



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

Avaliação do efeito do tratamento
periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros
clínicos e imunológicos em pacientes
portadores de Diabetes mellitus Tipo 2.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Periodontia da Faculdade de Odontologia de
Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título
de **DOUTOR** em Periodontia.

Orientadora: *Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico*

Co-Orientador: *Prof. Dr. Carlos Marcelo S. Figueredo*

ARARAQUARA
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

Avaliação do efeito do tratamento periodontal
não cirúrgico sobre parâmetros clínicos e
imunológicos em pacientes portadores de
Diabetes mellitus Tipo 2.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de **DOUTOR** em Periodontia.

Orientadora: *Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico*

Co-Orientador: *Prof. Dr. Carlos Marcelo S. Figueredo*

ARARAQUARA

2008

Corrêa, Fernanda de Oliveira Bello

Avaliação do efeito do tratamento periodontal em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. Estudo clínico e imunológico. / Fernanda de Oliveira Bello. – Araraquara : [s.n.], 2008.

94 f ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Marcelo S. Figueredo

1. Diabetes Mellitus tipo 2 2. Doenças periodontais – Terapia
3. Mediadores da inflamação 4 . Hemoglobina A glicosilada
5. Metabolismo dos lipídeos I. Título.

Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

Avaliação do efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico
sobre parâmetros clínicos e imunológicos em pacientes
portadores de Diabetes mellitus Tipo 2.

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA

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

2º Examinador: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'ana

3º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

4º Examinador: Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

Araraquara, 25 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

NASCIMENTO	03.01.1979 Ipatinga - MG
FILIAÇÃO	Gerson Corrêa Filho Maria Cândida de Oliveira Bello Corrêa
1997/2000	<i>Curso de Graduação em Odontologia</i> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP - Araraquara, São Paulo, Brasil.
2001/2002	<i>Especialização em Periodontia</i> Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas, APCD – Araraquara, São Paulo, Brasil.
2002/2004	<i>Pós-Graduação em Periodontia – Nível Mestrado</i> Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.
2002/2007	<i>Pós-Graduação em Periodontia – Nível Doutorado</i> Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Dedicatória

Ao meu marido Romeu

Meu amor, obrigada por todo imenso amor que tem por mim, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis, por entender minha ausência e sempre me incentivar a buscar um futuro melhor. Com você do meu lado todo obstáculo se torna mais fácil e a vitória muito mais agradável!

Aos meus pais Gerson e Cândida

Vocês sempre serão meus eternos orientadores da formação pessoal e profissional. Obrigada pelo apoio, incentivo e dedicação, não medindo esforços em todas as etapas de minha vida. Meu amor por vocês é incondicional!

As minhas irmãs Renata e Roberta, as minhas avós Tina e Cora e aos meus tios e primos

Mesmo com a distância, vocês sempre estiveram presentes em todas as conquistas de minha vida, torcendo e vibrando pela minha felicidade. Obrigada pela amizade, carinho, orações e apoio. Vocês são fundamentais em minha jornada.

Agradecimentos especiais

A Deus

Meu maior mestre, meu Senhor, minha vida. Agradeço pela força, luz e por estar sempre presente em meu coração.

À minha orientadora Silvana Regina Perez Orrico

Pela atenção, amizade, carinho, confiança e disponibilidade. Obrigada por possibilitar meu crescimento científico, acadêmico e pessoal durante todos esses anos de pós-graduação. Serei eternamente grata a você!

Ao meu co-orientador Carlos Marcelo da Silva Figueredo

Por oportunas sugestões, incentivo e competência. Você sabe que sem a sua colaboração esse trabalho não seria possível.

Ao meu orientador no exterior Anders Gustafsson

Um exemplo de pesquisador, atencioso, que me recebeu de portas abertas e que me mostrou uma grande virtude: a humildade. Não tenho palavras para agradecer essa experiência inesquecível.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa de sua Diretora Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio e seu Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segala, pelas condições para realização desta pesquisa.

À Coordenadora do curso de Pós-Graduação em Periodontia, Prof.^a Dr.^a Silvana Regina Perez Orrico, pela dedicação, competência e esforço empreendidos na realização deste curso.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: Dani Gonçalves, Silvana Orrico, Marcelo Figueredo, Anders Gustafsson por todos os momentos que passamos juntos. Essa vitória é nossa e, sem vocês, nada seria possível. Dani, não vou me esquecer jamais de todas as etapas que dividimos durante esses quatro anos, obrigada por tudo!

Aos pacientes que colaboraram com a pesquisa, disponibilizando seus tempos para as coletas e análises que com carinho compreenderam meu desafio e dividiram essa responsabilidade comigo.

As amigas Dani Zandim e Alliny por me ajudarem na realização da parte experimental desta pesquisa.

A professora Iracilda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que gentilmente disponibilizou a centrífuga refrigerada do laboratório de imunologia desta faculdade. Agradeço a todos deste laboratório que me receberam com todo carinho.

Aos docentes da disciplina de Periodontia e outras que se dedicaram às disciplinas durante curso de doutorado: Silvana Regina Perez Orrico, José Eduardo Cezar Sampaio, Rosimary Adriana Chiéríci Marcantonio, Élcio Marcantonio Júnior, Carlos Rossa Júnior, Joni Augusto Cirelli, Benedito Egbert Corrêa de Toledo e Ricardo Georges Abi Rached, Elaine Maria Sgavioli Massucato, Glória Maria Thompson, Miriam Aparecida Onofre, Luís Carlos Spolidorio, Denise Madalena Palomari Spolidorio, entre outros, pela excelente formação, competência, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos de doutorado no Brasil e doutorado sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro a este projeto.

Ao Karolinska Institutet, em Estocolmo-Suécia, em nome do Prof. Dr. Anders Gustafsson, por me permitir realizar este grande sonho. Obrigada por toda atenção e confiança.

Aos amigos do mestrado, doutorado e estagiários da UNESP: Romeu, Dani Gonçalves, Gaby, Vanessa, Roberto, Yeon, Bia, Dani Zandim, Rafaela, Alliny, Joseane, Miltom, Débora, Jú Ricco, Dani Spirandelli, Jú Moraes, Ishi, Andréa, Patrícia, Fernando, Ana Emília, Carla, Andrés, Aline, Marina, Rubens, Rafael Faeda, Fábio, Sabrina, Naná e Roberta o convívio com cada um de vocês me fez uma pessoa mais feliz!

Aos professores, amigos do doutorado, estagiários e funcionários do Karolinska Institute: Anders Gustafsson, Bjorn Kingle, Tulay, Fernanda Brito, Letícia Alvarenga, Albier Sofrata, Ai Kamiyama, Patrícia Palma, Farzeen Tawir, Tove Osslon, Fawad Javed, Talad, Kare, Kerstin Smeldberg, Karin, Caroline e Maha com vocês ao meu lado tudo se tornou mais agradável! Obrigada pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos Funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia: Regina Lúcia, Claudinha, Zezé, Dona Maria do Rosário, Dona Tereza, Sueli, Toninho e Telma pelo agradável convívio diário, dedicação e respeito.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial a Mara, pela dedicação, amizade e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP,
pela dedicação e gentileza em todos os momentos.

A minha Família Bello Corrêa e a minha nova Família Belon Fernandes sempre
presentes, apoiando, incentivando e torcendo por mim.

Às minhas amigas-irmãs: Andreza, Fer Lessa, Lícia, Yeon, Carol Gobbo, Aline, Lí
Guedes, Mônica, Ludy, Lilian, Mac Gaspar, Helô, Bianca, Tati Bello, Diana, Fer Brito e
tantas outras, umas bem pertinho, outras mais distantes, mas sempre me incentivando,
apoiando nos momentos difíceis, curtindo os momentos de alegria e tornando minha
vida muito mais feliz. Amo vocês!

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	20
3 MATERIAL E MÉTODO	21
Seleção da amostra	21
Exames laboratoriais	23
Exame clínico intra-bucal	24
Avaliação imunológica	27
Plano de tratamento	30
4 CAPÍTULOS	31
4.1 Capítulo 1 – Análise imunológica no fluido gengival	32
4.2 Capítulo 2 – Análise imunológica no plasma sanguíneo	54
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
6 CONCLUSÃO	80
7 REFERÊNCIAS	81
8 ANEXOS	92
8.1 Aprovação do Comitê de Ética	93
8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo diabetes	94
8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo controle	96

Corrêa FOB. Avaliação do efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros clínicos e imunológicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

RESUMO

Objetivos: dois estudos prospectivos comparativos de intervenção foram realizados para avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros clínicos periodontais e imunológicos do fluido sulcular gengival e do plasma sanguíneo de pacientes com periodontite crônica portadores ou não de Diabetes mellitus Tipo 2.

Material e Método: Vinte e três indivíduos com Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado e periodontite crônica (grupo diabetes) e 26 indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite crônica (grupo controle) foram avaliados quanto a parâmetros periodontais, marcadores inflamatórios do fluido sulcular gengival (interleucinas, metaloproteinases de matriz e atividade de elastase), marcadores inflamatórios no plasma sanguíneo (interleucinas, fator de necrose tumoral alfa, proteína C-reativa e fibrinogênio) e perfil lipídico, antes e após 3 meses do tratamento periodontal. Adicionalmente foi avaliada a influência do tratamento periodontal no controle glicêmico do grupo com diabetes. **Resultados:** houve redução significativa de todos os marcadores inflamatórios avaliados no fluido gengival, exceto a interleucina 18, após tratamento periodontal, associado a uma melhora da condição clínica periodontal em ambos os grupos. Sistemicamente, o grupo diabetes apresentou maiores níveis de proteína C reativa e triglicérides em ambos os períodos ao se comparar com o grupo controle. O tratamento periodontal foi efetivo em reduzir os níveis de TNF- α e fibrinogênio no grupo diabetes. Houve melhora no controle glicêmico embora não significativa. **Conclusão:** os resultados do presente estudo sugerem que os pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado apresentam boa resposta ao tratamento periodontal não-

cirúrgico, com redução de marcadores inflamatórios no fluido gengival. Entretanto, após 3 meses do tratamento periodontal, a influência deste na condição inflamatória sistêmica é limitada.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes mellitus Tipo 2; doenças periodontais/terapia; mediadores da inflamação; hemoglobina A glicosilada; metabolismo dos lipídeos.

Corrêa FOB. Evaluation of the effect of non-surgical periodontal treatment on clinical and immunological parameters in patients with type 2 diabetes [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

ABSTRACT

Objective: Two prospective comparative interventional studies were performed in order to evaluate the effect of non-surgical periodontal therapy on periodontal clinical and immunological parameters in gingival crevicular fluid (GCF) and plasma of patients with chronic periodontitis with or without type 2 Diabetes mellitus (T2DM). **Material and Method:** Twenty three individuals with inadequately controlled T2DM and chronic periodontitis (diabetes group) and 26 systemically healthy individuals with periodontitis (control group) were assessed for clinical parameters, inflammatory biomarkers in GCF (interleukins, matrix metalloproteinases and elastase activity), circulating markers of inflammation (interleukins, tumor necrosis factor alpha, C-reactive protein and fibrinogen and lipid profile before and 3 months after periodontal therapy. Additionally, the influence of periodontal treatment on glycemic control was evaluated in the diabetes group. **Results:** There was a significant reduction of all inflammatory biomarkers in GCF after therapy, except for interleukin 18 levels, and it was associated with improvement on periodontal status in both groups. Systemically, the diabetes group showed high levels of C-reactive protein and triglycerides compared with the control group in both periods. The periodontal therapy was effective in reducing TNF- α circulating and fibrinogen in the diabetes group. The treatment did not change the glycemic control significantly. **Conclusion:** The results of the present study suggest that patients with inadequately controlled T2DM present a good response to non-surgical periodontal treatment, with reduction of inflammatory biomarkers in GCF. However, 3 months after therapy, its influence on systemic inflammatory condition is limited.

KEYWORDS: Type 2 Diabetes mellitus; periodontal diseases/therapy; inflammation mediators; glycosylated hemoglobin A; lipid metabolism.

INTRODUÇÃO

O diabetes constitui uma epidemia global emergente. Existe no mundo inteiro 180 milhões de indivíduos portadores de diabetes já diagnosticados, sendo que no Brasil estima-se que 12% (20 milhões) da população apresente diabetes¹³.

Diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeito na secreção da insulina, na ação da insulina ou em ambos. A hiperglicemia crônica no diabetes está associada a alterações a longo prazo, como disfunção e falha em vários órgãos, especialmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos⁷.

O Diabetes mellitus Tipo 2 é a categoria mais prevalente, acometendo aproximadamente 90 a 95% dos portadores de Diabetes mellitus, os quais apresentam resistência celular à ação da insulina com relativa deficiência na secreção da mesma. O risco para o desenvolvimento do Diabetes mellitus tipo 2 aumenta com a idade, obesidade e sedentarismo⁷.

O diagnóstico é realizado baseado na história médica, exame clínico e exames laboratoriais, como o exame de glicemia de jejum ($\geq 126\text{mg/dL}$) ou o teste de tolerância oral à glicose ($\geq 200\text{mg/dL}$), em dois momentos distintos⁷.

A condição metabólica peculiar dos pacientes com diabetes é a elevação da glicemia com conseqüente formação de substâncias denominadas produtos finais da glicação avançada (AGEs). Ambos, macrófagos e células endoteliais, apresentam receptores específicos para AGEs denominados RAGEs⁵⁸. A interação entre eles ativa mecanismos e sinais intracelulares como o aumento de estresse oxidativo, aumento da permeabilidade vascular, maior secreção de fatores de adesão celular e estímulo à secreção de citocinas inflamatórias⁸¹. Esta pode ser, portanto, uma hipótese válida

para explicar o porquê dos pacientes portadores de diabetes apresentarem maior severidade na expressão da doença periodontal.

A periodontite é um problema comum nos pacientes com diabetes⁵³. Ambas as doenças, Diabetes mellitus e doença periodontal, podem estimular um aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias, que podem apresentar um efeito deletério nos tecidos periodontais⁵⁴. A inter-relação entre a periodontite e o Diabetes mellitus tem sido descrita como bi-direcional. Indivíduos com Diabetes mellitus apresentam aumento da extensão e severidade da periodontite^{12,50,52,59,62,68-70,72} e a doença periodontal pode adversamente afetar o controle metabólico do diabetes^{34,53,66,73,79}.

Nos últimos anos, métodos avançados para avaliação do controle metabólico do Diabetes mellitus, avaliação da condição periodontal, dos fatores de risco microbiológicos e indicadores de risco no fluido sulcular gengival têm gerado novas informações para elucidar a inter-relação entre Diabetes mellitus e doença periodontal⁶⁰.

A etiologia da destruição dos tecidos periodontais é, primariamente, atribuída à interação de antígenos bacterianos e células inflamatórias resultando na produção de citocinas inflamatórias, como interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) identificadas no fluido sulcular gengival^{27,29,35,65,70}.

A produção excessiva dessas citocinas inflamatórias durante o combate a infecção periodontal pode provocar dano tecidual. A IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória que induz à reabsorção óssea e também desempenha função como mediadora de destruição do tecido mole, estimulando a síntese de prostaglandina e induzindo a atividade da collagenase e outras proteases¹¹. Indivíduos com Diabetes mellitus e periodontite apresentam maior quantidade de IL-1 β no fluido sulcular gengival do que indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite^{11,17,49,68} sendo

que o pobre controle metabólico do Diabetes mellitus está associado a elevados níveis dessa citocina²².

A interleucina 18 (IL-18) é outra importante citocina pró-inflamatória expressada por macrófagos/monócitos. Ela pode induzir ambas as repostas imunes (T helper 1 ou T helper 2) dependendo do contexto imunológico. Embora altos níveis de IL-18 tenham sido encontrados em GCF de pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite⁶¹, não há estudos avaliando o possível papel desta citocina na inflamação periodontal em indivíduos com Diabetes mellitus Tipo 2.

O papel dos neutrófilos nos indivíduos com Diabetes mellitus e periodontite é controverso. Embora a quimiotaxia e a fagocitose estejam frequentemente alterados⁴⁶, o que pode inibir a morte bacteriana nas bolsas periodontais e consequentemente aumentar o risco de destruição tecidual, uma correlação positiva entre a atividade de elastase e profundidade de sondagem, perda de inserção e índice gengival em pacientes com Diabetes mellitus (Tipo 1 e 2) foi reportada⁵. Elastase é uma das mais importantes enzimas dos grânulos primários de neutrófilos humanos e é um bom marcador de degranulação destas células⁴.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) também estão envolvidas no processo patológico da periodontite. Elevados níveis de MMPs ativadas podem provocar um desequilíbrio entre a produção e a degradação de colágeno, causando perda de inserção periodontal²⁰. Um estudo prévio⁴⁸ reportou aumento dos níveis de MMP-8 e -9 em biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite e Diabetes mellitus comparados com pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite.

Em relação ao efeito do tratamento periodontal, os estudos que avaliaram indivíduos com Diabetes mellitus e controles saudáveis evidenciaram resultados clínicos semelhantes nos dois grupos. Entretanto, alguns estudos estão associados a indivíduos com bom controle metabólico^{15,57} ou não relatam o grau de controle da doença^{78,82}. Faria-Almeida et al.²³ (2006) ao comparar a resposta ao tratamento

periodontal convencional em pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2 e sem diabetes, observaram melhora nos parâmetros clínicos avaliados, com exceção da profundidade de sondagem que foi significativamente maior no grupo diabetes antes e após o tratamento.

Já estudos que avaliaram a resposta ao tratamento periodontal em amostras exclusivamente de indivíduos com Diabetes mellitus demonstraram que a terapia periodontal não-cirúrgica isoladamente^{3,45,50,71,75} ou em associação com o uso de antibióticos^{39,63,66} é eficaz na melhora dos parâmetros clínicos, particularmente relacionados à redução da inflamação.

Em relação ao possível impacto do tratamento periodontal nos níveis de IL-1 β no GCF, um estudo recente⁵⁷ reportou que pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2 apresentaram redução significativa na concentração de IL-1 β no fluido gengival sulcular após 3 e 6 meses do tratamento periodontal não cirúrgico, sem diferença com os níveis de redução alcançados para grupo sem diabetes.

Com relação à terapia de manutenção, Westfelt et al.⁸² (1996) avaliaram clinicamente o efeito do tratamento periodontal em pacientes com diabetes sob terapia de manutenção meticulosa durante cinco anos. Eles reportaram que a recorrência da doença periodontal ocorreu de forma similar, com baixa prevalência, em ambos os grupos (controle e diabetes) após cinco anos, concluindo que os pacientes com diabetes são capazes de manter as condições de saúde periodontal por longo período de tempo.

Numerosos estudos^{9,22,51,67,77} têm demonstrado correlação positiva entre pobre controle metabólico em pacientes com Diabetes mellitus tipo 2 e maior severidade da periodontite. Entretanto, a relação oposta, isto é, que a periodontite afeta a condição sistêmica e o controle metabólico nos indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2, apresenta dados limitados.

A periodontite influencia sistemicamente, pela disseminação de mediadores como a proteína C-reativa, IL-6 e TNF- α ^{30,47}. Desta forma, a resposta do organismo pode ser ativada por uma infecção local, por processo inflamatório dos tecidos periodontais ou por disseminação sistêmica de bactérias, suas toxinas ou produtos, presentes durante o curso natural da doença periodontal. Salienta-se que a exposição crônica a endotoxinas e citocinas, associada com infecções em pacientes portadores de Diabetes mellitus, pode complicar o controle metabólico desses pacientes³⁴.

Entretanto, os resultados de estudos que avaliaram a influência da doença periodontal no controle metabólico do Diabetes mellitus Tipo 2 são conflitantes. Alguns estudos constataram que o controle da infecção periodontal melhora significativamente o controle glicêmico^{3,33,39,45,57,66,73} enquanto outros não demonstraram tal efeito^{15,40,42,82}.

Christgau et al.¹⁶ (1998) desenvolveram um estudo clínico, microbiológico (cultura) e imunológico (TNF- α e função de neutrófilos polimorfonucleares) para avaliar o efeito sistêmico da terapia periodontal não-cirúrgica realizada em pacientes com Diabetes mellitus mellitus (Tipos 1 e 2). Estes concluíram que a inflamação periodontal apresentou mínima influência nos dados sistêmicos (HbA_{1c}, proteína C-reativa, triglicérides, fibrinogênio, colesterol, creatinina e leucócitos) e que pacientes com bom controle metabólico podem responder ao tratamento periodontal básico de forma similar aos pacientes sistemicamente saudáveis.

Kiran et al.⁴⁵ (2005) avaliaram o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica sobre o perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, HDL, LDL) de pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2, com bom ou moderado controle metabólico. Esses autores concluíram que, após três meses da terapia periodontal, houve mínima alteração no perfil lipídico desses pacientes, sem melhora significativa para todos os parâmetros. Apesar disso, a terapia periodontal foi efetiva na melhora dos parâmetros clínicos e na redução da concentração de hemoglobina glicada A1c nesses pacientes.

Talbert et al.⁷⁵ (2006) reportaram que após três meses do tratamento periodontal não-cirúrgico, houve melhora na condição clínica periodontal nos pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2 apesar dos níveis sistêmicos de IL-6 e TNF- α não terem reduzido significativamente. Em contraste, Iwamoto et al.³⁹ (2001) observaram redução significativa dos níveis de TNF- α circulantes em indivíduos portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 submetidos ao tratamento periodontal associado com terapia antimicrobiana local.

Lalla et al.⁵⁰ (2007) realizaram um estudo de intervenção em 10 pacientes com Diabetes mellitus (7 pacientes Tipo 1 e 3 pacientes Tipo 2) para avaliação do efeito do tratamento periodontal sobre níveis séricos de numerosas citocinas e mediadores envolvidos na patogênese de doenças vasculares. Os autores observaram que após um mês da terapia periodontal somente os níveis de proteína C-reativa reduziu significativamente nos indivíduos com diabetes.

Em virtude do exposto acima e uma vez que muitos estudos clínicos^{15,39,71,78,82} avaliaram o efeito do tratamento periodontal em indivíduos com Diabetes mellitus compensado metabolicamente ou não relatam o grau de controle glicêmico desses pacientes, portanto o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre parâmetros clínicos e imunológicos em indivíduos portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com inadequado controle metabólico.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar:

1. O efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre os parâmetros clínicos e marcadores inflamatórios do fluido sulcular gengival de pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado e pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.
2. O efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico sobre marcadores inflamatórios do plasma sanguíneo, o perfil lipídico e o controle glicêmico de pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado e pacientes sistemicamente saudáveis, ambos com periodontite crônica.

MATERIAL E MÉTODO

Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (nº 60/04, em anexo).

Seleção da amostra

Aproximadamente 500 pacientes foram submetidos à anamnese para inclusão ou não na amostra deste estudo. Dentre estes, 160 pacientes não portadores de Diabetes mellitus e 180 pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 foram submetidos a triagem clínica. Destes, apenas 49 pacientes (26 sistemicamente saudáveis e 23 portadores de Diabetes mellitus) preencheram os critérios necessários para serem incluídos na amostra. Os indivíduos foram selecionados no período compreendido entre julho de 2005 e dezembro de 2006.

Critérios gerais de inclusão:

- Ambos os sexos;
- Idade de 30 a 60 anos;
- Presença de, no mínimo, 15 dentes;
- Portadores de periodontite crônica moderada ou severa, generalizada⁶;

Critérios gerais de exclusão:

- Uso de antibiótico nos últimos seis meses;
- Gravidez, lactação ou uso contínuo de qualquer forma de hormônio;
- Fumantes ou ex fumantes que interromperam o hábito por um período inferior a 5 anos;
- Tratamento periodontal nos últimos 12 meses

Portanto, a partir desses critérios gerais, os pacientes foram divididos em dois grupos distintos que apresentaram critérios específicos de inclusão:

GRUPO DIABETES - 23 pacientes portadores de Diabetes mellitus mellitus Tipo 2⁷ com controle metabólico inadequado e presença de periodontite crônica⁶.

Foi considerado um controle metabólico inadequado, indivíduos que apresentaram exame de hemoglobina glicada A1c (HbA1c) > 7%, justificando que, como 6% é considerado o limite superior para um paciente com Diabetes mellitus bem controlado^{19,80}, 1% acima deste valor diminuiria os riscos deste paciente estar em estado de alteração metabólica transitória.

Esses pacientes foram avaliados quanto à história pregressa do Diabetes mellitus mellitus (tempo de diagnóstico, uso de medicamentos, controle da dieta e presença de complicações) por meio de ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes. Além disso, os pacientes deveriam apresentar autorização por escrito do endocrinologista responsável para serem submetidos ao exame clínico periodontal. Aqueles que necessitassem de antibioticoterapia profilática foram excluídos do estudo.

GRUPO CONTROLE - 26 pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite crônica⁶.

Esses indivíduos não poderiam apresentar nenhuma doença sistêmica grave e fazer uso de qualquer medicação diária que pudesse apresentar efeito colateral na cavidade bucal.

Para certificar que esses pacientes não eram portadores de Diabetes mellitus foi solicitado o exame de glicemia de jejum que deveria apresentar resultado inferior a 110mg/dl, para posterior realização do exame clínico periodontal. Portanto, foram excluídos também os pacientes que apresentaram glicemia de jejum compatível com estados pré-diabéticos (≥ 110 e < 126 mg/dl).

Todos os pacientes confirmaram sua aceitação para participar do estudo mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elaborado distintamente para cada grupo específico (em anexo).

Exames laboratoriais

Foram solicitados, no *baseline* e após três meses do tratamento periodontal não-cirúrgico, os seguintes exames para o grupo diabetes:

1) Glicemia de jejum (mg/dL), determinada pelo método de glicose oxidada (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

2) Hemoglobina glicada A1c (%), realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sistema DIASTAT® (DiaSTAT Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). (Certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* -NGSP).

3) Proteína C-reativa ultra-sensível (mg/L), determinada através de Kit comercialmente disponível (N High sensitive CRP, DADE, Behring AG, Marburg, Germany) com uso de analisador nefelometro (Behring AG, Diagnostica, Marburg, Germany).

4) Fibrinogênio (mg/dL), realizado pelo método de Clauss, com uso de Kit comercialmente disponível (Wiener Laboratorios A.S.I.C., Rosário, Argentina)

6) Colesterol Total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides (mmol/L), utilizando procedimentos químicos standardizados (Roche AG Diagnostics, Mannheim, Germany).

Para o grupo controle, nos mesmos intervalos de tempo que para o grupo diabetes, foram solicitados os seguintes exames:

1) Proteína C-reativa ultra-sensível

2) Fibrinogênio

3) Colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides.

Exame clínico intra-bucal

Todos os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado (Kappa ponderado =0,93).

O exame periodontal completo consistiu de índice de placa visível, índice de sangramento marginal, sangramento à sondagem, mensuração da profundidade de sondagem, posição da margem gengival e nível clínico de inserção. Além disso, foram realizados os exames radiográficos de boca toda como método auxiliar no diagnóstico da doença periodontal.

Índice de placa visível: presença ou não de placa bacteriana visível a olho nú, após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes¹.

Índice de sangramento marginal: presença ou ausência de sangramento marginal verificado após inserção de uma sonda periodontal milimetrada no sulco gengival, com inclinação de 60 graus em relação ao dente, percorrendo o espaço do sulco de uma proximal a outra, em todas as faces de todos os dentes¹.

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, mensurada 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.

Em seguida, foram realizadas radiografias periapicais de boca toda de todos os pacientes como método auxiliar no diagnóstico e tratamento das doenças periodontais.

Coleta das amostras do fluido sulcular gengival

Foram selecionados, para ambos os grupos, 5 a 6 sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm e com sangramento à sondagem (sítios profundos) e 5 a 6 sítios com profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm e com sangramento à sondagem (sítios rasos), em dentes diferentes, não-adjacentes.

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

O fluido sulcular estagnado foi coletado com a introdução de um filtro especial para fluido gengival (*Periopaper*® - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) mantido durante 30 segundos nos sítios selecionados, sendo descartada a amostra contaminada com sangue. Posteriormente, o volume de fluido foi quantificado utilizando-se um equipamento específico para esta metodologia (*Periotron 8000*® - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA).

As tiras contendo o fluido de sítios com as mesmas características de cada paciente foram acondicionadas em um único tubo de *eppendorf* contendo 1ml de solução de PBS (phosphate-buffered saline). Após a coleta, as tiras de *Periopaper* permaneceram nos tubos de *eppendorfs* por 40 minutos, à temperatura ambiente, para posterior remoção das mesmas e centrifugação dos *eppendorfs* a 3000 giros por 5

minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em novo *ependorf* estéril e congelado em freezer a -70°C.

Essas amostras foram utilizadas para avaliação da quantidade de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8), metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) e atividade de elastase no fluido sulcular matriz gengival.

Coleta das amostras do plasma sanguíneo

Foram coletados 5 ml de sangue de todos os pacientes, e acondicionados em tubo a vácuo contendo EDTA. As amostras de sangue total foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos a 4° C para separação do plasma sanguíneo, que foi armazenado em tubos *ependorfs* codificados e congelados em freezer a -70°C para posterior mensuração dos níveis de interleucina 1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

Avaliação imunológica

- **IL-1 β e IL-18 no fluido sulcular gengival**

A IL-18 foi mensurada pela técnica de imunoensaio ultra-sensível (ELISA) com uso de kit comercialmente disponível (MBL, Nagoya, Japan), de acordo com as normas do fabricante. A IL-1 β foi mensurada pela técnica ELISA descrita previamente por Figueredo et al.²⁵ (1999). Resumidamente, um anticorpo monoclonal diluído 125 vezes em tampão carbonato foi pipetado em todos os poços da placa e incubado durante uma noite a 4°C. As placas foram lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS) e bloqueadas com soro de albumina humana (HSA) a 1% por uma hora, em temperatura ambiente. Após quatro lavagens, a curva padrão (IL-1 β :12 pg/ml a 200 pg/ml e IL-18: zero a 1000 pg/ml) e as amostras sem diluição (100 μ l) foram adicionadas nos respectivos poços das placas. As placas foram incubadas a 37° C, com agitação, por 45 minutos e então lavadas novamente por quatro vezes. O

anticorpo de detecção, um anticorpo policlonal conjugado à biotina, diluído 250 vezes, foi adicionado, e nova incubação a 37° C, com agitação, por 45 minutos foi realizada. Após lavagem, um conjugado com estreptoavidina-peroxidase, diluído 200 vezes em PBS e associado a 0.1% de HSA, foi adicionado às placas para posterior incubação. As placas foram novamente lavadas e um substrato sem diluição foi adicionado. A reação foi finalizada com ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄) após 15 minutos. Para ambas as citocinas a absorbância foi lida a 450nm em um espectrofotômetro (Millenia Kinetic Analyzer, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). A quantidade total foi expressa em pg, e a concentração, quantidade total sobre volume de fluido sulcular gengival coletado, foi expressa em pg/μl.

- **MMP-8 e MMP-9 no fluido sulcular gengival**

Metaloproteinases de matriz 8 e 9 foram mensuradas pela tecnologia Luminex, utilizando um anticorpo e um recombinante proteico para MMP-8 e -9 do sistema Bio-Plex (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As amostras do fluido gengival foram diluídas 20 vezes. Uma mistura das micropartículas diluídas (50μl), a curva padrão (50μl) e as amostras do fluido gengival diluídas 20 vezes (50μl) foram pipetadas nos respectivos poços da placa e incubadas por 2 horas. Após a lavagem, um coquetel específico de anticorpos conjugado à biotina (50μl) foi adicionado e incubado por mais uma hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, um conjugado estreptoavidina-ficoeritrina (50μl) foi adicionado, incubado por 30 minutos e as micropartículas foram suspensas em solução tampão. Os resultados foram calculados através de software analisador de imagens (Bio-Plex Manager Software®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). A quantidade total de MMP-8 e -9 foi expressa em pg e a concentração em pg/μl.

- **Atividade de elastase no fluido sulcular gengival**

Cem microlitros (μl) de cada amostra foram misturados em 67 μl de substrato de elastase S-2484 (L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroaniline, MW 445.5 Da) em cada poço da placa. A mistura foi incubada por 5 horas, a 37° C, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 405 nm (Millenia Kinetic Analyzer, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). A atividade de elastase foi expressa em absorbância total (Abs) e em concentração (Abs/ μl).

- **IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α no plasma sanguíneo**

As concentrações plasmáticas de interleucinas 1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram avaliadas utilizando-se a Tecnologia Luminex, seguindo as orientações dos fabricantes. Micropartículas diluídas (50 μL), curva padrão (50 μL) e amostras do plasma sem diluição (50 μL) foram pipetadas nos poços da placa e incubadas por duas horas. Após três lavagens, um coquetel de anticorpos conjugado à biotina (50 μL) foi adicionado e incubado por uma hora à temperatura ambiente. Após outra lavagem, o conjugado estreptoavidina-ficoeritrina (50 μL) foi finalmente adicionado, incubado por 30 minutos e as micropartículas foram suspensas em solução tampão. A análise dos dados foi realizada com software Bio-Plex Manager[®] (Bio-Rad laboratories, Hercules, California) utilizando o analisador Luminex. Utiliza dois lasers, um laser é micropartícula-específica (qualitativo) e o outro laser determina a magnitude do sinal derivado da ficoeritrina (quantitativo). Todos os marcadores foram mensurados por um mesmo kit comercialmente disponível de alta sensibilidade para citocinas em humanos (Linco Research Inc, St Charles, Missouri, USA), seguindo as orientações do fabricante. A concentração mínima detectável variou entre os marcadores avaliados. Os valores foram: IL-1 β – 0,06 pg/mL; IL-4 – 0,13 pg/mL; IL-6 – 0,10 pg/mL; IL-8 – 0,11 pg/mL; IL-10 – 0,15 pg/mL; e TNF- α – 0,05 pg/mL.

Plano de tratamento

Após todas as coletas iniciais (fluido sulcular gengival e plasma sanguíneo), dois pesquisadores especializados e treinados realizaram o tratamento periodontal básico de boca toda em todos os indivíduos. O tratamento consistiu de raspagem e alisamento radicular, instruções de higiene bucal, motivação do paciente e controle da placa bacteriana. O número de sessões necessárias para realização do mesmo foi ditado de acordo com a necessidade individual de cada paciente, mas teve como duração média quatro sessões (de sessenta minutos em duas semanas).

Finalizado o tratamento periodontal, passou-se à fase de acompanhamento por três meses. Os retornos foram rigorosamente marcados a cada quinze dias para remoção da placa supragengival e reforço da instrução de higiene bucal, com sedimentação da importância do controle da placa bacteriana.

Após os três meses, todos os pacientes foram reavaliados clinicamente, incluindo todas as variáveis do exame inicial e novas coletas de fluido sulcular gengival e plasma sanguíneo foram executadas para a avaliação do efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico.

CAPÍTULOS

Capítulo 1 – Avaliação do efeito do tratamento periodontal nos dados clínicos e imunológicos no fluido sulcular gengival.

The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of IL-1 β and proteases in gingival crevicular fluid from type 2 diabetes patients with chronic periodontitis.

Artigo enviado para publicação no *Journal of Periodontology* (março/2008).

.

The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of IL-1 β and proteases in gingival crevicular fluid from type 2 diabetes patients with chronic periodontitis

Fernanda O B Correa, MS^{*†}; Daniela Gonçalves, MS^{*}; Carlos M S Figueredo, PhD^{*‡}; Anders Gustafsson, PhD[†] and Silvana R P Orrico, PhD^{*}

^{*}School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University, Araraquara, Brazil.

[†] Institute of Odontology, Division of Periodontology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

[‡]School of Dentistry, Department of Periodontology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.

Mailing address:

Silvana Regina Perez Orrico

Dept. of Diagnosis and Surgery, Araraquara School of Dentistry -UNESP.

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brazil.

ZIP CODE: 14801-903

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

e-mail: s-orrico@foar.unesp.br (Fax and email can be published)

Sources of support: Funding for this project was provided by the Coordination for Postgraduate Courses in Higher Education (CAPES; n. 0948/06-3) and by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP; n. 04/08142-0), Brazil.

Number of figure: 0

Number of tables: 3

Running title: Periodontal treatment and GCF biomarkers in diabetics.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the effectiveness of non-surgical periodontal treatment in improving periodontal status and reducing levels of IL-1 β , IL-18, MMP-8, MMP-9 and elastase in gingival crevicular fluid (GCF) from type 2 diabetes (T2DM) patients with chronic periodontitis.

Material and Methods: Twenty three T2DM patients (diabetes group) and 26 systemically healthy subjects (control group) having chronic periodontitis participated on this study. The clinical examination included: visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP). GCF samples were collected from the 5-6 deepest sites in order to evaluate the levels of IL-1 β , IL-18, elastase activity, MMP-8 and MMP-9. Shallow sites were analyzed for IL-1 β and elastase. The glycemic control was analyzed by the concentration of glycated hemoglobin (HbA1c). The subjects received non-surgical periodontal treatment and were reexamined 90 days later.

Results: All clinical parameters showed a significant improvement after treatment ($P \leq 0.05$), which was accompanied by a significant reduction in the values of elastase activity, IL-1 β , MMP-8 and MMP-9 in deep pockets. The total amount of IL-18 at three months was close to the baseline levels regardless the group. The shallow pockets also presented significant reduction in the levels of IL-1 β and elastase. Treatment did not significantly reduce HbA1c concentrations in T2DM patients.

Conclusions: Non-surgical periodontal treatment was effective to reduce the levels of IL-1 β , elastase activity, MMP-8 and MMP-9 in GCF from T2DM patients. This reduction was associated with the improvement of the clinical periodontal status.

Key words: clinical trial; type 2 diabetes mellitus; non-surgical periodontal treatment; inflammatory mediators; glycemic control; glycated hemoglobin (HbA1c).

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disorder characterized by a destruction of periodontal tissues with a subsequent loss of attachment. This tissue destruction is caused by free oxygen radicals and active proteases¹ released during the interaction between bacteria and the hosts immune response.²

There is strong evidence that periodontitis is more severe in adults with diabetes.³⁻⁸ The reasons for the greater attachment loss in subjects with diabetes are not well elucidated. The effect of host-derived neutrophil elastase has been strongly associated with tissue destruction in periodontitis.⁹⁻¹² The role of neutrophils in diabetes-related periodontitis is controversial. Although neutrophil chemotaxis and phagocytosis have been suggested to be impaired,¹³ a positive correlation of elastase activity with probing depth, attachment loss and gingival index in both types 1 and 2 diabetes groups have been shown.¹⁴

Besides neutrophil elastase, high levels of MMPs in periodontal tissues might cause tooth attachment loss by provoking an imbalance between the production and degradation of collagen.¹⁵ Recently, Safkan-Seppälä et al.¹⁶ reported that collagenases in GCF might mediate the periodontal tissue destruction in poorly controlled diabetes patients. Individuals with diabetes and periodontitis express high levels of MMP-8 in GCF¹⁷, in saliva¹⁸ and in the gingival tissue.¹⁹ However, there is no study analyzing the impact of periodontal treatment in the GCF levels of MMP-8 in diabetes patients.

A hyper responsiveness of macrophages/monocytes has been reported in patients with diabetes and chronic periodontitis, and it might result in a significantly increased

production of pro-inflammatory cytokines^{4,20} Interleukin-1 β (IL-1 β), a potent pro-inflammatory cytokine, is involved in the destructive process of periodontitis.²¹⁻²² Subjects with diabetes mellitus present higher amounts of GCF IL-1 β than healthy ones^{4,23} and poor glycemic control in these patients is associated with elevated GCF IL-1 β .²⁰ Interleukin-18 (IL-18) is another important pro-inflammatory cytokine expressed by macrophages/monocytes. It can induce both T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) immune responses depending on the immunologic context. Although, high levels of IL-18 have been found in the GCF of systemically healthy patients with periodontitis²⁴ there is a lack of information about the possible role of IL-18 in periodontal inflammation in diabetic patients.

Therefore, the aim of this study was to investigate the short-term effectiveness of non-surgical periodontal treatment in improving periodontal status and reducing GCF levels of elastase activity, IL-1 β , IL-18, MMP-8 and MMP-9 in T2DM patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The diabetes group was comprised of 23 subjects with T2DM,²⁵ 9 males and 14 females, mean age 47.5 (SD $\pm$ 7.2) years and mean diabetes duration of 9.96 (SD $\pm$ 6.78) years. These subjects were treated by diet alone (n=1), oral hypoglycemic agents (n=11), insulin (n=5) or combination of oral hypoglycemic agents and insulin (n=6). They were under supervision of an endocrinologist, with no alteration in the diabetes treatment in the last year prior to the study and were authorized by their physician to undergo periodontal therapy. Twenty six systemically health subjects, 14 males and 12 females, mean age of 41.6 (SD $\pm$ 7.1) years, were used as controls. The subjects

enrolled on this study were recruited from the Clinic of Periodontics for Diabetic Patients of the Department of Diagnosis and Surgery of the School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Brazil, between January 2005 and October 2006.

All participants had a diagnosis of chronic periodontitis.²⁶ They had at least fifteen teeth (excluding third molars), and were non-smokers or former smokers for at least five years. Each subject should have at least 5 teeth with one or more sites with probing depth (PD) $\geq$ 5 mm, clinical attachment level (CAL) $\geq$ 4mm, visible plaque and bleeding on probing (BOP). Subjects with previous periodontal treatment in the preceding year or using antimicrobial therapy within the last six months were excluded.

This study was conducted in full accordance with the applicable ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki, and was independently reviewed and approved by the Ethics in Human Research Committees of the School of Dentistry (UNESP, Araraquara, Brazil) (Protocol number 60/04) and Huddinge Hospital (Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden). All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and gave their written consent to participate.

Clinical periodontal examination

All participants were submitted to clinical periodontal examination by a trained and calibrated examiner ($\kappa=0.93$, data not shown), using a University of North Carolina probe^{*}, in six sites per tooth in all teeth, excluding third molars. The following periodontal parameters were evaluated: the visible plaque index (VPI),²⁷ gingival bleeding index (GBI),²⁷ probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and

bleeding on probing (BOP). Clinical examinations were taken at baseline (BL) and ninety days after non-surgical periodontal treatment (90 AT).

GCF samples

GCF was sampled from 5-6 deepest pockets sites ($PD \geq 5\text{mm}$) and 5-6 shallow ones ($PD \leq 3\text{mm}$) from each subject at baseline and at 90 AT. Teeth were air-dried and isolated with cotton rolls, supragingival plaque was gently removed, and CGF was sampled with paper strips[†] for 30 seconds. The volume were measured with a calibrated Periotron 8000.[‡] Strips with blood marks were discarded. All samples from the same site category in each subject were pooled together in an eppendorf containing 1 ml of phosphate buffered saline (PBS). After elution for 40 minutes at room temperature, the sample was centrifuged at 3000g for 10 minutes and the supernatant was collected and frozen at -70°C pending analysis.

IL-1 β and IL-18 assays

IL-18 was measured in the GCF by commercially available ELISA kit[§] according to the manufacturer's instructions. IL-1 β was measured in GCF by an ELISA technique previously described.²¹ Briefly, a monoclonal antibody to IL-1 β was coated onto microtiter plates overnight at 4°C . The plates were washed and blocked with human serum albumin. After four washings, standard and undiluted samples were added to the plates. After another washing, the detection antibody, a biotinylated polyclonal goat antibody, was incubated. Horseradish peroxidase conjugated streptavidin was added to the plates and incubated the same way as the detection antibody. Finally, the plates were once again washed and the undiluted substrate added. The reaction was stopped with 1M sulfuric acid (H_2SO_4) after 15 minutes. For both cytokines the

absorbency was read at 450 nm in the spectrophotometer.^{||} The amounts were expressed as pg and the concentrations as pg/ μ L.

MMP-8 (collagenase-2) and MMP-9 (gelatinase-B) assays

Metalloproteinases concentrations were measured by Luminex technology using an antibody pair, and recombinant MMP-8 and MMP-9 proteins from R&D Systems.[¶] GCF samples were diluted 20 times. The diluted microparticle preparation (50 μ l), standards (50 μ l) and samples (50 μ l) were pipetted into wells and incubated for 2 hours. After three washings, the specific cocktail of biotinylated antibodies (50 μ l) was added and incubated for another hour at room temperature. After washing again, streptavidin-phycoerythrin conjugate (50 μ l) was finally added, incubated for 30 mins and the microparticles resuspended in buffer. The samples were analyzed with a Luminex analyzer and the results were calculated by the Bio-Plex Manager Software.[#] The amounts were expressed as picogram (pg) and the concentrations as pg/ μ L.

Elastase activity assay

One hundred μ l of sample was mixed with 67 μ l of the granulocyte elastase substrate S-2484 (L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroaniline, MW 445.5 Da)^{**} on 96-well microtiter plates. The mixture was incubated at 37°C, and the absorbency was read after 5 hours in the spectrophotometer^{||} at wavelength of 405 nm. The elastase activity was expressed as total absorbance (Abs), and concentration of absorbance (Abs/ μ L).

Glycemic control

The glycemic control was evaluated by the concentration of glycated hemoglobin A1c (% HbA1c) using high-performance liquid chromatography.^{††} This

analysis was performed at baseline, immediately before the treatment start, and 3 months after non-surgical periodontal therapy.

Periodontal treatment

After all collections had been made, the patients received non-surgical periodontal treatment, which comprised oral hygiene instructions, and supra and subgingival debridement under local anesthesia. The treatment took, on average, four sessions of one hour using manual instruments (Gracey and McCall Curettes, Hirschfield Files^{‡‡}).

After the scaling and root planing, a professional plaque control program was performed twice a month for three months, comprising supragingival plaque removal and reinstruction of oral hygiene procedures. Thereafter, all subjects were clinically reexamined and new GCF samples were collected to evaluate the effect of the non-surgical periodontal therapy on the previously assessed clinical and immunological parameters.

Statistical analysis

The unit of analysis was the individual and α was set at 0.05. The tests were based on the median values with variability measures (25th and 75th percentiles). Differences between the groups were determined using Mann-Whitney U Test and differences between the periods (intragroup comparison) were performed using Wilcoxon Test. A software program^{§§} was used to analyze the data.

RESULTS

Clinical findings

All the subjects completed the experimental period. No drop out occurred. Diabetes group showed higher percentage of sites with VPI ($P<0.001$), BOP ($P<0.001$) and lower percentage of sites with $CAL \leq 3\text{mm}$ ($P=0.007$) than the control group at baseline. The median number of teeth per patient was well balanced between the groups (Table 1).

There was a significant decrease in the percentage of sites with VPI, GBI, BOP, PD between 4-6mm, $PD \geq 7mm$ and $CAL \geq 7mm$ in both the diabetes and the control groups follow up. Regarding the percentage of sites with CAL between 4-6mm, there was a significant increase in both groups probably due to a decrease in the percentage of $CAL \geq 7mm$ 90 AT (Table 1).

The comparison between the groups showed that the percentage of sites with VPI ($P<0.001$), GBI ($P<0.001$), BOP ($P<0.001$) and $CAL \geq 7mm$ ($P=0.038$) were significantly higher in the diabetes group compared with the control group 90 AT (Table 1).

Immunological findings

In deep pockets, the total amount and the concentration of MMP-8, MMP-9 and elastase activity significantly decreased after treatment in both groups. The total amount of IL-1 β also decreased in both groups. Regarding the diabetes group, there was a significant increase in IL-1 β and IL-18 concentration after treatment ($P=0.014$; $P=0.039$, respectively) (Table 2). When diabetes and controls were compared at baseline and follow up, no significant difference in the total amount and concentration of IL-1 β , IL-18, MMP-8, MMP-9 and elastase activity was observed (Table 2).

In shallow pockets, the treatment significantly reduced the total amount of IL-1 β and elastase activity in both groups. Whereas, the concentration of elastase activity significantly decreased in the control group ($P<0.001$) and remained almost the same in the diabetes group after treatment. When diabetes patients and controls were compared at baseline and follow up, there was no significant difference in the total amount and concentration of IL-1 β and elastase activity at baseline. However, the diabetes group

showed higher total amount of IL-1 β ($P=0.028$) and elastase activity ($P=0.049$) 90 AT (Table 3).

The mean ($\pm$ SD) values of HbA1c in diabetes group at baseline and 90 AT were respectively: 9.48% ($\pm$ 1.74) vs. 9.17% ($\pm$ 2.00). The reduction of 0.31% ($\pm$ 1.81) did not reach significance.

DISCUSSION

The present study showed that non-surgical periodontal treatment significantly reduced GCF levels of IL-1 β , MMP-8, MMP-9 and elastase activity in individuals with type 2 diabetes. These reductions were associated with the improvement of the clinical periodontal status. To date, the only study that evaluated the effect of periodontal treatment in GCF from T2DM patients was Navarro-Sanchez et al.²⁸ This authors found a significant reduction of GCF IL-1 β and TNF- α concentration at 90 days after treatment.

In the present study, the reductions in total amount of IL-1 β , MMP-8, -9 and elastase activity observed in the diabetes group were similar to the controls. The evaluation of such substances in healthy individuals with periodontitis has been done previously. The significant reduction of IL-1 β total amount in deep pockets is consistent with a previous study²⁹ that showed significant reduction of GCF IL-1 β total amount and concentration in diseased sites from systemically healthy individuals 16 weeks after treatment. In contrast, Gamonal et al.³⁰ showed no change in GCF IL-1 β total amount from healthy individuals 2 months after therapy. Regarding MMPs and neutrophils elastase, in agreement with our findings, some studies^{12,31} showed significant reduction

of MMP-8 concentration as well as the amount of elastase activity after non-surgical periodontal therapy in systemically healthy individuals.

Our results at baseline for IL-1 β , IL-18, MMP-8, -9 and elastase activity were very similar for the two groups. Our results concerning IL-1 β is in line with Cutler et al.³² and Navarro-Sanchez et al.²⁸ but contrast with other studies showing higher concentration of this cytokine in both type 1 and type 2 diabetes groups.^{4,23} Some factors, such as the higher mean HbA1c levels⁴ and the absence of information about the duration of diabetes in these studies^{4,23} may complicate the comparisons among the studies. These factors might expose monocytes to higher number of hyperglycemic episodes and consequently increase the IL-1 β secretion.³³

In shallow pockets, the diabetes group showed significant higher total amount of IL-1 β follow up compared with the control group. Considering that IL-1 β is one important cytokine involved in the pathogenesis of periodontitis and its expression may stimulate the production of other mediators and MMPs expression,²² this finding might indicate an increased susceptibility to further disease progression.

The total amount of GCF IL-18 remained the same after treatment in spite of the clinical improvement in both groups. There is little information about the presence and role of IL-18 in the GCF of patients with chronic periodontitis. Recently, cross-section studies^{24,34-35} have reported that GCF level of IL-18 rose with increasing inflammation in healthy subjects, and an association with the severity of periodontal disease may exist.

We could not find any significant difference between the groups neither for the total amount nor for the concentration of MMP-8 and MMP-9 in deep pockets. Similar

results have been recently described in saliva¹⁸ and GCF¹⁶ from periodontitis patients with diabetes compared with systemically healthy controls with periodontitis.

Alpagot et al.¹⁴ recorded no significant differences in GCF elastase activity from T2DM and T1DM individuals when compared with systemically healthy controls. Our findings demonstrated no difference between the groups regarding the total amount and concentration of elastase activity in deep pockets at baseline and at follow up. However, different results were observed in shallow pockets. Although there was no significant difference between the groups in the total amount and concentration of elastase at baseline, the diabetes group showed significant higher levels of elastase activity compared with the control group after treatment. It may suggest a maintenance of neutrophils activation.³⁶

A reduction in probing depth was observed in both groups after non-surgical periodontal therapy which is in agreement with other studies.³⁷⁻⁴¹ Regarding the clinical attachment level, the diabetes group showed lower percentage of sites with $CAL \leq 3mm$ compared with the control group at baseline. This result is in agreement with other studies that demonstrated higher attachment loss in diabetics,^{14,42-44} but in contrast with others that could not show difference in clinical attachment level among diabetics and non-diabetics subjects.^{38-39,41,45} In our study, the periodontal treatment resulted in significant reduction of sites with $CAL \geq 7mm$ in both groups.

The higher percentage of sites with visible plaque index in the diabetes group has been described.^{7,43} In our study, although there was a significant reduction in this parameter after treatment, a difference persisted between the groups. This is in line with previous studies which described higher plaque levels among individuals with poor

glycemic control⁴⁶ and better compliance among those with improved glycemic control.⁴⁷

In conclusion, non-surgical periodontal treatment was effective to reduce the levels of IL-1 β , MMP-8, MMP-9 and elastase activity in GCF from T2DM patients. These reductions were associated with the improvement of the clinical periodontal status.

FOOTNOTES

* Hu-Friedy, Mfg. Co. Inc., Chicago, IL, USA.

† PerioPaper Strips, OraFlow Inc., Plainview, NY, USA.

‡ OraFlow Inc., Plainview, NY, USA.

§ MBL, Nagoya, Japan.

|| Millenia Kinetic Analyzer, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA.

¶ Minneapolis, MN, USA.

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

** Chromogenix AB, Mölndal, Sweden.

†† DiaSTAT Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA.

‡‡ Trinity Periodontia, São Paulo, Brazil.

§§ Statistica 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Karin Trollås, from Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, for the technical assistance in the immunological analysis. Funding for this project was

provided by the Coordination for Postgraduate Courses in Higher Education (CAPES; n. 0948/06-3) and by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP; n. 04/08142-0), Brazil.

REFERENCES

1. Weiss S J. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
2. Chapple IL, Mason GI, Garner I, et al. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann Clin Biochem* 1997;34:412-421.
3. Papapanou PN. Periodontal diseases: Epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.
4. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68:127-135.
5. Soslone WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal disease in diabetics. *Ann Periodontol* 1998;3:3-12.
6. Lu HK, Yang PC. Cross-sectional analysis of different variables of patients with non-insulin dependent diabetes and their periodontal status. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004;24:71-79.
7. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol* 2005;76(3):418-425.
8. Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin and tumor necrosis factor- α secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. *J Periodontol Res* 2007; 42: 274-282.

9. Gustafsson A, Asman B, Bergstrom K. Altered relation between granulocyte elastase and alpha-2-macroglobulin in gingival crevicular fluid from sites with periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 1994;21(1):17-21.
10. Figueredo CMS, Gustafsson A. Activity and inhibition of elastase in GCF. *J Clin Periodontol* 1998;25:531-535.
11. Figueredo CMS, Fischer RG, Gustafsson A, Firatli E. Aberrant neutrophil reactions in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:951-955.
12. Figueredo CMS, Areas A, Miranda LA, Fischer RG, Gustafsson A. The short-effectiveness of non-surgical treatment in reducing proteases activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2004;31:615-619.
13. Kjersem H, Hiltsted J, Madsbad S, Wandall JH, Johansen KS, Borregaard N. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction during short-term metabolic changes from normo- to hyperglycemia type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Infection* 1988;16:215-221.
14. Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res* 2001;36:169-174.
15. Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol* 2006;77:2040-2050.

16. Safkan-Seppälä B, Sorsa T, Tervahartiala T, Beklen A, Kontinen Y T. Collagenases in gingival crevicular fluid in type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77:189-194.
17. Sorsa T, Ingman T, Halinen S et al. Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19:146-149.
18. Collin H-L, Sorsa T, Meurman JH et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodont Res* 2000;35:259-265.
19. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77:1803-1808.
20. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1b and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004;75:1203-1208.
21. Figueredo CMS, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1457-1463.
22. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
23. Bulut U, Develioglu H, Taner IL, Berker E. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J Oral Sci* 2001;43:171-177.

24. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:256-60.
25. No authors listed. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2008;31:S55-S60.
26. No authors listed. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-112.
27. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-235.
28. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetics patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34:835-843.
29. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent* 2004;32:511-520.
30. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000;71:1535-1545.
31. Kinane DF, Darby Ib, Said S et al. Changes in gingival fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodont Res* 2003; 38: 400-404.

32. Cluter CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipdemia. *J Periodontol* 1999;70:1313-1321.
33. Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1 beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1):E337-346.Epub 2007 Apr.10.
34. Johnson RB, Serio FG. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2005;76:785-790.
35. Figueredo CM, Rescala B, Teles RP et al. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(2):173-176.
36. Collier A, Jackson M, Bell D et al. Neutrophil activation detected by increased neutrophil elastase activity in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Res* 1989; 10(3): 135-138.
37. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1991;18:65-68.
38. Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol* 1998;25:112-124.
39. Westfelt E, Rylander H, Blome G, Jonasson P, Lindhe J. The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol* 1996;23:92-100.
40. Sonoki K, Nakashima S, Takata Y et al. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol* 2006;77:1907-1913.

41. Smith G T, Greenbaum C J, Johnson B D, Rutger G. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol* 1996;67:794-802
42. Khader YS, Daoud AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complicat* 2006;20:59-68.
43. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol* 1996;67:1185-1192.
44. Novaes Júnior AB, Gutierrez FG, Novaes AB. Periodontal disease progression in type II non-insulin-dependent diabetes mellitus patients (NIDDM). Part I – probing pocket depth and clinical attachment. *Braz Dent J* 1996;1(2):65-73.
45. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006;77:591-598.
46. Karjalainen KM, Knuuttila ML, Von Dickhoff KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J Periodontol* 1994;65:1067-1072.
47. Syrjälä AM, Knecht M, Knuuttila M. Dental self-efficacy as a determinant to oral health behavior, oral hygiene and HbA1c level among diabetic patients. *J Clin Periodontol* 1999;26:616-621.

Table 1. Median values (25th-75th percentiles) for the percentage (%) of visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) $\leq$ 3mm, PD between 4-6mm, PD $\geq$ 7mm, clinical attachment level (CAL) $\leq$ 3mm, CAL between 4-6 mm and CAL $\geq$ 7mm at baseline (day 0) and 90 days after treatment (90 AT) in the diabetes group (n=23) and control group (n=26).

Clinical parameters	Diabetes day 0	P1	Diabetes 90 AT	P2	Control Day 0	P3	Control 90 AT	P4
Teeth (n)	22.0 (19.0-25.0)			NS	23.0 (21.0-25.0)			
% VPI	85.0 (80.5-94.6)	< 0.001	15.3 (9.7-17.8)	< 0.001	64.6 (55.3-78.3)	< 0.001	8.8 (5.9-11.1)	< 0.001
% GBI	42.4 (29.5-61.1)	< 0.001	8.9 (5.7-10.5)	NS	37.6 (31.3-52.3)	< 0.001	3.8 (0-5.5)	< 0.001
% BOP	94.4 (80.0-100.0)	< 0.001	25.6 (17.9-32.7)	< 0.001	74.8 (65.4-89.1)	< 0.001	14.0 (9.1-19.2)	< 0.001
% PD $\leq$ 3mm	52.0 (21.0-70.0)	< 0.001	88.0 (76.0-95.0)	NS	62.0 (49.0-71.0)	< 0.001	91.5 (86.0-96.0)	0.045
% PD 4-6mm	37.0 (26.0-52.0)	< 0.001	12.0 (5.0-23.0)	NS	32.5 (25.0-39.0)	< 0.001	8.0 (4.0-12.0)	NS
% PD $\geq$ 7mm	9.0 (1.0-22.0)	< 0.001	0 (0-1.0)	NS	5.5 (3.0-14.0)	< 0.001	0 (0-0)	NS
% CAL $\leq$ 3mm	17.0 (8.0-35.0)	0.004	19.0 (10.0-50.0)	0.007	43.0 (28.0-52.0)	NS	43.5 (35.0-58.0)	NS
% CAL 4-6mm	45.0 (39.0-55.0)	0.028	59.0 (42.0-68.0)	NS	38.0 (35.0-45.0)	< 0.001	52.5 (39.0-58.0)	NS
% CAL $\geq$ 7mm	27.0 (10.0-48.0)	< 0.001	12.0 (2.0-20.0)	NS	18.0 (6.0-24.0)	< 0.001	4.0 (1.0-10.0)	0.038

P1. The significance of the differences in the diabetes group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P2. The significance of the differences between diabetes and control groups at day 0 (Mann-Whitney U test). P3. The significance of the differences in the control group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P4. The significance of the differences between diabetes and control groups 90 AT (Mann-Whitney U test). NS. Not significant.

Table 2. Median values (25th-75th percentiles) for the total amount and concentration of IL-1 β , elastase activity, IL-18, MMP-8 and MMP-9 and volume of gingival crevicular fluid (GCF) in deep pockets at baseline (day 0) and 90 days after treatment (90 AT) in the diabetes group (n=23) and control group (n=26).

Biomarkers in deep pockets		Diabetes day 0	P1	Diabetes 90 AT	P2	Control Day 0	P3	Control 90 AT	P4
Volume of GCF (μ L)		4.1 (3.3-4.9)	< 0.001	2.3 (1.5-3.0)	NS	4.0 (3.6-4.7)	< 0.001	2.1 (1.5-3.3)	NS
Total amount									
IL-1 β (pg)		140.9 (106.0-177.7)	0.016	102.2 (48.8-151.6)	NS	159.6 (145.7-197.1)	< 0.001	76.2 (52.2-131.8)	NS
Elastase (Abs)		1.5 (1.2-1.6)	< 0.001	0.3 (0.1-0.8)	NS	1.5 (1.4-1.6)	< 0.001	0.3 (0.1-0.6)	NS
IL-18 (pg)		52.6 (29.8-67.3)	NS	35.4 (26.2-49.0)	NS	42.3 (24.3-62.8)	NS	39.3 (29.4-47.3)	NS
MMP-8 (pg)		59.1 (42.9-93.9)	< 0.001	12.7 (9.3-30.3)	NS	84.0 (44.2-122.4)	< 0.001	14.6 (8.7-23.0)	NS
MMP-9 (pg)		131.3 (82.2-177.6)	< 0.001	37.2 (26.5-63.3)	NS	156.9 (110.1-253.8)	< 0.001	45.4 (28.1-65.5)	NS
Concentration									
IL-1 β (pg/ μ L)		33.2 (23.9-49.0)	0.014	48.9 (30.8-59.7)	NS	40.7 (34.7-50.9)	NS	38.8 (26.0-50.5)	NS
Elastase (Abs/ μ L)		0.3 (0.3-0.4)	0.001	0.1 (0.0-0.3)	NS	0.4 (0.3-0.4)	< 0.001	0.2 (0.0-0.3)	NS
IL-18 (pg/ μ L)		12.8 (6.9-20.5)	0.039	16.4 (12.4-25.1)	NS	10.9 (6.1-17.0)	NS	18.0 (13.3-23.7)	NS
MMP-8 (pg/ μ L)		15.1 (10.4-24.2)	< 0.001	6.8 (3.8-11.7)	NS	20.6 (11.5-32.3)	< 0.001	6.8 (3.7-12.8)	NS
MMP-9 (pg/ μ L)		32.8 (21.7-43.9)	< 0.001	18.4 (15.4-29.4)	NS	37.8 (28.5-54.4)	< 0.001	21.8 (12.9-39.8)	NS

μ L: microliter; Pg: picogram; Abs: absorbance. P1. The significance of the differences in the diabetes group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P2. The significance of the differences between diabetes and control groups at day 0 (Mann-Whitney U test). P3. The significance of the differences in the control group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P4. The significance of the differences between diabetes and control groups 90 AT (Mann-Whitney U test). NS. Not significant.

Table 3. Median values (25th-75th percentiles) for the total amount and concentration of IL-1 β , elastase activity and volume of gingival crevicular fluid (GCF) in shallow pockets at baseline (day 0) and 90 days after treatment (90 AT) in the diabetes group (n=23) and control group (n=26).

Biomarkers in shallow pockets	Diabetes day 0	P1	Diabetes 90 AT	P2	Control Day 0	P3	Control 90 AT	P4
Volume of GCF (μ L)	1.4 (0.9-2.1)	0.034	0.9 (0.6-1.3)	NS	1.7 (1.0-2.0)	< 0.001	0.9 (0.6-1.1)	NS
Total amount								
IL-1 β (pg)	55.7 (34.6-68.4)	0.013	40.1 (24.7-44.3)	NS	64.8 (32.0-85.2)	< 0.001	23.5 (16.7-34.8)	0.028
Elastase (Abs)	0.4 (0.2-1.1)	0.013	0.3 (0-0.4)	NS	0.5 (0.2-1.3)	< 0.001	0.1 (0.1-0.2)	0.049
Concentration								
IL-1 β (pg/ μ L)	37.4 (24.4-58.1)	NS	39.4 (15.0-63.6)	NS	38.5 (28.8-48.4)	NS	29.4 (19.3-38.3)	NS
Elastase (Abs/ μ L)	0.3 (0.1-0.5)	NS	0.2 (0.1-0.4)	NS	0.3 (0.2-0.7)	< 0.001	0.1 (0.1-0.2)	NS

μ L: microliter; Pg: picogram; Abs: absorbance. P1. The significance of the differences in the diabetes group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P2. The significance of the differences between diabetes and control groups at day 0 (Mann-Whitney U test). P3. The significance of the differences in the control group between day 0 and 90 AT (Wilcoxon signed-rank test). P4. The significance of the differences between diabetes and control groups 90 AT (Mann-Whitney U test). NS. Not significant.

CAPÍTULOS

Capítulo 2 – Avaliação do efeito do tratamento periodontal nos marcadores inflamatórios do plasma sanguíneo, perfil lipídico e controle metabólico dos indivíduos portadores de diabetes Tipo 2.

Periodontal therapy reduced circulating tumor necrosis factor- α and fibrinogen levels in patients with type 2 diabetes mellitus.

.

(artigo a ser submetido à publicação)

Reduced tumor necrosis factor- α and fibrinogen after non-surgical periodontal therapy in plasma of patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis.

F. O. B. Correa^{1,2}, D. Gonçalves¹, C. M. Figueredo^{2,3}, A. Gustafsson², S. R. P. Orrico¹

¹School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University, Araraquara, Brazil.

²Institute of Odontology, Division of Periodontology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

³School of Dentistry, Department of Periodontology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.

Running title: Systemic effect of periodontal therapy in diabetics

Mailing address:

Silvana Regina Perez Orrico

Dept of Diagnosis and Surgery, Faculty of Odontology - UNESP.

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. Cep 14801-903

Phone: 55 (16) 33016377 Fax: 55 (16) 3301-6369.

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

Running title: Systemic effect of periodontal therapy in diabetics

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of periodontal therapy on serological markers of systemic inflammation and lipid profile in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients and systemically healthy individuals.

Material and Methods: Twenty T2DM patients (diabetes group) and 20 systemically healthy individuals (control group), both groups with chronic periodontitis, were enrolled. Periodontal clinical parameters, namely visible plaque index, gingival bleeding index, bleeding on probing, probing depth and clinical attachment levels were evaluated. Blood samples for plasma were collected in all subjects, and assessed for the levels of high sensitive capsule-reactive protein (hs-CRP), fibrinogen (FIB), interleukin (IL) 1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor α (TNF- α), total cholesterol (TC), triglycerides (TRG), HDL-cholesterol and LDL-cholesterol. The glycated hemoglobin (HbA1c) and fasting plasma glucose (FPG) were also measured in T2DM subjects. All clinical, immunological and metabolic parameters were evaluated prior to and 3 months after periodontal therapy.

Results: All clinical parameters improved after therapy. Hs-CRP and TRG were significant higher in the diabetes group compared with the control group in both periods. Among the serum inflammatory markers tested, FIB and TNF- α significantly decreased in the diabetes group after therapy ($P=0.048$ and $P=0.028$, respectively). Periodontal therapy had no significant effect on lipid profile. Treatment reduced HbA1c and FPG levels in T2DM patients, albeit not significantly so.

Conclusions: The good clinical response to non-surgical periodontal therapy resulted only in a modest effect on serological markers of systemic inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words: periodontitis/therapy, type 2 diabetes mellitus, fibrinogen, tumor necrosis factor- α , lipid profile.

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disorder characterized by a destruction of periodontal tissues with a subsequent loss of attachment. The periodontal destruction is host-mediated by locally produced pro-inflammatory cytokines in response to the bacterial flora and its products. Significant changes in the plasma concentrations of cytokines and biomarkers in periodontitis patients compared with healthy control have been described (Loos et al., 2000; Frederiksson et al., 1999). It may be mediated by “systemic dumping” of locally produced cytokines (Prabhu et al., 1996) and/or low-level asymptomatic bacteremia/endotoxemia (AAP, 1998) due to the high vascularity of inflamed periodontium.

Periodontal disease can have a significant impact on the metabolic state in diabetes (Mealey, Oates, 2006). Individuals with diabetes who also have periodontitis may present with an even greater systemic inflammatory condition with elevated serum levels of interleukin 6 (IL-6), TNF- α , and capsule-reactive protein (CRP), which can worsen insulin resistance and thereby aggravate glycemic control (Taylor et al., 1996). This exaggerated inflammatory response may be accompanied by altered lipid metabolism (Iacopino, Cluter, 2000). Hyperlipdemia have been shown to be associated with diabetes (Howard, 1993) and periodontal breakdown (Cluter et al., 1999; Katz et al., 2002; Iacopino, Cluter, 2000).

Interventional studies have been performed to investigate whether periodontitis might be an alteration factor in systemic inflammation associated with diabetes, however this matter remains unclear. The treatment of periodontal infections in individuals with diabetes resulted in a minor influence on medical data such as total cholesterol and triglycerides (Kiran et al., 2005; Christgau et al., 1998). However, the levels of acute phase proteins, such as CRP (Lalla et al., 2007) and fibrinogen (Christgau et al., 1998) may have a great reduction after therapy in these patients.

TNF- α , an important pro-inflammatory cytokine, has been identified as a strong antagonist to the cell surface insulin substrate (Fernandez-Real, Ricart, 2003), and is associated with insulin resistance (Mishima et al., 2001) and type 2 diabetes (Fernandez-Real, Ricart, 2003). Some studies (Iwamoto et al., 2001; Nishimura et al 2003; Al-Murabak et al., 2002) showed that periodontal treatment with or without local administration of antibiotic reduced circulating TNF- α in T2DM individuals with subsequent reduction on insulin concentration and glycated hemoglobin levels. On the other hand, some studies (Lalla et al., 2007; Talbert et al., 2006) reported that circulating TNF- α and IL-6 levels are not reduced following conventional periodontal treatment in diabetic subjects.

Interleukin 1 β , another important pro-inflammatory cytokine, might contribute to systemic inflammation through induction of acute phase proteins (Ablij, Meinders, 2002). Al-Murabak et al. (2002) have shown that circulating IL-1 β reduced significantly after conventional periodontal treatment in patients with diabetes. In contrast, Lalla et al. (2007) demonstrated no significant changes on serum levels of IL-1 β and other pro-inflammatory cytokines as well as anti-inflammatory cytokines after non-surgical periodontal treatment in diabetics.

In order to clarify further the contribution of periodontal disease to the systemic inflammatory response, our aim was to investigate the effect of non-surgical periodontal therapy on serological markers of systemic inflammation and lipid profile in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with chronic periodontitis and systemically healthy individuals with chronic periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Sample Population and Experimental Design

The diabetes group comprised of 20 type 2 diabetes mellitus (T2DM) subjects (ADA, 2008), with inadequate metabolic control (glycated hemoglobin test HbA1c $\geq 7\%$) (UKPDS, 1998),

8 males and 12 females, mean age 45.8 ($\pm$ 6.0) years, median diabetes duration of six years and mean body mass index (BMI) 30.8 ($\pm$ 4.9) kg/m² recruited from the Clinic of Periodontics for Diabetic Patients of the Department of Diagnosis and Surgery of the School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Brazil, between January 2005 and July 2006. All patients were taking prescribed hypoglycemic and/or insulin for the treatment of their diabetes. Twenty systemically healthy subjects without diabetes, as confirmed by fasting plasma glucose test result $\leq$ 100 mg/dL, 10 males and 10 females, mean age 43.7 ($\pm$ 6.4) years and mean BMI 25.8 ($\pm$ 2.6) kg/m² were included as control group. These subjects were consecutively selected from the Clinic of Periodontics at this University at the same time as the patients. The present study was approved by the Ethics in Human Research Committees of the School of Dentistry (UNESP, Araraquara, Brazil) and Huddinge Hospital (Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden). All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and gave their written consent to participate.

All subjects that participated in this study had chronic periodontitis (AAP, 1999). All participants presented at least fifteen teeth, and were non-smokers or former smokers for at least five years. Each subject should present at least four teeth with one or more sites with probing depth (PD) $\geq$ 5 mm, with visible plaque, bleeding on probing (BOP), and clinical attachment loss (CAL) $\geq$ 4 mm. Subjects under hormone therapy, those who received previous periodontal treatment in the preceding year or needed antibiotic prophylaxis before periodontal examination were excluded from this study.

The study design is described in our previous paper (unpublished observation). Briefly, all patients were submitted to periodontal clinical examination performed in six sites per tooth (excluding third molars) by a single trained calibrated examiner (Kappa=0.90, data not shown). The presence of supragingival biofilm and marginal gingival bleeding were recorded with the visible plaque index (VPI) and gingival bleeding index (GBI), respectively (Ainamo,

Bay, 1975). PD, CAL and BOP were measured with a University of North Carolina probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

Periodontal treatment

After all collections had been made, the patients received non-surgical periodontal treatment, which comprised oral hygiene instructions, and supra and subgingival debridement under local anesthesia. The treatment took, on average, four sessions of one hour using manual instruments (Gracey and McCall Curettes, Hirschfield Files, Trinity Periodontia, São Paulo, Brazil). After the scaling and root planing, a professional plaque control program was performed twice a month for three months, comprising supragingival plaque removal and reinstruction of oral hygiene procedures. Thereafter, all subjects were clinically reexamined and new blood samples were collected to evaluate the effect of the non-surgical periodontal therapy on the previously assessed clinical and immunological parameters.

Laboratory markers

Blood samples were collected after a minimum 8-h overnight fast for both groups. Fibrinogen (mg/dL) was recorded by Clauss method using a commercial kit (Wiener Laboratorios A.S.I.C., Rosário, Argentina) and high sensitivity capsule-reactive protein levels (hs-CRP) (mg/L) was analyzed immunologically with a commercial kit (N High sensitive CRP, DADE, Behring AG, Marburg, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions, using a nephelometer analyzer (Behring AG, Diagnostica, Marburg, Germany). The serum lipids were measured by total cholesterol (TC) (mmol/L), high-density lipoproteins (HDL) (mmol/L), low-density lipoproteins (LDL) (mmol/L) and triglycerides (mg/dL) (TRG) using standard clinical chemistry procedures (Roche AG Diagnostics, Mannheim, Germany).

HbA1c and fasting plasma glucose assays

To evaluate the metabolic control in diabetes patients, concentration of glycated hemoglobin (HbA1c) (%) was measured by high-performance liquid chromatography (DiaSTAT

Hemoglobin A1c Analyzer System, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Fasting plasma glucose (FPG) (mg/dL) was determined by the glucose oxidase method (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

Plasma inflammatory mediators assays

The plasma concentrations of interleukin 1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α (TNF- α) were assessed by multiplex immunoassays for Luminex technology using commercially available high sensitivity human cytokine Kit (Linco Research Inc, St Charles, Missouri, USA), following the manufacturer's instructions. Diluted microparticles preparation (50 μ L), standards (50 μ L) and undiluted plasma samples (50 μ L) were pipetted into wells and incubated for two hours. After three washing, biotinylated antibodies specific cocktail (50 μ L) was added and incubated for one hour at room temperature. After washing again, streptavidin-phycoerythrin conjugate (50 μ L) was finally added, incubated for 30 minutes and the microparticles were resuspended in buffer. One laser is microparticle-specific and determines which analyte is being detected and the other laser determines the magnitude of the phycoerythrin-derived signal, which is in direct proportion to the amount of analyte bound. The minimum detectable concentration for this assay were as follows: IL-1 β - 0.06 pg/mL; IL-4 - 0.13 pg/mL; IL-6 - 0.10 pg/mL; IL-8 - 0.11 pg/mL; IL-10 - 0.15 pg/mL; and TNF- α - 0.05 pg/mL. Data analysis was done with Bio-Plex Manager software (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA.) using the Luminex analyzer.

Clinical, inflammatory and metabolic outcomes were assessed at baseline and at 3 months after completion of periodontal therapy. All individuals reached this follow-up examination.

Statistical analysis

The unit of analysis was the individual and α was set at 0.05. Normally distributed data are presented as means and standard deviations, whereas non-normally distributed as medians,

and 25th to 75th percentiles. Student's T-test, Mann-Whitney and Wilcoxon were applied. A software program (Statistica 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK) was used to analyze the data.

RESULTS

Sample population

The individuals formed a gender- and age-matched group, however the diabetes group showed higher mean BMI compared with the control group ($P=0.009$). During the study period, the patients with diabetes did not report changes in lifestyle, including exercise, diet and medications. In diabetes group, seventy percent of the patients had at least one diabetes-related complication. Fifty-five percent were receiving oral hypoglycemic agents or dietary control only, 15% were undergoing insulin treatment and 30% were treated with a combination of insulin and oral hypoglycemic agents.

Clinical findings

Table 1 shows the percentage of clinical improvement comparing baseline and 3-month follow-up examinations for all periodontal parameters. The non-surgical periodontal treatment improved clinical periodontal status type 2 diabetes patients with chronic periodontitis; however these patients showed significant lower improvement of VPI ($P=0.036$), GBI ($P<0.001$) and BOP ($P=0.027$) compared with the control group.

Immunological findings in plasma

The comparison between the groups showed that serum levels of high-sensitive C-reactive protein and triglycerides were significantly increased in the diabetes group at baseline ($P=0.002$ and $P=0.010$, respectively) and at three-month follow-up ($P=0.007$ and $P=0.017$, respectively) compared with the control group. The other serum mediators and cytokines levels did not differ between the groups neither at baseline nor at 3-month follow-up. (Table 2)

Of the serum cytokines examined only the TNF- α levels significantly reduced after periodontal therapy in the diabetes group ($P=0.028$).

The non-surgical periodontal treatment had no significant effect on lipid profile (total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol) in both groups. Regarding the markers of inflammation, treatment resulted in lower fibrinogen levels in diabetes group ($P=0.048$), and a tendency in reducing hs-CRP levels in these patients, albeit not significant so (Table 2).

The mean ($\pm$ SD) of HbA1c concentrations were 9.4 ($\pm$ 1.8)% at baseline and 9.0 ($\pm$ 1.9)% after treatment. The mean ($\pm$ SD) of fasting plasma glucose levels were 235.8 ($\pm$ 89.7)mg/dL at baseline and 202.6 ($\pm$ 64.9)mg/dL after treatment. These reductions in both parameters following therapy did not reach significance ($P>0.05$).

DISCUSSION

The main finding of this prospective study was that the improvement on local periodontal inflammation after mechanical therapy was associated with significant reduction of circulating TNF- α and fibrinogen levels in type 2 diabetes patients with inadequate metabolic control.

TNF- α has been reported to play a key role in the pathogenesis of type 2 diabetes (Argiles et al., 1994). This cytokine has been identified as a strong antagonist to the cell surface insulin substrate (Fernandez-Real, Ricart, 2003). The TNF- α blocking of the insulin receptors can contribute to the level of insulin resistance by inhibiting glucose transport and insulin action (Paz et al., 1997). Engebretsson et al. (2007) showed in a diabetic cohort that circulating TNF- α is associated with more severe periodontitis. Our study demonstrated a significant reduction of circulating TNF- α among T2DM individuals. This is in line with the study of Iwamoto et al. (2001) that reported the influence of mechanical periodontal therapy in

association with local antibiotic delivery in the circulating TNF- α . In contrast, some studies (Al-Mubarak et al., 2002; Talbert et al., 2006; Lalla et al., 2007) did not show changes in TNF- α level in patients with diabetes following conventional periodontal therapy. Therefore, this significant reduction of circulating TNF- α among T2DM individuals after periodontal therapy may positively influence diabetic control.

Other serum cytokines examined no significant change was observed at 3-month follow-up. Moreover, the comparison between the groups did not show any difference in the levels of these cytokines, neither at baseline nor at 3-month follow-up. This lack of statistical significance suggests to be due to the broad interindividual variability of cytokine expression, which may have been related to variations in the systemic loading effect of treatment. Another possible limitation is the relatively small numbers of individuals in the sample.

Fibrinogen, an acute phase protein produced by the liver, has been identified as a marker of inflammation (Sakkinen et al., 2001). The reduction of fibrinogen levels following periodontal therapy in patients with diabetes is similar to previous study (Christgau et al., 1998). Christgau et al. (1998) showed significant lower levels of fibrinogen 4 months after periodontal therapy in patients with type 1 and 2 diabetes. In contrast, Lalla et al. (2007) did not show significant reduction in fibrinogen in patients with diabetes at 1-month follow-up; however, the power of this study was limited owing to the relatively small number of patients analyzed. The comparison of fibrinogen levels between both groups did not show significant difference between them neither at baseline nor at 3-month follow-up.

On the other hand, Hs-CRP, another acute phase protein, was found in higher levels in the diabetes group than in the control group, regardless the clinical improvement of the periodontal condition. Takeda et al. (2006) reported that an increased CRP levels in the diabetes group reflects an acute inflammatory condition; thus, it may not be associated with chronic periodontitis. CRP hepatic production is usually elicited by an inflammatory stimulus

and mediated through a complex network of cytokines (Ablij, Meinders, 2002). In our study, the individuals with diabetes were more obese than the non-diabetic subjects, described by significant higher levels of BMI. The finding raises the possibility that CRP levels might be elevated as a consequence of obesity with possible increase in the cytokines secretions without effect on the liver.

The periodontal treatment tendency to reduce hs-CRP level in both groups, but it did not reach significance, in agreement with previous findings in diabetic (Christgau et al., 1998) and in systemically healthy individuals (Yamazaki et al., 2005; Ide et al., 2004). However, non-surgical periodontal therapy with adjunctive local delivery of antibiotic seems to significantly decrease CRP levels in periodontitis patients (D'Aiuto et al., 2006).

Triglycerides level was also significantly higher in the diabetes group than in the control group prior to and before periodontal therapy. In contrast, Cutler et al. (1999) did not show difference in the lipid profile between diabetics and non-diabetics individuals with periodontitis; however, the limited number of patients in each group might influence their result. One possible explanation of our result is that diabetic patients with inadequate metabolic control exhibit an exaggerated inflammatory response to gram-negative bacterial lipopolysaccharide releasing large amounts of inflammatory mediators and cytokines that may cause metabolic dysregulation of lipid metabolism (Iacopino, Cluter, 2000; Van der Poll et al., 1995). Second, the compliance to periodontal treatment was different between diabetic and non-diabetic subjects as reported in our previous study (unpublished observation), and might be accompanied by poor attention to health habits, including diet, exercise, and other factors affecting their lipid profile.

The non-surgical periodontal treatment did not change significantly the lipid profiles neither in the diabetes group nor in the control group. This is in line with other studies in diabetics (Christgau et al., 1998; Kiran et al., 2005) and non-diabetics individuals (Loesche et al.,

2005; D'Aiuto et al., 2005); however scaling and root planing (SRP) associated with local antimicrobial therapy was efficient in reducing the lipid profile in systemically healthy subjects (D'Aiuto et al., 2006).

In conclusion, the good clinical response to non-surgical periodontal therapy resulted in lower circulating TNF- α and fibrinogen levels in subjects with type 2 diabetes. The mechanical infection control of periodontitis had no effect on lipid profile. However, an evaluation of larger study population with longer-term follow-up will be necessary to confirm these observations.

REFERENCES

- Abliz H, Meinders A. C-reactive protein: history and revival. *Eur J Intern Med* 2002;13:412-422.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-235.
- Al-Mubarak S, Ciancio S, Aljada A, Awa H, Hamouda W, Ghanim H, et al. Comparative evaluation of adjunctive oral irrigation in diabetics. *J Clin Periodontol* 2002;29:295-300.
- Argiles JM, Lopez-Soriano J, Lopez-Soriano FJ. Cytokines and diabetes: the final step? Involvement of TNF- α in both type I and II diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research* 1994;26:447-449.
- Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol* 1998;25:112-124.
- Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipdemia. *J Periodontol* 1999;70:1313-1321.

- D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factor: results from randomized controlled clinical trial. *Am Heart J* 2006;151:977-984.
- D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti MS. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res* 2005;84:269-273.
- Engelbrecht S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumor necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 2007;34:18-24.
- Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278-301.
- Fredriksson MI, Figueredo CMS, Gustafsson A, Bergstrom KG, Asman BE. Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. *J periodontol* 1999;70:1355-1360.
- Howard BV. Diabetes and plasma lipoproteins in native Americans. Studies of the Pima Indians. *Diabetes Care* 1993;16(suppl 1):284-291.
- Iacopino AM, Cluter CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol* 2000;71:1375-1384.
- Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6. *J Periodontol* 2004;75:420-428.
- Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, et al. The effects of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and

glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. J Periodontol 2001;72:774-778.

Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. J Periodontol 2002;73:494-500.

Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. J Clin Periodontol 2005;32:266-272.

Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin and tumor necrosis factor- α secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. J Periodontol Res 2007;42:274-282.

Loesche W, Marshal GJ, Krause S, Kocher T, Kinane DF. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and plasma lipids in patients with destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 2005;32:640-644.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PME, Van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol 2000;71:1528-1534.

Mealey BL, Oates TW. American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. J Periodontol 2006;77:1289-1303.

Mishima Y, Kuyama A, Tada A, Takahashi K, Ishioka T, Kibata M. Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 2001;52:119-123.

Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor- α in a 2-way relationship. J Periodontol 2003;74:97-102.

- Paz K, Hemi R, LeRoith D, et al. A molecular basis for insulin resistance – elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997;272:29911-29918.
- Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:515-522.
- Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *American Journal of Epidemiology* 2001;152:897-907.
- Talbert J, Elter J, Jared HL, Offenbacher S, Southerland J, Wilder RS. The effect of periodontal therapy in TNF-alpha, IL-6 and metabolic control in type 2 diabetics. *J Dent Hyg* 2006;80:7-22.
- Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Sholssman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1996;67(10 Suppl):1085-93
- Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Mikihiro K, Shizukuishi S, Nomura M, Amano A. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol* 2006;77:15-20.
- Van der Poll T, Braxton CC, Coyle SM, Calvano SE, Hack CE, Lowry SF. Effect of hypertriglyceridemia on endotoxin response in humans. *Infect Immun* 1995;63:3396-4000.
- Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ. Effect of periodontal treatment on C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Research* 2005;40:53-58.

[No authors listed] American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2008;31:S55-S60.

[No authors listed] American Academy of Periodontology. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol;4:1-112.

[No authors listed] Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet. 1998;12:352(9131):837-53. Erratum in: Lancet 1999;354(9178):602.

[No authors listed] Position Paper. Periodontal Disease as a potential risk factor for systemic diseases. J Periodontol 1998;69:841-850.

Table 1. Median values (25th-75th percentiles) for visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) at baseline (time 1), 3 months after periodontal therapy (time 2) and the clinical improvement comparing both periods in the control group (C, n=20) and the diabetes group (D, n=20).

Periodontal variables	Groups	Time 1	Time 2	Improvement
VPI (%)	C	65.2 (51.1-79.1)	7.5 (5.8-10.5)	86.5 (83.8-91.5)
	D	85.3 (80.9-94.8)	15.0 (10.2-17.9)	83.4 (79.8-87.3)*
GBI (%)	C	38.9 (21.5-52.6)	3.5 (0.0-4.3)	91.4 (87.3-100.0)
	D	41.0 (31.0-62.1)	8.1 (5.8-10.4)	81.7 (69.8-87.7)*
BOP (%)	C	80.9 (67.1-89.2)	12.7 (8.4-20.0)	82.2 (71.3-90.6)
	D	94.7 (82.1-100.0)	25.6 (18.8-30.5)	72.1 (63.2-79.6)*
PD $\geq$ 4mm (%)	C	39.5 (29.5-52.0)	9.5 (4.0-13.0)	81.7 (60.4-87.9)
	D	55.5 (30.5-79.5)	14.5 (5.0-25.5)	71.9 (62.3-85.0)
CAL $\geq$ 4mm (%)	C	63.5 (53.5-77.0)	61.5 (49.5-67.0)	4.9 (-2.5-11.6)
	D	84.5 (61.0-92.0)	75.0 (48.0-87.5)	9.8 (0.0-25.6)

*: Significant differences in the clinical improvement between control and diabetes groups (Mann-Whitney U Test; $\alpha=5\%$).

Table 2. Median values (25th-75th percentiles) of high sensitive C-reactive protein (hs-CRP), fibrinogen (Fib), total cholesterol (TC), high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), triglycerides (TRG), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin (IL): IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 and IL-10 at baseline and 3 months after periodontal therapy in controls (n=20) and diabetics (n=20) at baseline (time 1) and at 3-month follow-up (time 2).

Markers	Control time 1	Control time 2	Diabetes time 1	Diabetes time 2
hs-CRP (mg/l)*	2.4 (1.3-3.8)	1.7 (1.1-3.2)	6.6 (4.3-10.6)	5.6 (2.1-9.1)
Fib (mg/dl)	315.0 (281.0-361.0)	315.0 (282.5-340.0)	368.1 (310.0-435.0)	329.5 (295.0-378.5) [†]
TC (mmol/l)	4.4 (4.0-4.9)	4.5 (4.1-5.2)	4.7 (4.4-5.4)	4.8 (4.4-5.6)
HDL- chol (mmol/l)	1.0 (0.9-1.4)	1.1 (0.9-1.3)	1.0 (0.9-1.1)	1.0 (0.8-1.2)
LDL- chol (mmol/l)	2.9 (2.2-3.3)	2.8 (2.4-3.3)	3.1 (2.4-3.6)	2.9 (2.1-3.9)
TRG (mmol/l)*	0.9 (0.8-1.8)	1.2 (0.9-1.4)	1.8 (1.3-2.5)	1.8 (1.1-3.3)
TNF- α (pg/ml)	4.4 (3.7-6.3)	4.2 (3.1-5.3)	5.5 (4.1-7.3)	4.5 (2.4-7.0) [†]
IL-1 β (pg/ml)	0.2 (0-0.7)	0.1 (0-0.4)	0.4 (0-1.3)	0.1 (0-1.0)
IL-4 (pg/ml)	0.3 (0-9.1)	0 (0-5.08)	4.6 (0-12.9)	0.1 (0-3.5)
IL-6 (pg/ml)	2.3 (1.5-3.3)	0.5 (0-3.1)	3.0 (2.1-4.2)	2.1 (0.8-3.9)
IL-8 (pg/ml)	2.0 (1.6-3.0)	1.9 (1.5-6.4)	3.0 (2.1-4.4)	2.2 (1.5-4.7)
IL-10 (pg/ml)	4.8 (1.4-22.2)	5.8 (0.8-13.7)	12.6 (2.2-26.6)	8.3 (3.4-12.7)

*: Significant difference between controls and diabetes groups in both periods (Mann-Whitney U Test; $\alpha=5\%$).

[†]: Significant difference in the same group comparing baseline (time 1) and 3-month follow-up (time 2) (Wilcoxon Test; $\alpha=5\%$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito da presente investigação foi avaliar clínica e imunologicamente o efeito da terapia periodontal não-cirúrgica em pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado. Critérios rigorosos de inclusão e exclusão da amostra foram aplicados com objetivo de eliminar os fatores de confusão que poderiam interferir na avaliação dos resultados deste estudo, como hábito de fumar, outros tipos de diabetes, nível de controle glicêmico e idade muito avançada dos pacientes. Entretanto, esses fatores geraram uma redução no número de sujeitos da amostra. Outro fator limitante foi a ausência de grupo placebo, isto é, indivíduos portadores de diabetes com periodontite que não receberam o tratamento periodontal, com o objetivo de avaliar o comportamento tecidual na presença da doença periodontal. Porém, a não realização da terapia periodontal nestes indivíduos tornaria inviável a aprovação do protocolo da pesquisa pelo Comitê de Ética desta Faculdade.

Baseado em estudos prévios que evidenciaram que pacientes com bom controle metabólico do diabetes podem responder ao tratamento periodontal não-cirúrgico de forma similar a pacientes sistemicamente saudáveis^{12,15}, e que indivíduos com pobre controle glicêmico podem exibir resposta menos favorável ao tratamento periodontal⁷⁶, no presente estudo foram incluídos somente indivíduos portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado, definido pela concentração de hemoglobina glicada A1c (HbA1c) > 7%^{19,80}, para testar a hipótese de que estes indivíduos poderiam apresentar boa resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico desde que submetidos a um efetivo programa de controle de placa bacteriana.

Este programa de controle de placa bacteriana realizado após término da terapia periodontal foi um fator importante do presente estudo que o diferenciou dos protocolos anteriormente descritos. Todos os pacientes receberam acompanhamento profissional, realizado rigorosamente a cada quinze dias, com objetivo de proporcionar um controle

satisfatório de placa bacteriana supragengival e obter maior cooperação e motivação dos pacientes em relação à manutenção da saúde bucal, com melhor resposta ao tratamento.

O presente estudo demonstrou que o tratamento periodontal não-cirúrgico realizado em portadores do Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado foi efetivo em reduzir sinais clínicos da inflamação periodontal. Adicionalmente, observou-se que principalmente derivados dos neutrófilos, como MMP-8, MMP-9 e atividade de elastase, como também IL-1 β reduziram significativamente em bolsas profundas, três meses após terapia, em ambos os grupos. Esses achados concordam com estudos prévios que avaliaram os níveis de elastase e MMP-8^{14,26,41} e níveis de IL-1 β ^{28,31} após tratamento periodontal em pacientes com periodontite. A exceção foi para quantidade total de IL-18 que não alterou significativamente em ambos os grupos após tratamento. Até o presente momento este é o primeiro estudo avaliando a IL-18 no fluido gengival de pacientes com diabetes.

Já em bolsas rasas, embora ambos os grupos apresentassem reduções significativas de IL-1 β e atividade de elastase, o grupo diabetes apresentou níveis significativamente mais elevados de ambos os marcadores após 3 meses de acompanhamento. Considerando que a IL-1 β é uma importante citocina pro-inflamatória envolvida na patogênese da periodontite³² e que o aumento dos níveis de atividade de elastase poderiam estar relacionados à ativação local de neutrófilos²⁴, tais achados podem indicar uma maior suscetibilidade à futura progressão da doença em bolsas rasas de portadores de Diabetes mellitus.

A utilização da tecnologia Luminex para avaliação de numerosas citocinas e mediadores concomitantemente oferece importantes vantagens, como a necessidade de limitado volume de amostra para obtenção de múltiplos resultados, a diminuição da demanda do tempo dispensado às atividades laboratoriais, a redução do custo dos reagentes e as variedades de painéis com diferentes marcadores/citocinas já pré-estabelecidos. Um estudo prévio⁶⁴ verificou alto grau de concordância entre os testes realizados pelas técnicas Multiplex e ELISA (correlação de 84,5%) concluindo que o

Luminex é um método eficaz para avaliação imunológica de citocinas e mediadores inflamatórios.

Apesar de nossos achados evidenciarem que os pacientes portadores do Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado apresentam boa resposta à terapia periodontal não-cirúrgica, a cooperação (*compliance*) parece ser diferente entre os grupos. Após três meses de acompanhamento, os percentuais de placa visível, sangramento marginal, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem apresentaram-se significativamente mais elevados no grupo diabetes. Concordando com Bridges et al.¹⁰ (1996) e Campus et al.¹² (2005) que verificaram maior percentual de sítios com placa visível no grupo diabetes. Este resultado é suportado por outros estudos que descreveram maiores níveis de placa em indivíduos com pobre controle metabólico⁴³ e melhor cooperação (*compliance*) entre aqueles bem controlados⁷⁴. É aceitável que a motivação do paciente e a atitude perante o tratamento do diabetes são fatores cruciais, e determinam, ao menos parcialmente, se será alcançado o ideal de controle glicêmico como conseqüente prevenção das complicações crônicas¹⁸ que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos, além de acarretar altos custos para o controle metabólico e tratamento de suas complicações.

De forma semelhante, a saúde periodontal é amplamente dependente dos hábitos de higiene bucal desses pacientes, o que parece estar relacionado com sua atitude em relação à adesão ao tratamento do diabetes. Foi por esta razão que no presente estudo os indivíduos portadores de Diabetes mellitus Tipo 2, com controle metabólico inadequado foram submetidos a um rigoroso controle de placa bacteriana, visando alcançar uma maior conscientização quanto a importância de sua adesão ao tratamento na busca pelo sucesso do mesmo.

A concentração de HbA1c reduziu após terapia periodontal, entretanto esta redução não alcançou significância. Este resultado concorda com achados prévios^{3,15-16,63,71,75,82} e foi recentemente confirmado em uma meta-análise⁴⁰. Outros estudos observaram significativa melhora no controle glicêmico após terapia periodontal convencional^{23,45,57,66,73} ou combinada

com uso de antibioticoterapia^{2,33,39}. Esses achados dificultam a interpretação devido à presença de numerosos fatores de confusão nestes estudos como tamanho inadequado da amostra, inclusão de indivíduos com diabetes tipo 1 e 2 na mesma amostra, ausência de descrição do grau de controle glicêmico, uso de tabaco, índice de massa corporal, medicações variadas, ausência de grupo controle (sem o diabetes) entre outros. Uma possível limitação do nosso estudo é o curto período de acompanhamento (três meses) para avaliação de alterações no controle glicêmico, uma vez que a vida útil da hemoglobina associada à glicose é de três meses. Além disso, o diabetes é multifatorial e o descontrole metabólico pode envolver outros fatores, como o aumento do percentual de indivíduos obesos, falta de adesão ao tratamento sistêmico, tratamentos ineficazes e presença de infecções.

No presente estudo os pacientes portadores de diabetes apresentaram níveis significativamente maiores de índice de massa corporal (IMC) e proteína C-reativa circulantes em comparação com os achados no grupo controle. Um elevado IMC está associado com aumento do número e tamanho de adipócitos, células com alta atividade metabólica capazes de produzirem grandes quantidades de TNF- α e IL-6⁵⁵. A elevada produção destas citocinas podem estimular maior produção hepática de proteína C-reativa, o que poderia aumentar a resistência insulínica⁵⁶ e contribuir para o descontrole metabólico.

A hiperglicemia característica dos pacientes com diabetes pode vir acompanhada de dislipidemia, a qual inclui mudanças qualitativas e quantitativas das lipoproteínas e transtornos no metabolismo de lípidos³⁷, principalmente redução HDL e hipertrigliceridemia⁷. Muitos estudos têm demonstrado uma associação da dislipidemia não só com diabetes³⁶, mas também com a doença periodontal^{17,38,44}. No presente estudo, níveis significativamente mais elevados de triglicérides foram encontrados nos pacientes portadores de diabetes com doença periodontal. Entretanto, o tratamento periodontal não foi efetivo em reduzir os níveis de triglicérides para ambos os grupos, concordando com estudos prévios que demonstraram mínima influência do tratamento periodontal em pacientes com diabetes^{15,45}. Esses achados aumentam a possibilidade de que os níveis desses marcadores possam estar elevados em

consequência da obesidade/resistência insulínica. Adicionalmente, visto que os pacientes com diabetes apresentaram pior cooperação (*compliance*) em relação ao tratamento periodontal comparado aos indivíduos sistemicamente saudáveis, estes podem apresentar também menor atenção a hábitos saudáveis em geral, incluindo dieta, exercícios e outros fatores que afetam o perfil lipídico.

Em relação ao efeito sistêmico do tratamento periodontal, este foi capaz de reduzir níveis plasmáticos de TNF- α e fibrinogênio nos indivíduos portadores de diabetes. Entretanto, os níveis desses marcadores não foram diferentes entre os grupos para ambos os períodos. TNF- α têm sido reportado por apresentar papel importante na patogênese do Diabetes mellitus Tipo 2⁸. Um estudo transversal demonstrou haver associação entre níveis circulantes de TNF- α e severidade da doença periodontal em pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2²¹. Porém, estudos longitudinais avaliando o efeito tratamento periodontal nos níveis de TNF- α circulantes são conflitantes. Iwamoto et al.³⁹ (2001) apresentaram resultados similares ao presente estudo, com redução significativa de TNF- α após tratamento; entretanto, os autores empregaram terapia periodontal não-cirúrgica associada ao uso de antibiótico local. Já outros estudos não reportaram tal redução de TNF- α após terapia periodontal em pacientes com diabetes^{50,75}.

O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado, considerado um bom marcador de inflamação aguda. No presente estudo, o tratamento periodontal reduziu os níveis sistêmicos de fibrinogênio em pacientes com Diabetes mellitus Tipo 2, concordando com os achados prévios de Christgau et al.¹⁵ (1998). Em contraste, Lalla et al.⁵⁰ (2007) num estudo com uma amostra reduzida de indivíduos com diabetes (n=10) não observaram diferença significativa no nível de fibrinogênio após um mês do tratamento periodontal. Entretanto, a reduzida amostra pode ter sido um fator limitante deste estudo. Claramente, novos estudos são necessários para definir se a periodontite desenvolve papel causal na inflamação sistêmica associada com diabetes.

Finalmente, apesar da limitação quanto ao tamanho da amostra, os resultados desta pesquisa revelaram que o tratamento periodontal não-cirúrgico em portadores de Diabetes

mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado pode reduzir marcadores inflamatórios no fluido sulcular gengival com conseqüente melhora dos parâmetros clínicos periodontais. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito desse tipo de terapia sobre a condição sistêmica.

CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, concluiu-se que:

1. O tratamento periodontal não-cirúrgico foi efetivo em melhorar a condição clínica periodontal e reduzir a quantidade total de interleucina 1 β , atividade de elastase, metaloproteinase de matriz 8 e 9 no fluido gengival de pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado e indivíduos sistemicamente saudáveis.
2. O tratamento periodontal foi efetivo em reduzir níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral α e fibrinogênio, porém não teve influência significativa sobre o perfil lipídico e o controle glicêmico de pacientes portadores de Diabetes mellitus Tipo 2 com controle metabólico inadequado.

REFERÊNCIAS*

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25: 229-35.
2. Albridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Yiberti G, Wilson RF. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1995; 22: 271-5.
3. Al-Mubarak S, Ciancio S, Aljada A, Awa H, Hamouda W, Ghanim H, et al. Comparative evaluation of adjunctive oral irrigation in diabetics. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 295-300.
4. Alpagot T, Wolff LF, Smith OT, Tran SD. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. *J Clin Periodontol*. 1996; 23: 982-8.
5. Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res*. 2001; 36: 169-74.
6. American Academy of Periodontology. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4: 1-112.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2008; 31: S55-S60.
8. Argiles JM, Lopez-Soriano J, Lopez-Soriano FJ. Cytokines and diabetes: the final step? Involvement of TNF-alpha in both type I and II diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 1994; 26: 447-9.
9. Bacic M, Plancak DD, Granic, M. CPITN assessment of periodontal disease in diabetic patients. *J Periodontol*. 1988; 59: 816-22.

* De acordo com estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol.* 1996; 67: 1185-92.
11. Bulut U, Develioglu H, Taner IL, Berker E. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J Oral Sci.* 2001; 43: 171-7
12. Campus G, Salem A, Sacco G, Maida C, Cagetti MG, Tonolo G. Clinical effects of mechanical periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 75: 368-9.
13. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2003; 31: 167-80.
14. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 366-9.
15. Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 112-24.
16. Collin HL, Uusitupa M, Niskanen L, Kontturi-Narhi V, Makkanen H, Koivisto AM, et al. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1998; 69: 962-6.
17. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipdemia. *J Periodontol.* 1999; 70: 1313-21.
18. Drash AL, Becker DJ. Behavioral issues in patients with diabetes mellitus, with special emphasis on the child and adolescent. In: Rifkin H, Porte D Jr, editors. *Diabetes Mellitus theory and practice* 4th ed. New York: Elsevier; 1990. p. 992-1034.
19. Dcct Research Group. Diabetes control and complications trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 329: 977-86.

20. Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol.* 2006; 77: 2040-50.
21. Engebretson S, Chertog R, Nichols A, Hey-Hadavi J, Celenti R, Grbic J. Plasma levels of tumor necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 18-24.
22. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1b and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004; 75: 1203-8.
23. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 591-8.
24. Figueredo CMS, Fischer RG, Gustafsson A, Firatli E. Aberrant neutrophil reactions in periodontitis. *J Periodontol.* 2005; 76: 951-5.
25. Figueredo CMS, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol.* 1999; 70: 1457-63.
26. Figueredo CMS, Areas A, Miranda LA, Fischer RG, Gustafsson A. The short-effectiveness of non-surgical treatment in reducing proteases activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 615-9.
27. Fine DH, Mandel ID. Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 533-46.
28. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000; 71: 1535-45.
29. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-3

30. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 112-43.
31. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004; 32: 511-20.
32. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74: 391-401.
33. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, et al. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol*. 1997; 68: 713-9.
34. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: A two-way relationship. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 51-61.
35. Guillot JP, Pollock SM, Johnson RB. Gingival Interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol*. 1995; 66: 667-72.
36. Howard BV. Diabetes and plasma lipoproteins in native Americans. *Studies of the Pima Indians. Diabetes Care*. 1993; 16 (suppl 1): 284-91.
37. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*. 1987; 28: 613-28.
38. Iacopino AM, Cluter CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol*. 2000; 71: 1375-84.
39. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, et al. The effects of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor- α and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2001; 72: 774-8.
40. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res*. 2005; 84: 1154-9.

41. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Söder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 604-14.
42. Jones JA, Miller DR, Wehler CJ, Rich SE, Krall-Kaye EA, McCoy LC, et al. Does periodontal care improve glycemic control? The Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 46-52.
43. Karjalainen KM, Knuuttila ML, Von Dickhoff KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J Periodontol.* 1994; 65: 1067-72.
44. Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol.* 2002; 73: 494-500.
45. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 266-72.
46. Kjersem H, Hiltsted J, Madsbad S, Wandall JH, Johansen KS, Borregaard N. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction during short-term metabolic changes from normo- to hyperglycemia type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Infection.* 1988; 16: 215-21.
47. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: Assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53.
48. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2006; 77: 1803-8.
49. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and health subjects. *J Oral Sci.* 1999; 41: 163-7.

50. Lalla E, Kaplan S, Yang J, Roth GA, Papapanou PN, Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin and tumor necrosis factor- α secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. *J Periodontol Res*. 2007; 42: 274-82.
51. Loe H. The sixth complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16: 329-34.
52. Lu HK, Yang PC. Cross-sectional analysis of different variables of patients with non-insulin dependent diabetes and their periodontal status. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2004; 24: 71-9.
53. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137 (Suppl): 26S-31S.
54. Mealey BL, Rethman MP. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today*. 2003; 22: 107-13.
55. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metabol*. 1997; 82: 4196-200.
56. Natali A, Toschi E, Baldeweg S, Ciociaro D, Favilla S, Sacca L, et al. Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55: 1133-40.
57. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetics patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 835-43.
58. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992; 267: 14998-15004.
59. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77: 1072-7.

60. Oliver RC, Tervonen T. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with general population. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124: 71-6.
61. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin-1 β , interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 256-60.
62. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 1-36.
63. Promsudthi A, Pimapsri S, Deerochanawong C, Kanchanasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis.* 2005; 11: 293-8.
64. Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 36: 1037-44.
65. Reinhardt RA, Masada MP, Payne JB, Allison AC, DuBois LM. Gingival fluid IL-1 β and IL-6 levels in menopause. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 22-5.
66. Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003; 74: 1361-7.
67. Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 24-9.
68. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol.* 1997; 68: 127-35.
69. Seppala B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 161-5.
70. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 421-6.

71. Smith GT, Greenbaum CJ, Johnson BD, Persson GR. Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol.* 1996; 67: 794-802.
72. Soskolne WA. Epidemiological and clinical aspects of periodontal disease in diabetics. *Ann Periodontol.* 1998; 3: 3-12.
73. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 306-10.
74. Syrjälä AM, Knecht M, Knuuttila M. Dental self-efficacy as a determinant to oral health behavior, oral hygiene and HbA1c level among diabetic patients. *J Clin Periodontol.* 1999; 26: 616-21.
75. Talbert J, Elter J, Jared HL, Offenbacher S, Southerland J, Wilder RS. The effect of periodontal therapy in TNF-alpha, IL-6 and metabolic control in type 2 diabetics. *J Dent Hyg.* 2006; 80: 7-22.
76. Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 505-10.
77. Tervonen T, Oliver RD. Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 432-5.
78. Tervonen T, Knuuttila M, Pohjamo L, Nurkkala H. Immediate response to non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 65-8.
79. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the U.S. adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30: 182-92.
80. Uk Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients type 2 diabetes. *Lancet.* 1998; 352: 837-53.

81. Yan SD, Schmidt AM, Andersson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994; 269: 9889-97.
82. Westfelt E, Rylander H, Blome G, Jonasson P, Lindhe J. The effect of periodontal therapy in diabetics. Results after 5 years. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 92-100.

ANEXOS

			
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA Comitê de Ética em Pesquisa			
Certificado			
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DO EFEITO DO TRATAMENTO PERIODONTAL CONVENCIONAL EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2. ANÁLISE CLÍNICA E IMUNOLÓGICA", sob o protocolo nº 60/04, de responsabilidade do Pesquisador (a) FERNANDA DE OLIVEIRA BELLO CORRÊA, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.			
Certify that the research project titled "LONGITUDINAL EVALUATION OF THE PERIODONTAL TREATMENT EFFECT IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS", protocol number 60/04, under Dr FERNANDA DE OLIVEIRA BELLO CORRÊA responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 03 (three) years when the final review of this study will occur.			
Araraquara, 28 de outubro de 2004. Profª Drª Mirian Aparecida Onofre Coordenadora			



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – ODONTOLOGIA ARARAQUARA

Pesquisa: “Avaliação longitudinal do efeito do tratamento periodontal convencional em pacientes diabéticos tipo 2. Análise clínica e imunológica”.

Pesquisadora responsável: Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

_____,(nacionalidade)_____

_____, (profissão)_____, portador do R.G.

_____, C.I.C. _____,residente à Rua/Av

_____, na cidade de _____,

Estado de _____, concordo em participar da pesquisa intitulada: “Avaliação

longitudinal do efeito do tratamento periodontal convencional em pacientes diabéticos tipo 2.

Análise clínica e imunológica”. Fui informado que o objetivo desta pesquisa é estudar a associação

do Diabetes Mellitus, com a presença de alterações nos meus dentes e gengiva que possam estar

relacionadas à doença de gengiva e comparar com os achados em pacientes não diabéticos e que

também apresentam a doença de gengiva. Fui esclarecido que, para tanto, deverei responder a um

questionário de saúde, serei submetido a exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença

de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva, exame radiográfico de todos os dentes e coleta de

amostras do fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e a superfície do dente).

Além disso, autorizo a coleta de uma amostra de sangue para avaliação do meu controle glicêmico

(quantidade de glicose presente no sangue) e de substâncias relacionadas à inflamação. Estou ciente

de que este procedimento envolve riscos como contaminação e pode vir acompanhado de dor e

hematomas (manchas arroxeadas) na área. Entretanto, fui informado de que os riscos serão

minimizados com a realização da coleta de sangue por um profissional especializado utilizando

material apropriado, estéril e descartável. Após a coleta serão realizados os seguintes exames de

sangue: glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada, hemograma, proteína C reativa, velocidade de

hemossedimentação e fibrinogênio. Estou ciente que as coletas de fluido gengival e amostra de

sangue serão realizadas em dois momentos, inicialmente e 90 dias após o término do tratamento

periodontal para verificar se houve melhora nos parâmetros imunológicos e naqueles que

apresentam substâncias associadas à inflamação. Os exames de sangue laboratoriais serão

realizados no Núcleo de Atendimento à comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Araraquara – UNESP.

Fui informado também que, como parte do estudo, receberei tratamento gengival

completo, o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário, e que

consistirá de limpeza dos dentes para remoção de tártaro e placa bacteriana e instruções de higiene

bucal. Tenho o conhecimento de que, caso seja necessária a realização de alguma cirurgia de

gengiva, o material que porventura venha a ser removido, será encaminhado para o laboratório para

análise das características deste tecido.

Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos aos quais serei submetido estão

relacionados à utilização de anestésicos locais de rotina no atendimento odontológico, e à realização

de radiografias de boca toda. Em relação aos riscos que os anestésicos podem causar, estes serão

evitados pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anestésico ou

alterações na pressão arterial e, caso sejam relatadas alterações de qualquer natureza, serei

encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver

autorização do profissional. Em relação às radiografias, usarei avental e um colar de chumbo como

medida de proteção.

Torno ciente que recebi todas as informações sobre a minha participação nesta pesquisa e receberei novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da mesma. Fui esclarecido que não terei gastos extras, a não ser o deslocamento, e que meu consentimento não tira a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa. Existem riscos particulares para o grupo portador de Diabetes mellitus tipo 2, portanto, continuarei sob acompanhamento com o meu endocrinologista responsável e este estará ciente que receberei tratamento periodontal. Se houver complicações metabólicas decorrente do Diabetes e meu médico julgar importante a minha exclusão da pesquisa, serei imediatamente excluído da mesma. Além disso, tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

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

Caso haja qualquer problema ou dúvida quanto ao tratamento odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar a pesquisadora responsável, Dra Fernanda de Oliveira Bello Corrêa, pelo telefone: (16) 201-6360, a qual se responsabilizará pela assistência integral necessária.

Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade em consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (016) 201-6432 ou (016) 201 6434.

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

Araraquara, ____ de _____ de 200_.

Assinatura do Paciente

Assinatura da Pesquisadora Responsável
C.D. Fernanda de Oliveira Bello Corrêa



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – ODONTOLOGIA ARARAQUARA

Pesquisa: “Avaliação longitudinal do efeito do tratamento periodontal convencional em pacientes diabéticos tipo 2. Análise clínica e imunológica”.

Pesquisadora responsável : Fernanda de Oliveira Bello Corrêa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

_____,
(nacionalidade)_____, (profissão)_____,
portador do R.G. _____, C.I.C. _____,
residente à Rua/ Av. _____, na cidade
de _____, Estado de _____, concordo em

participar da pesquisa intitulada: “Avaliação longitudinal do efeito do tratamento periodontal convencional em pacientes diabéticos tipo 2. Análise clínica e imunológica”. Fui informado que o objetivo desta pesquisa é estudar a associação do Diabetes Mellitus, com a presença de alterações nos dentes e gengiva que possam estar relacionadas à doença de gengiva e comparar com os achados em pacientes não diabéticos e que também apresentam a doença de gengiva. Fui esclarecido que, para tanto, deverei responder a um questionário de saúde, serei submetido a exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva, exame radiográfico de todos os dentes e coleta de amostras do fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e a superfície do dente). Além disso, autorizo à coleta de uma amostra de sangue para confirmação da ausência do Diabetes Mellitus e avaliação de substâncias relacionadas à inflamação. Estou ciente de que este procedimento envolve riscos como contaminação e pode vir acompanhado de dor e hematomas (manchas arroxeadas) na área. Entretanto, fui informado de que os riscos serão minimizados com a realização da coleta de sangue por um profissional especializado utilizando material apropriado, estéril e descartável. Após a coleta serão realizados os seguintes exames de sangue: hemograma, glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada, proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação e fibrinogênio. Estou ciente que as coletas de fluido gengival e amostra de sangue serão realizadas em dois momentos, inicialmente e 90 dias após o término do tratamento periodontal para verificar se houve melhora nos parâmetros imunológicos e naqueles que apresentam substâncias associadas à inflamação. Os exames de sangue laboratoriais serão realizados no Núcleo de Atendimento à comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Fui informado também que, como parte do estudo, receberei tratamento gengival completo, o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário, e que consistirá de limpeza dos dentes para remoção de tártaro e placa bacteriana e instruções de higiene bucal. Tenho o conhecimento de que, caso seja necessária à realização de alguma cirurgia de gengiva, o material que porventura venha a ser removido, será encaminhado para o laboratório para análise das características deste tecido.

Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos aos quais serei submetido estão relacionados à utilização de anestésicos locais de rotina no atendimento odontológico, e à realização de radiografias de boca toda. Em relação aos riscos que os anestésicos podem causar, estes serão evitados pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anetésico ou alterações na pressão arterial e, caso sejam relatadas alterações de qualquer natureza, serei encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver autorização do profissional. Em relação as radigrafias, usarei avental e um colar de chumbo como medida de proteção.

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

a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa. Além disso, tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização.

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

Caso haja qualquer problema ou dúvida quanto ao tratamento odontológico durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de ligar para a pesquisadora responsável, Dra Fernanda de Oliveira Bello Corrêa, pelo telefone: (16) 201-6360, a qual se responsabilizará pela assistência integral necessária.

Além disso, estou ciente que possuo plena liberdade em consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para qualquer informação em relação à pesquisa da qual participo, pelo telefone (016) 201-6432 ou (016) 201 6434.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino esse Termo de Consentimento.

Araraquara, ____ de _____ de 200_.

Assinatura do paciente

Assinatura da Pesquisadora Responsável
C.D. Fernanda de Oliveira Bello Corrêa

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

Araraquara, 25 de março de 2008.

FERNANDA DE OLIVEIRA BELLO CORRÊA