to certify that the final technical report of the research project entitled "*EVALUATION OF THE CORRELATION BETWEEN LIPID PEROXIDATION AND INFLAMMATORY MARKERS PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES AND CHRONIC PERIODONTITIS. A CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETIC STUDY*" protocol number **50/2006**, under **RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA** responsibility, is according with the Resolution 466/12 of National Health Council/Ministry of Health of December 12th of 2012, published on DOU in June 13th of 2013. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP.

Araraquara, 05 de dezembro de 2019.


Profª Dra. Andréia Gonçalves
Coordenadora

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo até 2 anos após a data defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de Março de 2020.

KBRP