

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

CARLUCI TAÍS BELTRAN

**DIABETES PROMOVE POTENCIALIZAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR E CAUSA DESEQUILÍBRIO ENTRE MMPs E COLÁGENO EM
CAMUNDONGOS COM DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Araçatuba – SP

2016

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

CARLUCI TAÍS BELTRAN

**DIABETES PROMOVE POTENCIALIZAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR E CAUSA DESEQUILÍBRIO ENTRE MMPs E COLÁGENO EM
CAMUNDONGOS COM DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, como parte parcial dos requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba – SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B453d Beltran, Carluci Taís.
Diabetes promove potencialização da reabsorção óssea alveolar e causa desequilíbrio entre MMPs e colágeno em camundongos com doença periodontal experimental / Carluci Taís Beltran. - Araçatuba, 2016
76 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Doenças periodontais 2. Diabetes mellitus 3. inflamação
4. Metaloproteases 5. Colágeno I. Título

CDD 612

CARLUCI TAÍS BELTRAN

Nascimento: 19 de Janeiro de 1990

Localidade: Birigui – São Paulo

Filiação: Carlos Geraldo Beltran e Vera Lúcia Bordin Beltran

2008 – 2011: Graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário de Votuporanga – UNIFEV, Votuporanga - SP

2012 – 2014: Pós – graduação *Lato Sensu* em Biologia Molecular e Genética em Ciências da Saúde, pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto - SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Carlos e Vera, minha irmã Camila e ao meu noivo Allison

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família, aos meus pais Carlos e Vera, por toda a educação e exemplo recebidos durante todos estes anos; por todo esforço que fizeram para que pudesse alcançar meus objetivos, e por todo amor e incentivo que recebi durante esta trajetória. Agradeço também a minha irmã Camila por todo apoio e carinho recebido.

Agradeço ao meu noivo Allison por toda a paciência, compreensão e apoio durante a execução deste trabalho, e por todo amor e carinho de sempre.

Aos meus tios, Marcos e Adriana, e minha prima Ana Clara, pelo apoio, carinho, e hospitalidade quando passei uma temporada em São Paulo para cumprir as disciplinas na USP.

A minha orientadora, professora Sandra Helena Penha de Oliveira pela oportunidade de grande aprendizagem, e pelo crescimento profissional e científico.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas por todo auxílio e contribuição científica, principalmente as professoras Cristina Antoniali e Suely Bonfim pela grande contribuição com o presente trabalho por meio do Exame Geral de Qualificação.

Ao professor Edilson Ervolino, professor Luciano Tavares Angelo Cintra e Mariane Azuma por todo suporte, auxílio e orientação na execução das metodologias referentes aos processamentos histológicos.

A pós-graduanda Paula Faleiros pelo ensinamento e auxílio para realização dos cortes histológicos das mandíbulas dos camundongos.

A todos os amigos que torceram por mim, principalmente aos amigos do departamento de Ciências Básicas, pela amizade, companheirismo e diversão que tornaram meus dias mais alegres.

Aos meus amigos de laboratório, a Farmaco B, por todo apoio, auxílio, carinho e amizade. Aos amigos que já passaram, Ingrid, Taís, Thamine, Caril, Carla e Antonio. E, aos amigos que continuam dividindo a bancada, as meninas da iniciação científica, Fernanda, Jéssica, Ayná, Maria Fernanda, Mariana e Carol, e aos queridos amigos da pós-graduação Aline, Dayane, Letícia e Victor, que nunca mediram esforços para me ajudar, e sem o auxílio destes seria muito mais árdua a trajetória até a conclusão deste trabalho.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba e a todos seus funcionários por todo auxílio e suporte.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

RESUMO

BELTRAN, C.T. DIABETES PROMOVE POTENCIALIZAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR E CAUSA DESEQUILÍBRIO ENTRE MMPs E COLÁGENO EM CAMUNDONGOS COM DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araçatuba. 2016.

A doença periodontal (DP) e o diabetes mellitus (DM) são doenças inflamatórias crônicas, e quando associadas aumentam a destruição da região periodontal. Por esta razão, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel do diabetes sobre o processo inflamatório, reabsorção óssea alveolar, produção de metaloproteinase de matriz (MMP), colágeno e TGF- β 1 em camundongos com DP experimental. Foram utilizados 40 camundongos Balb/c machos de 18 – 22 g, distribuídos igualmente em 4 grupos, sendo estes, normal (N), normal com doença periodontal (N+DP), diabético (DM) e diabético com doença periodontal (DM+DP). O diabetes foi induzido por tratamento com estreptozotocina 200 mg/kg por via intraperitoneal. Passados 7 dias os índices glicêmicos foram verificados, e os animais foram considerados diabéticos quando a glicemia apresentava-se igual ou superior a 250 mg/dL. Posteriormente, os camundongos do grupo com DP foram submetidos a uma ligadura em torno dos primeiros molares inferiores, e no 15^o dia, estes animais foram eutanasiados e as amostras foram coletadas para as análises seguintes. O tecido gengival marginal foi coletado para as análises de marcadores inflamatórios, tais como, níveis de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 por ELISA, expressão gênica de MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 por RT-PCR em tempo real, e atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 por zimografia. Os parâmetros de reabsorção de osso alveolar, recrutamento de neutrófilos e quantificação de colágeno também foram avaliados, pelo processamento histológico das hemimandíbulas, os quais apresentaram diferença significativa no grupo DM+DP. A DP foi capaz de aumentar a produção de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1, contudo somente a produção de CXCL2 e CCL3 foi aumentada no grupo DM+DP. A expressão gênica de MMP-2 não apresentou diferença estatística nos grupos analisados, em contrapartida a expressão de MMP-9 foi diminuída com a DP, apresentado diferença significativa no grupo DM+DP, assim como a expressão de TGF- β 1 e col1a2. Nos grupos com DP, houve aumento significativo na atividade de MMP-2 e MMP-9, com potencializada atividade de MMP-

2 no grupo DM+DP. Em resumo, nós observamos que o DM mais a DP agravam a resposta inflamatória e processo destrutivo na região periodontal, caracterizada por aumento da migração de neutrófilos, reabsorção óssea, aumento na produção de CXCL2 e CCL3, aumento na atividade de MMP-2 e diminuição da porcentagem de colágeno, sugerindo assim um desequilíbrio no reparo tecidual da região periodontal.

Palavras chave: doenças periodontais, diabetes mellitus, inflamação, metaloproteases, colágeno

ABSTRACT

BELTRAN, C.T. DIABETES POTENTIATES ALVEOLAR BONE RESORPTION AND CAUSES IMBALANCE BETWEEN COLLAGEN AND MMPs IN MICE WITH EXPERIMENTALLY INDUCED PERIODONTAL DISEASE. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araçatuba. 2016.

Periodontal disease (DP) and diabetes mellitus (DM) are chronic inflammatory diseases that when associated increase destruction in the periodontal region. Then, the aim of our study was to evaluate the role of DM in inflammatory process, bone resorption, matrix metalloproteinase (MMP), collagen and TGF- β 1 production during periodontal disease experimental in mice. Forty Balb/c mice 18-22 g were used, divided equally into 4 groups, normal (N), normal with periodontal disease (N+DP), diabetic (DM), diabetic with periodontal disease (DM+DP). The diabetes was induced by 200 mg/kg streptozotocin via intraperitoneal. After of 7 days the glycemic indices was evaluated, and animals were considered diabetics than blood glucose has become equal to or greater than 250 mg/dL. Mice of the DP group had a ligature around the first molars, and 15th day, the animals were euthanized and samples were collected for the following analyzes. The gingival tissue was collected to analysis inflammatory markers, such as CXCL2, CCL3 and TGF- β 1 levels by ELISA; gene expression of MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 and col1a2 by real time RT-PCR; and MMP-2 and MMP-9 enzyme activity by zymography. The parameters of alveolar bone resorption, neutrophil recruitment and collagen quantification also were evaluated by histological processing of the hemimandibles, which showed significant difference in DM+DP group. Periodontal disease was able to increase CXCL2, CCL3 and TGF- β 1 production, however only CXCL2 and CCL3 production were increased in the DM+DP group. Gene expression of MMP-2 was not significant altered in the groups analyzed, however expression de MMP-9 was reduced in the DP, meanly in the DM+DP group, well as expression of TGF- β 1 and col1a2. In addition, groups with periodontal disease showed significant enhance in the activity of the MMP-2 and MMP-9, with high level activity of MMP-2 in the DM+DP group. In summary, it was possible to observe that diabetes plus DP aggravate inflammatory and destructive process of periodontal region, characterized by increased in the neutrophil migration and bone resorption, higher CXCL2 and CCL3 production, and increase in the MMP-

2 activity with change of the amount of collagen, suggesting an imbalance in tissue repair of periodontal region.

Key words: periodontal diseases, diabetes mellitus, inflammation, metalloproteases, collagen

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diabetes potencializa perda óssea e infiltrado inflamatório em camundongos com doença periodontal experimental 50
- Figura 2.** Doença periodontal induz produção de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 em tecido gengival de camundongos normais e diabéticos 52
- Figura 3.** Expressão gênica de MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 é reduzida em tecido gengival de camundongos diabéticos com doença periodontal 54
- Figura 4.** Doença periodontal altera perfil enzimático de MMP-2 e MMP-9 55
- Figura 5.** Colágeno está reduzido na região periodontal em camundongos diabéticos submetidos à doença periodontal 57

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA= Albumina sérica bovina
CaCl₂= Cloreto de cálcio
CCL3= Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA= Comissão de Ética de Uso de Animais
col1a2= Colágeno tipo 1a2
CT= Ciclo limiar
CXCL2= Proteína inflamatória de macrófago 2
D= Diabético
DM+DP= Diabético com doença periodontal
DEPC= Dimetilpirocarbonato
DM= Diabetes mellitus
DNase= Nuclease que catalisa a degradação do DNA
DP= Doença periodontal
EDTA= Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA= Ensaio de imunoabsorção enzimática
H&E= Hematoxilina & Eosina
HCl= Ácido clorídrico
MEC= Matriz extracelular
MMP= Metaloproteinase de matriz
MMP-2= Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9= Metaloproteinase de matriz 9
N= Normal
N+DP= Normal com doença periodontal
nm= Nanômetros
OPG= osteoprotegerina
PBS= Tampão fosfato salino
PCR= Reação em cadeia de polimerase
RANKL= ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B
RNA= Ácido ribonucleico
RNAm= Ácido ribonucleico mensageiro

RNAse= Nuclease que catalisa a degradação do RNA

rpm= Rotação por minuto

RQ= Quantificação relativa

RT-PCR= Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction – Transcriptase reversa de reação em cadeia de polimerase

SDS= Sulfato dodecil de sódio

TA= Temperatura ambiente

TGF- β 1= Fator de transformação de crescimento beta 1

TMB= 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 Introdução e síntese bibliográfica | 27 |
| 2 Objetivos | 36 |
| 2.1 Objetivos gerais | 36 |
| 2.3 Objetivos específicos | 36 |
| 3 Materiais e métodos | 39 |
| 3.1 Animais e aspectos éticos | 39 |
| 3.2 Indução de diabetes | 39 |
| 3.3 Indução de doença periodontal experimental | 40 |
| 3.4 Processamento histológico | 40 |
| 3.5 Análise histomorfométrica | 41 |
| 3.6 Análise do processo inflamatório no tecido | 41 |
| 3.7 Detecção da produção de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 por ELISA | 41 |
| 3.8 Análise da expressão gênica de MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 por RT-PCR em tempo real | 42 |
| 3.8.1 Extração e quantificação do RNA total | 42 |
| 3.8.2 Transcrição reversa | 44 |
| 3.8.3 PCR quantitativo | 44 |
| 3.9 Detecção da atividade de MMP-2 e MMP-9 por zimografia | 45 |
| 3.10 Quantificação de colágeno nos cortes histológicos | 46 |
| 3.11 Análise estatística | 47 |
| 4 Resultados | 49 |
| 4.1 Indução da doença periodontal experimental nos camundongos normais e diabéticos causa reabsorção óssea e recrutamento de neutrófilos | 49 |
| 4.2 Produção de CXCL2 e CCL3 está aumentada em tecido gengival de camundongos diabéticos com doença periodontal | 51 |
| 4.3 Diabetes diminui a expressão gênica de MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 em tecido gengival de camundongos com doença periodontal experimental | 53 |
| 4.4 Atividade de MMP-2 e MMP-9 está aumentada na doença periodontal | 55 |
| 4.5 Diabetes reduz o colágeno da região da furca em camundongos com doença periodontal experimental | 56 |
| 5 Discussão | 59 |

6 Conclusão

69

Referências

71

**INTRODUÇÃO E
SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA**

1 Introdução e síntese bibliográfica

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica que ocasiona danos aos elementos que dão suporte e sustentação aos dentes, representados por gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Gurkan, Emingil et al. 2006, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011). Esta doença é caracterizada por destruição dos tecidos periodontais, resultando em formação de bolsa periodontal, perda de tecido conjuntivo e perda de osso alveolar, podendo levar à mobilidade dos dentes (Loe 1993, Iacopino 2001). Gengivite é a forma mais branda da DP, sendo reversível após a remoção do fator etiológico, já a periodontite, é a forma mais agressiva da doença causando comprometimento das estruturas de suporte dental, acarretando eventual perda dos dentes (Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015).

O principal fator etiológico da DP é o biofilme, no qual estão presentes micro-organismos, que em combinação com a susceptibilidade do hospedeiro e fatores ambientais, podem iniciar o desenvolvimento da DP (Llambes, Arias-Herrera et al. 2015). Estas bactérias presentes no biofilme produzem fatores de virulência, os quais além de atuarem diretamente no tecido, estimulam as células residentes à liberarem mediadores que atuam no processo da inflamação, causando assim prejuízos à região periodontal (Iacopino 2001, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011). Dentre estes mediadores, podemos destacar alguns tipos de citocinas inflamatórias, as quais estão envolvidas na imunopatologia das periodontites, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), estas favorecem o recrutamento leucocitário, aumentam a liberação de outros mediadores inflamatórios secundários agravando ainda mais a inflamação,

estimulam a liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs), diminuem a síntese de colágeno, e favorecem a reabsorção óssea (Iacopino 2001, Liao, Fei et al. 2014, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DP podem resumir-se em tabagismo, alcoolismo, sexo, obesidade, síndrome metabólica, osteoporose, falta de cálcio e vitamina D, estresse, fatores genéticos, e diabetes (Genco and Borgnakke 2013).

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes, o diabetes mellitus (DM) é uma doença comumente encontrada na população e vem crescendo progressivamente; só no ano de 2015, mundialmente, foram registradas 415 milhões de pessoas com diabetes mellitus, e a estimativa para 2040 é de aumento para 642 milhões de indivíduos, mostrando assim a grande importância de estudos voltados a esta problemática.

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica multifatorial caracterizada por hiperglicemia (Wu, Xiao et al. 2015). Pode ser classificada em 3 categorias: diabetes tipo 1, ocasionado por reações auto-imunes contra as células beta pancreáticas, causando deficiência na produção de insulina, ou até mesmo perda total em sua secreção, comumente encontrada em crianças e adolescentes; diabetes tipo 2, o tipo mais comum da doença, onde há a resistência à insulina, ou insuficiência relativa de insulina; e, diabetes gestacional, causada por intolerância à glicose, desenvolvida durante o período de gestação (Matthews 2002).

A hiperglicemia, principal característica do DM, é responsável por vários fatores que contribuem para as complicações diabéticas clássicas, tais como nefropatias, neuropatias, retinopatias, doenças vasculares, inclusive o desenvolvimento e exacerbação da DP (Wu, Xiao et al. 2015). Durante a cronicidade do diabetes, ocorre instalação de um quadro hiperglicêmico e isto favorece

interações não-enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados, e, proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos, os então denominados produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais se ligam aos seus receptores específicos (RAGES), presentes em vários tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais e células imunes, levando a diminuição da produção de colágeno, aumento da permeabilidade celular e aumento da liberação de quimiocinas, fatores que contribuem para a destruição periodontal (Grossi and Genco 1998, Iacopino 2001, Bascones-Martinez, Matesanz-Perez et al. 2011, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015).

Vários estudos tem demonstrado que o diabetes aumenta não só o risco, mas também a gravidade da DP (Pranckeviciene, Siudikiene et al. 2014, Stanko and Izakovicova Holla 2014). Em experimentos com ratos diabéticos com periodontite foi observado aumento nos níveis de TNF- α e IL-1 β , sendo que, estas citocinas além de serem responsáveis pelo processo da DP como mencionado anteriormente, também estão relacionadas com o favorecimento do quadro diabético, principalmente o TNF- α , o qual tem sido associado com resistência à insulina (Mishima, Kuyama et al. 2001, Jiang, Cui et al. 2013), mostrando assim a relação bidirecional entre estas duas doenças. A resposta imune também sofre alteração com a associação do DM com a DP (Manouchehr-Pour, Spagnuolo et al. 1981, McMullen, Van Dyke et al. 1981). Os neutrófilos que são células do sistema imunológico, atuam na região do periodonto de modo a controlar a progressão do biofilme por meio da fagocitose e liberação do conteúdo de seus grânulos (Nauseef 2007). Quando a DP ocorre em um indivíduo diabético, a resposta dos neutrófilos apresenta-se comprometida, tanto na aderência, quimiotaxia, e poder microbicida (Manouchehr-Pour, Spagnuolo et al. 1981). Outra característica comumente observada na DP e prejudicada pela

presença do diabetes é a reabsorção óssea (Sima and Glogauer 2013, Wu, Xiao et al. 2015). A alteração do metabolismo ósseo é uma das importantes complicações ocorridas a longo prazo associada a DP e ao DM (Wu, Xiao et al. 2015). O desequilíbrio entre o ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG) tem se mostrado um possível mecanismo para explicar os prejuízos ósseos em indivíduos diabéticos com DP (Beam, Parsons et al. 2002, Sima and Glogauer 2013). Além disso, o quadro hiperglicêmico reduz a diferenciação e proliferação de osteoblastos, bem como a produção de colágeno (Beam, Parsons et al. 2002, Sima and Glogauer 2013).

As quimiocinas também podem ter um importante papel no contexto periodontal. Quimiocinas nada mais são que um grupo de proteínas com baixo peso molecular que estimulam e ou ativam o recrutamento dos leucócitos (Graves and Jiang 1995). Geralmente, são mediadores pró-inflamatórios secundários, sendo induzidas por outros fatores, os mediadores pró-inflamatórios primários, como IL-1 β ou TNF- α (Graves and Jiang 1995). A grande maioria de seus efeitos biológicos, é por intermédio de receptores específicos acoplados a proteína G, que ativam várias vias de sinalização intracelulares (Rossi and Zlotnik 2000). A denominação das quimiocinas foi dada de acordo com a posição do resíduo de cisteína na molécula, sendo divididas em, famílias das C, CXC, CC e CX3C quimiocinas (Zlotnik and Yoshie 2000). As CC e CXC quimiocinas, estão envolvidas em muitas doenças, inclusive na DP (Driscoll 1994, Menten, Wuyts et al. 2002). A quimiocina CCL3, da família CC, é um fator quimioatraente para neutrófilos e macrófagos, com importante papel no reparo tecidual, e tem sido considerado um importante biomarcador de DP, em virtude de estar presente em concentrações elevadas em modelos dessa doença. (Driscoll 1994, Menten, Wuyts et al. 2002, Garlet, Avila-Campos et al. 2005,

Sexton, Lin et al. 2011, Al-Sabbagh, Alladah et al. 2012, Fine, Markowitz et al. 2014, Souto, Queiroz et al. 2014). Outra importante quimiocina é a CXCL2, pertencente à família CXC, também um potente quimioatraente para neutrófilos, e está envolvida em vários processos patológicos, como por exemplo, câncer, destruição óssea, e DP (Driscoll 1994, Graves and Jiang 1995, Miyauchi, Kitagawa et al. 2004, Oue, Lee et al. 2012). Além da DP, o diabetes também promove desregulação destas duas quimiocinas, o que favorece um perfil pró-inflamatório, o qual poderá ocasionar ou agravar prejuízos na região periodontal (Naguib, Al-Mashat et al. 2004, Duarte, Bezerra et al. 2014).

Como a DP e o DM são doenças inflamatórias crônicas, durante seu desenvolvimento é comum ser observado alterações na estrutura tecidual, estas alterações podem ocorrer devido as respostas ocasionadas pela inflamação, visto que as células imunes podem liberarem uma série de substâncias, as quais podem prejudicar a homeostasia dos processos de reparo tecidual (Steinsvoll, Halstensen et al. 1999, Iacopino 2001, Silva, Lorencini et al. 2008, Monea, Mezei et al. 2012). Alguns fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), pode estar envolvido nestes processos. O TGF- β compreende uma família de fatores de crescimento polipeptídios, distribuídas em 3 principais isoformas, TGF- β 1, 2 e 3, sendo que TGF- β 1 é a isoforma mais abundante nos tecidos (Branton and Kopp 1999, Han, Li et al. 2012). O TGF- β 1 exerce um papel antagônico, ora atua como citocina pró-inflamatória, ora como anti-inflamatória, mais precisamente envolvida no reparo tecidual (Okada and Murakami 1998, Branton and Kopp 1999, Han, Li et al. 2012). Em processos inflamatórios, o TGF- β 1 promove ativação de células T naíve em células com padrão Th17, as quais liberam vários mediadores atuantes na inflamação, assim evidenciando seu efeito

pró-inflamatório (Han, Li et al. 2012). Em contrapartida, também atua nos processos de reparo tecidual, estimulando a síntese de componentes de matriz extracelular (MEC) favorecendo a produção de tecido conjuntivo, e algumas vezes podem diminuir a degradação de proteínas de matriz, por inibir a produção de enzimas proteolíticas como as MMPs (Skaleric, Kramar et al. 1997, Okada and Murakami 1998, Branton and Kopp 1999, Han, Li et al. 2012).

Outro fator importante no reparo tecidual, e que devemos dar atenção é a produção de colágeno. O colágeno é uma proteína fundamental para todos os tecidos, pois é um importante constituinte da MEC (Sivan, Hayes et al. 2014). Os fibroblastos são as principais células produtoras de colágeno, principalmente no tecido gengival (Havemose-Poulsen and Holmstrup 1997). Existem diversos tipos de colágeno (Gordon and Hahn 2010), porém os mais abundantes no organismo são os tipos 1, 2 e 3 (Lodish, Berk et al. 2000). O colágeno tipo 1 é o constituinte orgânico mais abundante no osso alveolar, este é expresso por osteoblastos e compõem cerca de 90% da matriz óssea (Becker, Schuppan et al. 1986). A DP é capaz de reduzir a porcentagem das fibras de colágeno nos tecidos periodontais, acarretando assim comprometimento das estruturas do periodonto (Seguier, Gogly et al. 2001, Ejeil, Igondjo-Tchen et al. 2003, Lorencini, Silva et al. 2009). O diabetes também altera a produção de colágeno, visto que ratos diabéticos mostraram diminuição significativa da produção de colágeno em cartilagem articular e tecido ósseo parietal (Spanheimer, Umpierrez et al. 1988), mostrando assim que a associação da DP com o DM pode promover graves problemas na região periodontal por redução da quantidade de colágeno. Esta redução de colágeno geralmente é associada a ação de enzimas proteolíticas capazes de degradarem estas estruturas, tais como as MMPs (Birkedal-Hansen 1993, Kim, Chung et al. 2013).

As MMPs são endopeptidases com mecanismos catalíticos dependentes de íons cálcio e zinco, e são produzidas por uma variedade de células, tais como, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, células ósseas, células epiteliais e endoteliais (Ryan and Golub 2000). As MMPs são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, como por exemplo o colágeno, possuindo assim função na homeostasia tecidual (Birkedal-Hansen 1993). Semelhantemente como todas as proteinases secretadas, a atividade das MMPs é regulada pela expressão gênica, compartimentalização, ativação de pró-enzimas, inativação enzimática, e ainda podem ser controladas pela disponibilidade e afinidade do substrato (Parks, Wilson et al. 2004). Apesar das MMPs estarem envolvidas na homeostasia da matriz extracelular do tecido saudável, também pode iniciar processos de destruição tecidual em doenças inflamatórias (Yucel-Lindberg and Bage 2013). A expressão e atividade das MMPs é relativamente baixa em indivíduos saudáveis, porém quando mediante as condições patológicas como doenças inflamatórias e crescimento tumoral, há um significativo aumento da expressão e atividade (Sorsa, Tjaderhane et al. 2004).

As MMPs são subdivididas em collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MT-MMPs, e outras MMPs (Sorsa, Tjaderhane et al. 2004). Entre as MMPs, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) têm sido extensivamente estudadas por serem responsáveis pela degradação proteolítica da matriz extracelular, sendo capazes de degradar colágeno e outros componentes da membrana basal, contribuindo significativamente com várias doenças, inclusive a doença periodontal (Sakalihan, Delvenne et al. 1996, Clark, Krekoski et al. 1997, Achong, Nishimura et al. 2003, Ejeil, Igondjo-Tchen et al. 2003, Sorsa, Tjaderhane et al. 2004, Lorencini, Silva et al. 2009, Chao, Chuang et al. 2016). Estudos mostraram que há aumento de

MMP-2 durante 21 dias de DP experimental em animais (Achong, Nishimura et al. 2003), além disso pacientes com periodontites mostraram aumento de MMP-9 em fluido de sulco gengival em relação a indivíduos saudáveis (Rai, Kharb et al. 2008), indicando que MMP-2 e MMP-9 podem contribuir para o processo patológico da DP, sendo indicadores preditivos relevantes para a progressão de periodontite (Kim, Chung et al. 2013). O diabetes também pode alterar a produção de MMPs, especialmente MMP-2 e MMP-9, pois indivíduos diabéticos apresentaram níveis plasmáticos elevados destas MMPs, em comparação aos indivíduos não diabéticos, o que pode refletir em alterações no metabolismo de componentes de MEC (Derosa, D'Angelo et al. 2007), o desequilíbrio entre a atividade das MMPs e a quantidade dos constituintes da MEC são extremamente prejudiciais aos processos de reparo tecidual. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel do DM sobre o processo inflamatório, reabsorção óssea, produção de MMPs, colágeno e TGF- β 1 em camundongos com DP experimental, e encontrar um provável mecanismo para essas alterações.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel do diabetes sobre o processo inflamatório, reabsorção óssea, produção de MMPs, colágeno e TGF- β 1 em camundongos com DP experimental.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar nossos objetivos avaliamos:

- 1- O recrutamento celular para o local da lesão periodontal;
- 2- O nível de reabsorção óssea alveolar induzida pela presença das bactérias;
- 3- A produção das quimiocinas CXCL2, CCL3 e citocina TGF- β 1 em tecido gengival de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal;
- 4- A expressão gênica de MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 em tecido gengival de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal;
- 5- A atividade da enzima MMP-2 e MMP-9 em tecido gengival de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal;

6- A quantidade de colágeno em cortes de mandíbulas de camundongos normais e diabéticos com doença periodontal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e métodos

3.1 Animais e aspectos éticos

Para realização deste trabalho foram utilizados 40 camundongos Balb/c machos de 18 - 22 g provenientes do biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Estes animais permaneceram em uma sala climatizada com temperatura em torno de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade $55\% \pm 3\%$, com sistema de exaustão, ciclo claro/escuro de 12 horas, e com consumo de água e ração à vontade. Os camundongos foram distribuídos igualmente em quatro grupos, sendo estes: normal (N), normal com doença periodontal (N+DP), diabético (DM), e diabético com doença periodontal (DM+DP). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Araçatuba-SP, Brasil, processo n^o 00393-2015.

3.2 Indução de diabetes

A indução do diabetes foi realizada por meio de injeção intraperitoneal de estreptozotocina 200 mg/Kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparada em tampão citrato 100 mM pH 4,5. Os animais do grupo normal receberam somente administração do tampão. Sete dias após, uma alíquota de sangue equivalente a uma gota foi retirada por meio de um pique na cauda dos animais para dosagem dos níveis de glicemia por glicosímetro (OneTouch Ultra 2, Johnson & Johnson Medical, Milpitas, CA, USA). Os camundongos foram considerados diabéticos quando os níveis de glicose apresentaram-se maiores ou iguais a 250 mg/dL (Kim, Choi et al. 2014).

3.3 Indução de doença periodontal experimental

A doença periodontal experimental foi induzida em animais normais, e animais diabéticos, nestes logo após a comprovação dos índices glicêmicos, para a formação dos grupos N+DP e DM+DP. Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (50 mg/Kg - Cetamin, Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) com cloridrato de xilazina (2% - Calmiun, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil). Foi inserida uma ligadura com fio de seda 4,0 (Shalon, Goiânia, GO, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior, em ambos os lados. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados por *overdose* de cloridrato de quetamina (100 mg/kg) mais xilazina (10 mg/kg). Então as hemimandíbulas e o tecido gengival marginal puderam ser coletados cirurgicamente para análises posteriores (de Molon, Mascarenhas et al. 2015).

3.4 Processamento histológico

As hemimandíbulas foram fixadas em formaldeído tamponado 4% por 24 horas, e desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA - Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) 10% por 45 dias. Após, os tecidos foram processados em soluções seriadas de álcool e xilol para desidratação, e em sequência incluídos em parafina. Para a confecção das lâminas, cortes seriados de 5 µm de espessura foram coletados para a detecção do primeiro molar e suporte periodontal. As análises histológicas foram feitas por meio de coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômio de Masson (Bonato, do-Amaral et al. 2012).

3.5 Análise histomorfométrica

Após a coloração de H&E, as lâminas foram fotografadas em aumento de 100x por câmera digital (Leica, DFC 450, Wetzlar, HE, Alemanha) acoplada em um microscópio de luz (Leica, DM4000 B LED, Wetzlar, HE, Alemanha). De modo eliminar os backgrounds derivados dos processos de captura das imagens, foi feita correção de brilho, balanço de cor e contraste das figuras. A área de osso alveolar então pode ser mensurada (μm^2) na região da furca pelo software Image J (Versão 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Saadi-Thiers, Huck et al. 2013, de Molon, Mascarenhas et al. 2015).

3.6 Análise do processo inflamatório no tecido

O infiltrado inflamatório também foi analisado nas lâminas coradas com H&E por microscopia de luz (Olympus, CX31, Shinjuku, Tóquio, Japão). A contagem de células inflamatórias foi feita pelo número de células circundantes entre a crista óssea inter-radicular e o ponto da bifurcação das raízes, em 10 campos contados em aumento de 1000x (Bonato, do-Amaral et al. 2012).

3.7 Detecção da produção de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 por ELISA

A produção de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 foram quantificadas do tecido gengival marginal dos camundongos, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Primeiramente o tecido gengival foi homogeneizado em tampão com inibidores de proteases e armazenados em freezer -80 até o momento das análises. Posteriormente placas de 96 poços foram incubadas com anticorpos primários anti-CXCL2 e anti-CCL3 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) diluídos em tampão fosfato salino 1x (PBS 1x) por 17 horas à 4°C. Posteriormente, as placas foram

lavadas com solução de lavagem, e bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente (TA) com PBS 1x mais albumina sérica bovina (BSA) 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após, as placas foram lavadas e o anticorpo recombinante (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), para confecção da curva padrão, ou amostras foram adicionadas e incubadas por 3 horas em TA. Depois deste período, as placas foram novamente lavadas, e o anticorpo secundário (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), correspondente a cada alvo, foi incubado por 1 hora em TA. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionadas estreptoavidina conjugada com peroxidase (1:2000) por 30 minutos em TA. Passado este tempo, após lavagem da placa, foi adicionado solução de substrato cromogênico 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos à TA. A reação então, foi parada com solução de ácido sulfúrico 1M (Gomes, Filho et al. 2008).

A produção de TGF- β 1 foi avaliada por kit comercial Quantikine Elisa (SMB100B – R&D systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com instruções previamente descritas pelos fabricantes.

A quantificação da cor produzida nas reações foi feita por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 foi calculada em pg/mL por comparação com os resultados da curva padrão.

3.8 Análise da expressão gênica de MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 por RT-PCR em tempo real

3.8.1 Extração e quantificação do RNA total

A extração do RNA total foi realizada por meio da adição do reagente Trizol (Life Technologies - Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) aos tecidos gengivais seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para tanto, após a homogeneização dos tecidos em 1 mL de Trizol, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha), logo em seguida, os tubos foram vigorosamente agitados e mantidos em repouso à TA por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 g, por 15 minutos, e a fase aquosa superior de cada tubo foi retirada e acondicionada em tubos novos. Para precipitação do RNA foram adicionados 1 mL de álcool isopropílico (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha) para cada 1 mL de fase aquosa coletada. Então, as amostras foram estocadas a -20 °C *overnight*.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados à 4°C e 13000 g, por 15 minutos, para obtenção dos precipitados. Posteriormente, estes precipitados foram lavados com etanol (Merck, Millipore - Darmstadt, HE, Alemanha) a 75% e novamente centrifugados à 4°C e 10000 g, por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e os precipitados formados foram dissolvidos em 15 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e estocados em freezer a -80 °C. Para quantificação do RNA total, alíquota de 2 µL de cada amostra de RNA obtido foi diluída em 98 µL de água destilada ultra pura - livre de DNase/RNase. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), considerando as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm.

3.8.2 Transcrição reversa

Com o propósito de eliminar possíveis contaminações por DNA genômico, o RNA total das amostras foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, com a utilização de kit High Capacity (AppliedBiosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), ambos os kits, foram feitos de acordo com instruções do fabricante.

3.8.3 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio das reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), em um aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizadas pela mesma empresa. São elas: MMP-2 (Mm00439498-m1), MMP-9 (Mm00442991-m1), TGF-β1 (Mm01178820-m1) e colágeno 1a2 (Mm00483888-m1). Paralelamente, também foi realizada à amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada disponibilizada pela mesma empresa: β-actina (Actb –Mm00607939) fluoróforo VIC.

Para obtenção da melhor eficiência da reação, foram realizadas diluições seriadas de um pool de amostras de cDNA (1:2, 1:4; 1:8; 1:16, 1:32 e 1:64), utilizando as concentrações dos reagentes para o sistema Taqman determinadas previamente.

Para realização do ensaio adicionou-se a microplacas alíquotas de 2 µL do cDNA na melhor diluição encontrada no teste descrito acima, reagentes Taqman

Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies - Carlsbad, CA, USA), mais as sondas, tudo como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. Esta reação de amplificação compreende em 2 minutos à 50°C; 10 minutos à 95°C; e 40 ciclos de 15 segundos à 95°C, e 1 min à 60°C, conforme recomendado pela empresa. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). Para cada grupo, foi detectado o valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar) tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação foi detectado. O valor do CT do gene alvo foi subtraído do valor do CT do normalizador e resultou no valor de ΔCT ; o valor de ΔCT do gene alvo foi então subtraído do valor do ΔCT do calibrador (controle), e foi encontrado o valor de $\Delta\Delta CT$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representou a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak and Schmittgen 2001). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências das sondas inventoriadas utilizadas.

3.9 Detecção da atividade de MMP-2 e MMP-9 por zimografia

A atividade de MMP-2 e MMP-9 foi analisada por ensaio de zimografia em gel de gelatina. O tecido gengival foi homogeneizado em tampão de lise por sonicador (Sonics Vibra Cell, Newtown, CT, USA), seguido de centrifugação e coleta do sobrenadante. Neste sobrenadante foram adicionados tampão não-redutor 5x, composto por: 0,05% de azul de bromofenol, 10% de dodecil sulfato de sódio - SDS, Trizma Base 1,5 M e 50% de glicerol (todos Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Então estas amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) copolimerizado com 0,8% de substrato de gelatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O gel então foi submetido a eletroforese, com corrida realizada em temperatura de 4°C por volta de 5 horas. Depois da eletroforese, o gel foi lavado em 2 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 2 vezes de 30 minutos cada, para renaturação das proteínas. Após, o gel foi incubado em solução de 50 mmol/L Trizma Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 5mmol /L CaCl₂ (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) pH 7,4, à 37°C por 15 horas. Posteriormente o gel foi lavado por 2 vezes em água destilada, e foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue composta por 30% de solução de metanol (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), 10% de ácido acético (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 0,5% corante Coomassie Brilliant Blue (BioRad, Filadélfia, PA, USA) por 60 minutos. Em sequência, o gel foi descorado em solução descorante com 30% de metanol (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e 10% de ácido acético (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 30 minutos. A gelatina degradada foi visualizada em zonas claras de destruição, em relação ao plano de fundo azul. Ao término do ensaio o gel foi digitalizado por scanner e as imagens foram submetidas à inversão de cores e contraste automático para serem analisadas por densitometria no software Scion Image (ScionCorp. Frederick, MD, USA) (Chaves Neto, Yano et al. 2010).

3.10 Quantificação de colágeno nos cortes histológicos

A presença de colágeno foi verificada nos cortes das mandíbulas dos camundongos normais e diabéticos, com e sem DP, por coloração com kit para tricrômio de Masson (Easy Path, São Paulo, SP, Brasil). A presença de colágeno é

representada por coloração azul nos cortes histológicos, enquanto a coloração vermelha representa queratina. Os procedimentos experimentais foram executados como recomendado pelo fabricante.

As imagens dos cortes foram capturadas em aumento de 100x por câmera digital (Leica, DFC 450, Wetzlar, HE, Alemanha), acoplada em um microscópio de luz (Leica, DM4000 B LED, Wetzlar, HE, Alemanha), e a coloração azul, foi quantificada na região da furca pelo software Image J (Versão 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Tejiram, Zhang et al. 2016).

3.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM), submetidos a teste estatístico *one-way* ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni. Foram considerados valores estatisticamente significantes de $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6 (Graph Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Indução da doença periodontal experimental nos camundongos normais e diabéticos causa reabsorção óssea e recrutamento de neutrófilos

No sentido de confirmar a doença periodontal após 15 dias de indução, avaliamos a presença de reabsorção óssea em torno do primeiro molar onde ocorreu a ligadura, e o recrutamento celular decorrente do processo inflamatório. Na figura 1 podemos verificar que houve a instalação da DP tanto em camundongos normais (D, E, F), quanto em camundongos diabéticos (J, K, L). Devido a isto observamos reabsorção de osso alveolar na crista óssea interdental e inter-radicular, além disso, temos um recrutamento de células inflamatórias para a região da furca. Os grupos controles, N (A, B, C) e DM (G, H, I) permaneceram com a região periodontal inalterada.

As medidas de área óssea mostraram que a DP foi capaz de causar reabsorção de osso alveolar em ambos os grupos, N+DP e DM+DP. Entretanto, o grupo DM+DP mostrou perda óssea mais significativa, quando comparado ao grupo N+DP (figura 1M).

Um aumento significativo do infiltrado de células inflamatórias, mais precisamente de neutrófilos, também foi observado nos grupos N+DP e DM+DP, comparados com seus respectivos controles N e DM. O infiltrado de neutrófilos foi mais pronunciado no grupo DM+DP comparado ao grupo N+DP (Figura 1N). O número de linfócitos, macrófagos e eosinófilos no local da inflamação, não foram significativos (dados não apresentados).

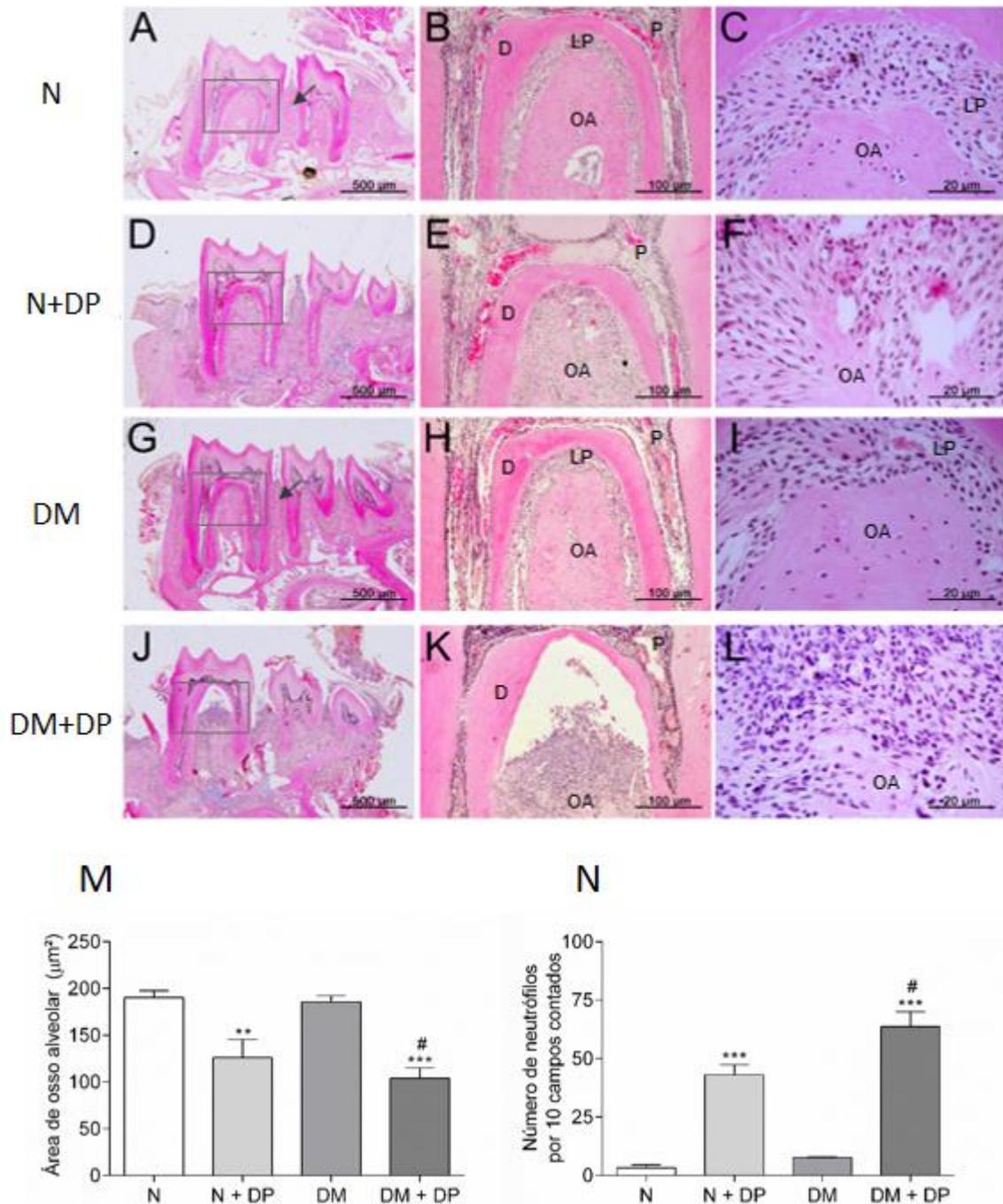


Figura 1 Diabetes potencializa perda óssea e infiltrado inflamatório em camundongos com doença periodontal experimental. Cortes histológicos dos primeiros molares inferiores de 5 animais corados com H&E, dos grupos normal - N (A, B, C), normal com doença periodontal - N+DP (D, E, F), diabético - DM (G, H, I) e diabético com doença periodontal DM+DP (J, K, L). O símbolo seta = osso alveolar interdental; P = polpa dental; D = dentina; LP = ligamento periodontal e OA = osso alveolar inter-radicular. Medida de área de osso alveolar por μm^2 usando software Image J (M). Recrutamento de neutrófilos entre a crista óssea inter-radicular e a bifurcação das raízes, por 10 campos contados (N). Resultados expressam média \pm EPM. Valores significativos estão representados por, ** $p < 0,01$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (DM+DP vs. DM) e # $p < 0,05$ (DM+DP vs. N+DP).

4.2 Produção de CXCL2 e CCL3 está aumentada em tecido gengival de camundongos diabéticos com doença periodontal

A DP foi capaz de aumentar os níveis de CXCL2, CCL3 e TGF- β 1 em ambos os grupos, N+DP e DM+DP, quando comparados aos grupos controles N e DM (figura 2). A produção de CXCL2 e CCL3 foi potencializada nos animais com diabetes (DM+DP) (figura 2A e B). Com relação a produção de TGF- β 1, houve um ligeiro aumento em animais DM+DP, porém não estatisticamente significativa (Figura 2C).

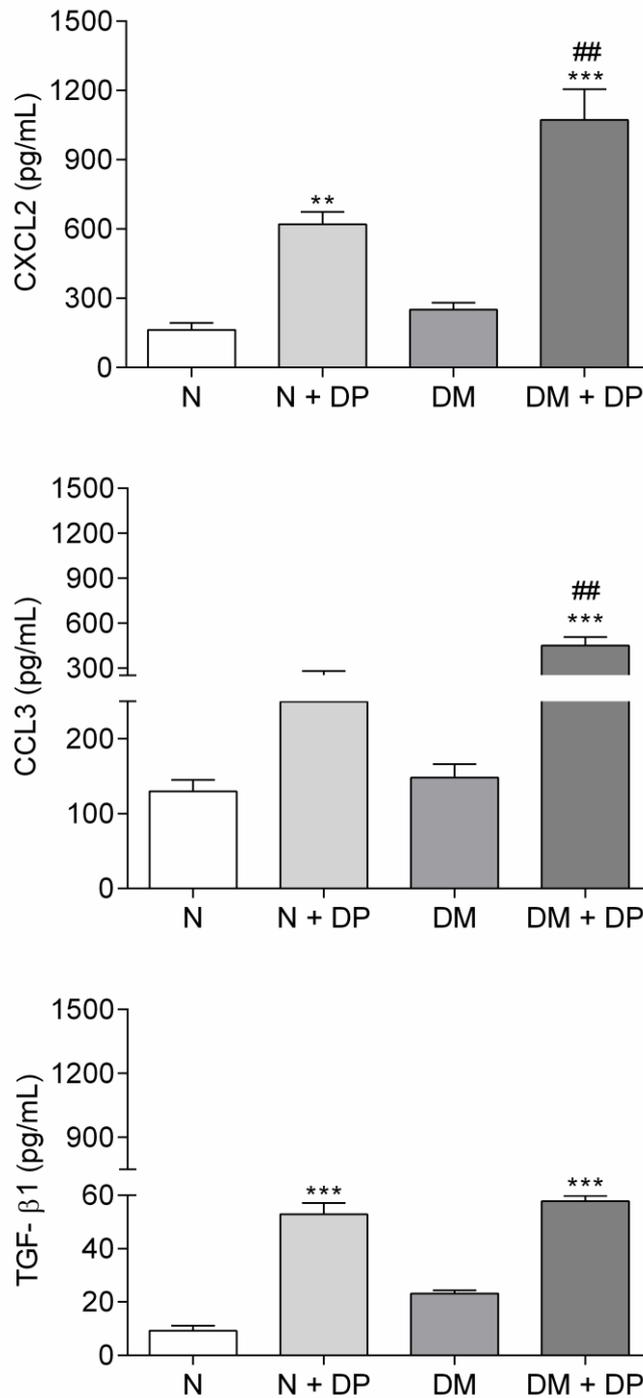


Figura 2 Doença periodontal induz produção de CXCL2, CCL3 e TGF-β1 em tecido gengival de camundongos normais e diabéticos. Níveis de CXCL2 (A), CCL3 (B), TGF-β1 (C) por pg/mL em tecido gengival de camundongos dos grupos normal (N), normal com doença periodontal (N+DP), diabético (DM) e diabético com doença periodontal (DM+DP) por ELISA. Resultados expressam média ± EPM. Valores significativos estão representados por, ** $p < 0,01$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (DM+DP vs. DM) e ## $p < 0,01$ (DM+DP vs. N+DP).

4.3 Diabetes diminui a expressão gênica de MMP-9, TGF- β 1 e col1a2 em tecido gengival de camundongos com doença periodontal experimental

A expressão gênica de MMP-2 não apresentou diferença estatística nos grupos analisados (figura 3A), no entanto, podemos observar uma ligeira diminuição nos animais com DP (N+DP e DM+DP). Em relação à expressão de MMP-9, houve uma redução nos grupos com DP, apresentado uma diferença estatisticamente significativa somente no grupo DM+DP (figura 3B).

A DP também foi capaz de reduzir a expressão gênica de TGF- β 1 em ambos os grupos, N+DP e DM+DP, quando comparados a seus grupos controles N e DM. Interessantemente, o grupo DM+DP também apresentou uma diminuição mais significativa de TGF- β 1 em comparação ao grupo N+DP (figura 3C).

Em relação à expressão de colágeno tipo 1, podemos observar diminuição significativa de col1a2 nos grupos diabéticos, principalmente no grupo DM+DP, quando comparado ao N+DP (figura 3D).

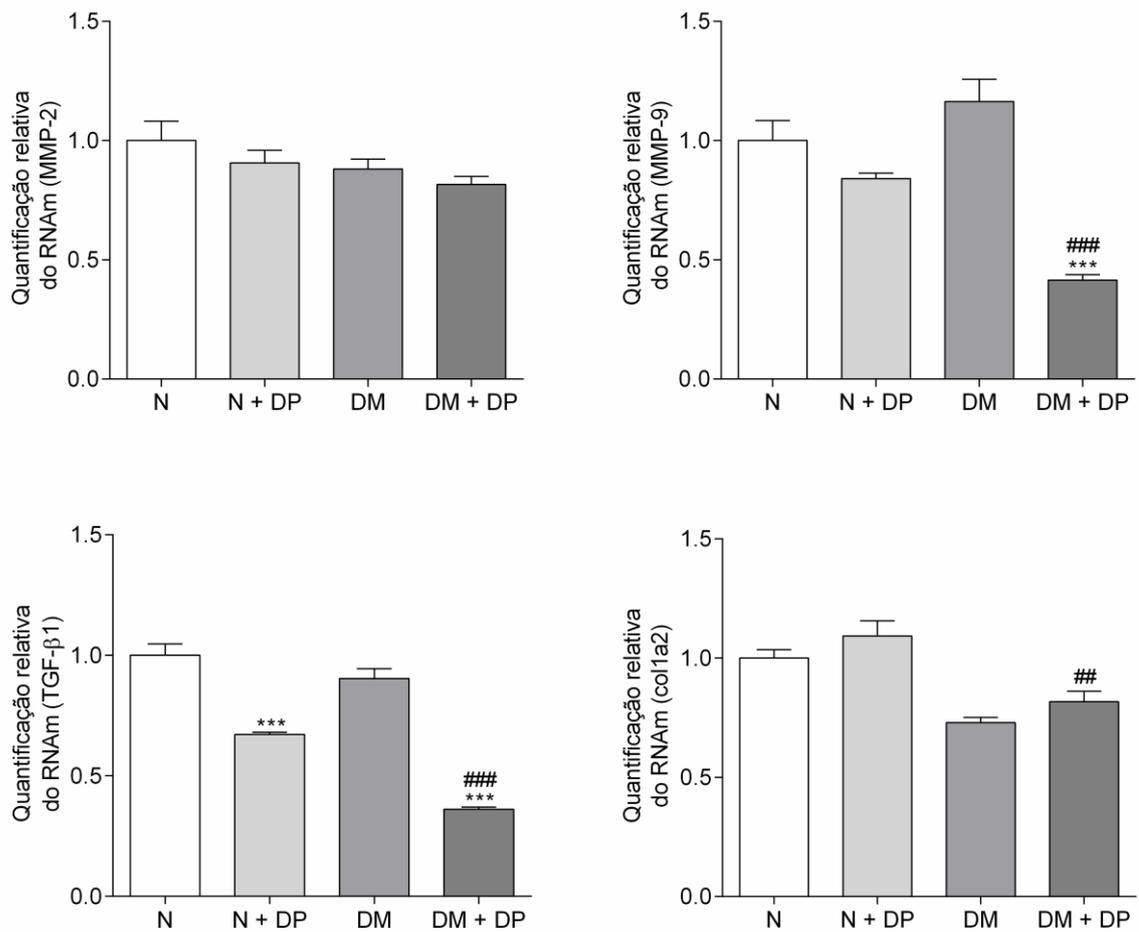


Figura 3 Expressão gênica de MMP-9, TGF-β1 e col1a2 é reduzida em tecido gengival de camundongos diabéticos com doença periodontal. Expressão gênica de MMP-2 (A), MMP-9 (B), TGF-β1 (C) e col1a2 (D) em tecido gengival de camundongos dos grupos normal (N), normal com doença periodontal (N+DP), diabético (DM) e diabético com doença periodontal (DM+DP), por PCR em tempo real. Resultados expressam média ± EPM, normalizados por fold change. Valores significativos estão representados por, *** $p < 0,001$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (DM+DP vs. DM); ### $p < 0,001$ (DM+DP vs. N+DP) e ## $p < 0,01$ (DM+DP vs. N+DP).

4.4 Atividade de MMP-2 e MMP-9 está aumentada na doença periodontal

A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada por zimografia em amostras de tecido gengival (figura 4). Animais com DP apresentaram atividade elevada das MMPs, em comparação aos grupos sem DP. A atividade enzimática de MMP-2 foi potencializada no grupo DM+DP (figura 4A), e a MMP-9 foi ligeiramente reduzida neste grupo.

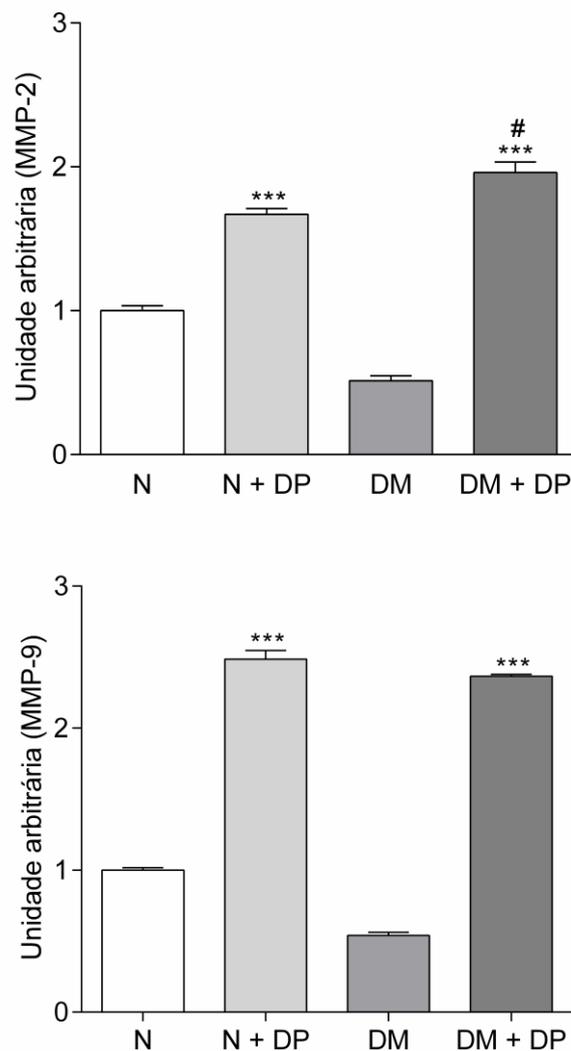


Figura 4 Doença periodontal altera perfil enzimático de MMP-2 e MMP-9. Análise da atividade de MMP-2 (A) e MMP-9 (B) por zimografia em tecido gengival de camundongos dos grupos normal (N), normal com doença periodontal (N+DP), diabético (DM) e diabético com doença periodontal (DM+DP). Resultados expressam média \pm EPM, normalizados por fold change. Valores significativos estão representados por, ***p < 0,001 (N+DP vs. N); **p < 0,001 (DM+DP vs. DM) e #p < 0,05 (DM+DP vs. N+DP).

4.5 Diabetes reduz o colágeno da região na furca em camundongos com doença periodontal experimental

Na figura 5 podemos observar a presença de colágeno pela coloração azul nos cortes histológicos, pela técnica de tricrômio de Masson (figura 5 A – L). Visualmente podemos verificar que o colágeno está reduzido nos animais com DP, N+DP (figura 5D, E, F) e DM+DP (figura 5J, K, L), sendo mais evidenciado nas regiões ósseas, tanto no osso alveolar interdental como no inter-radicular.

Na quantificação de colágeno na região da furca podemos observar que os grupos N+DP e DM+DP mostraram diminuição significativa da porcentagem de colágeno, em comparação aos seus grupos controles N e DM. Esta diminuição de colágeno foi potencializada no grupo DM+DP, quando comparado ao grupo N+DP (figura 5M).

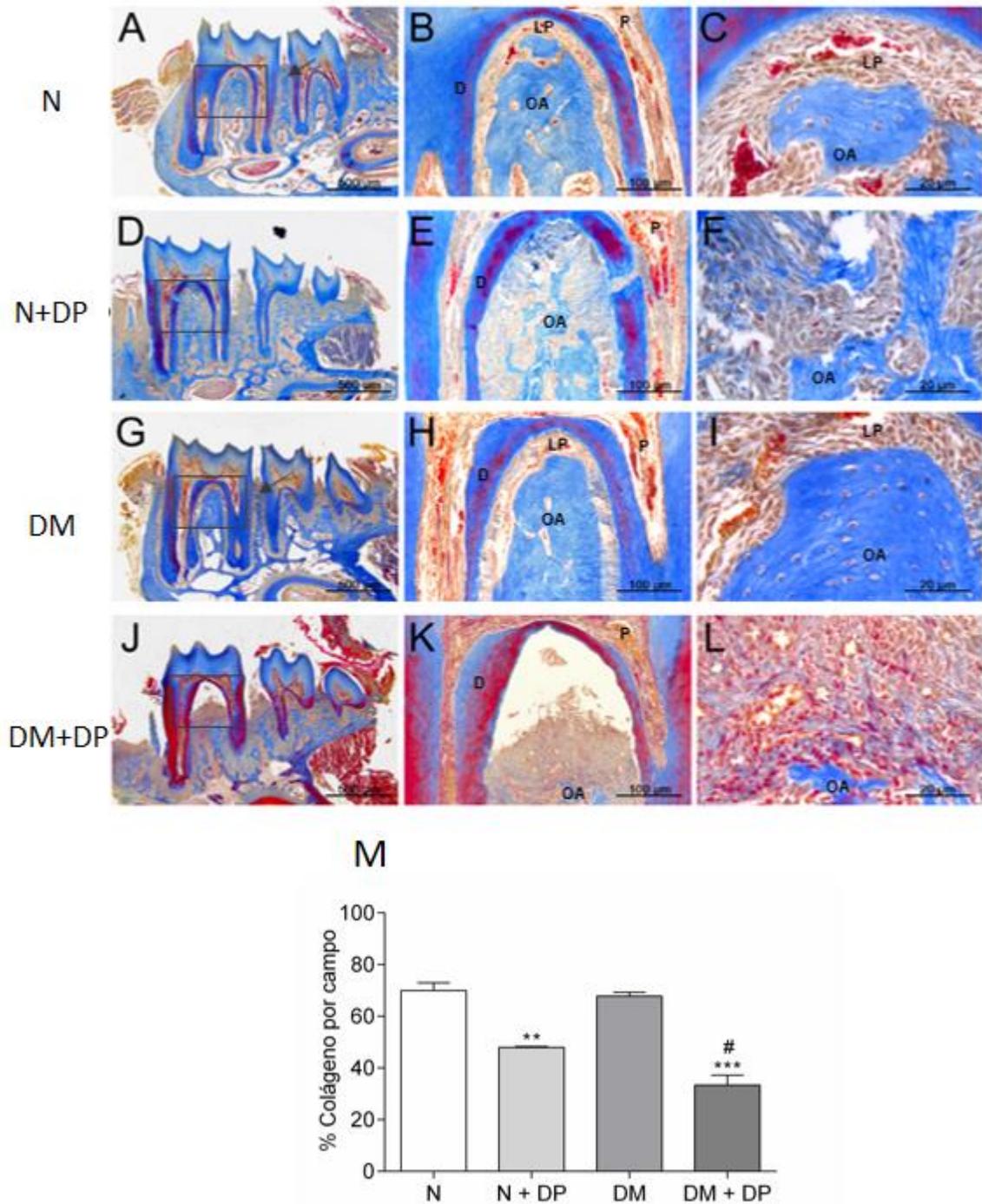


Figura 5 Colágeno está reduzido na região periodontal em camundongos diabéticos submetidos à doença periodontal. Cortes histológicos dos primeiros molares inferiores de 5 animais, corados com tricrômio de Masson, dos grupos normal - N (A, B, C), normal com doença periodontal – N+DP (D, E, F), diabético - DM (G, H, I) e diabético com doença periodontal – DM+DP (J, K, L). O símbolo seta = osso alveolar interdental; P = polpa dental; D = dentina; LP = ligamento periodontal e OA = osso alveolar inter-radicular. Avaliação da quantidade de colágeno por porcentagem usando software Image J por campo contado (100x) (M). Resultados expressam média ± EPM. Valores significativos estão representados por, ** $p < 0,01$ (N+DP vs. N); *** $p < 0,001$ (DM+DP vs. DM) e # $p < 0,05$ (DM+DP vs. N+PD).

DISCUSSÃO

5 Discussão

A DP e o DM são doenças inflamatórias crônicas, comumente encontradas na população, e quando estas estão associadas podem aumentar grandemente os prejuízos na região periodontal. Por esta razão, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o papel do diabetes sobre o processo inflamatório, reabsorção óssea, produção de MMPs, colágeno e TGF- β 1 em camundongos com DP experimental.

A DP experimental induzida em nossos animais segue o princípio de que uma ligadura inserida em torno do primeiro molar ocasiona um acúmulo de alimento no local, favorecendo assim a formação de placa bacteriana, cuja é o principal fator etiológico para o desenvolvimento da DP em humanos (Silva, Lorencini et al. 2008, de Molon, Mascarenhas et al. 2015, Llambes, Arias-Herrera et al. 2015). A presença do biofilme produz respostas imunes e não imunes, e as células residentes da região periodontal acabam sendo estimuladas e induzem a liberação de mediadores inflamatórios que atuam no recrutamento de leucócitos para região inflamada, bem como favorecem a destruição óssea por possível ativação de osteoclastos (Okada and Murakami 1998, Graves 2008, Di Benedetto, Gigante et al. 2013). Estudos experimentais tem demonstrado que a indução de DP causa inflamação na região do periodonto e perda de osso alveolar (Li and Amar 2007, Saadi-Thiers, Huck et al. 2013, Kim, Lee et al. 2014, de Molon, Mascarenhas et al. 2015). A indução de DP por ligadura colocada ao redor do primeiro molar maxilar, causou perda óssea significativa em camundongos C57BL/6 após 45 e 60 dias de indução (de Molon, Mascarenhas et al. 2015). O diabetes também pode influenciar a reabsorção de osso alveolar, devido ao fato que, ratos diabéticos com DP tem perda óssea mais significativa quando comparado com animais não diabéticos com DP (Kim, Lee et al.

2014). Em nosso estudo podemos observar o mesmo perfil, em que a DP promoveu perda de osso alveolar em ambos os grupos, N+DP e DM+DP, causando reabsorção óssea mais significativa no grupo DM+DP, mostrando assim que o diabetes potencializou a perda óssea quando associada a DP. Também podemos observar nos nossos resultados que animais sem a indução da doença periodontal, não apresentaram lesão, mesmo sendo estes do grupo DM.

Outra importante característica da DP é a inflamação. Em processos inflamatórios agudos e crônicos, os neutrófilos iniciam importante papel na defesa contra a invasão bacteriana nos tecido circunjacentes, e no periodonto não é diferente (Hajishengallis, Chavakis et al. 2015). Os neutrófilos representam a maior parte dos leucócitos que são recrutados para a região periodontal em resposta ao biofilme, e sua quantidade no local da inflamação está relacionado com a severidade da doença, devido sua alta atividade citotóxica e antimicrobiana (Hajishengallis, Chavakis et al. 2015). No presente estudo, o recrutamento de neutrófilos foi drasticamente aumentado nos animais com DP, sendo mais significativo no grupo DM+DP, quando comparado ao grupo N+DP. Essa persistência dos neutrófilos na região periodontal, mesmo passado 15 dias de indução, pode ser explicada pela presença do biofilme, o qual se faz um estímulo constante. Estes achados estão de acordo com estudos prévios da literatura, os quais tem relatado que animais com DP apresentam maior recrutamento de leucócitos com predominante presença de células polimorfonucleares e mononucleares (Li and Amar 2007). O diabetes favorece um maior recrutamento celular, devido ao fato de que animais diabéticos com DP apresentaram maior número de células inflamatórias recrutadas para a região inflamada, em relação a animais não diabéticos com DP (Silva, Lorencini et

al. 2008). Assim podemos verificar que a resposta inflamatória na DP é intensificada quando desenvolvida em quadro diabético.

Como descrito anteriormente, os processos inflamatórios se iniciam com a migração de leucócitos para a região danificada e este recrutamento ocorre devido a liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas, em virtude da sinalização das células periodontais residentes, as quais, além de promover o recrutamento dos leucócitos, apresentam papel direto também no metabolismo ósseo (Ryu, Choi et al. 2007, Silva, Garlet et al. 2007). CXCL2 é uma das principais quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos (Miotla, Ridger et al. 2001, Diana and Lehuen 2014). Estudos relataram que depois de estímulo com LPS de *E. coli* no sulco gengival de ratos, pode-se observar um aumento de CXCL2 juntamente com aumento de neutrófilos na região afetada (Miyachi, Kitagawa et al. 2004). A quimiocina CXCL2 também causa migração de leucócitos em condições diabéticas, pois o estímulo com CXCL2 causou aumento significativo da migração de leucócitos em camundongos C57BL/6 diabéticos (Pettersson, Christoffersson et al. 2011). Em outros dados, também foram observados que a expressão gênica de CXCL2 e o infiltrado inflamatório estão aumentados em camundongos diabéticos depois da inoculação de *P. gingivalis* em uma região adjacente ao periósteo do crânio (Naguib, Al-Mashat et al. 2004). Nossos resultados corroboram com os dados da literatura, pois a DP aumentou significativamente a produção de CXCL2, e o diabetes potencializou esta liberação. O mesmo foi observado com a quimiocina CCL3, a qual apresentou aumento significativo no grupo DM+DP. A quimiocina CCL3 também possui atividade quimiotática para neutrófilos (Reichel, Rehberg et al. 2009), tendo forte associação com o status periodontal, pois seus níveis estão aumentados em periodontites, e além disso, tem sido considerada como importante

biomarcador de evolução da doença, bem como de perda óssea (Driscoll 1994, Menten, Wuyts et al. 2002, Garlet, Avila-Campos et al. 2005, Sexton, Lin et al. 2011, Al-Sabbagh, Alladah et al. 2012, Fine, Markowitz et al. 2014, Souto, Queiroz et al. 2014). Esta quimiocina também é apresentada como um mediador patológico comum do DM, devido ao fato que indivíduos diabéticos com DP possuem maior produção de níveis de CCL3, comparados a indivíduos não diabéticos (Duarte, Bezerra et al. 2014). Aumento dos níveis de CXCL2 e CCL3 no grupo DM+DP encontrados em nosso estudo, podem estar relacionados com o aumento do número de neutrófilos recrutados para a região periodontal, já que estas duas quimiocinas tem forte poder quimiotático para neutrófilos, favorecendo assim o processo inflamatório e destrutivo do periodonto.

Para investigar características de reparo tecidual durante o diabetes na presença de DP, foi analisado a participação do TGF- β 1. O TGF- β 1 inicia um importante papel na ativação da inflamação e na resolução de respostas inflamatórias em uma variedade de doenças autoimunes (Shull, Ormsby et al. 1992). Possui papel pró-inflamatório, por estimular resposta inflamatória com padrão th17 (Han, Li et al. 2012). Além disso, é um importante fator de crescimento envolvido em processo de reparo tecidual, sendo responsável por regular a produção de moléculas de MEC, e reduzir sua degradação (Branton and Kopp 1999, Tuxhorn, Ayala et al. 2002). Em nosso estudo a expressão gênica de TGF- β 1 foi menor nos grupos com DP, sendo que, no grupo DM+DP ocorreu uma redução mais significativa. Entretanto, a produção de TGF- β 1 analisada por ELISA, mostrou níveis aumentados nos grupos com DP. Uma possível explicação para este fato é que possivelmente ocorreu uma expressão elevada de TGF- β 1 antes do 15º dia, visto que a produção da proteína está aumentada neste período. De acordo com dados

da literatura, biópsias de tecido gengival de pacientes com periodontite crônica mostraram quantidade significativamente maior de tipos celulares produtores de TGF- β 1, em relação à amostras de tecido gengival saudável, sendo que a maioria destas células era composta por neutrófilos (34-35%), seguida por macrófagos (21-29%) (Steinsvoll, Halstensen et al. 1999). Em amostras de fluido gengival, saliva, e gengiva, também pode-se observar que os níveis de TGF- β 1 apresentaram-se mais elevados em indivíduos com DP, em comparação a indivíduos saudáveis (Skaleric, Kramar et al. 1997, Gurkan, Emingil et al. 2006, Khalaf, Lonn et al. 2014, Vikram, Ramakrishnan et al. 2015). O TGF- β 1 em quantidades exageradas pode favorecer a patogênese da DP em conjunto com outros mediadores inflamatórios (Gurkan, Emingil et al. 2006). Vikram et al. (2015), demonstraram claramente em seu estudo que o TGF- β 1 pode estar envolvido na patogênese e diagnóstico da DP, pois verificaram que indivíduos com DP continham níveis elevados de TGF- β 1, porém estes níveis foram reduzidos após tratamento cirúrgicos. O diabetes também parece ser responsável pela alteração dos níveis de TGF- β 1. Níveis séricos de TGF- β foram significativamente maiores em pacientes jovens com DM tipo 1 em comparação a indivíduos não diabéticos, principalmente quando relacionados a tempo de duração do quadro diabético (Jakus, Sapak et al. 2012, Zorena, Raczynska et al. 2013). Em nosso estudo, como mencionado anteriormente, foi verificado um aumento de TGF- β 1 em amostras de tecido gengival derivadas de camundongos normais e diabéticos com DP, este aumento pode ser explicado como uma possível tentativa de reparo no tecido periodontal pelas células residentes, como também, derivado do aumento do recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, visto que leucócitos polimorfonucleares são capazes de produzir TGF- β 1 (Steinsvoll, Halstensen et al. 1999). Como TGF- β 1 exerce papel duplo, podendo apresentar tanto aumento da

resposta pró-inflamatória como auxiliar no reparo tecidual, é de extrema importância desenvolver estudos voltados a entender os mecanismos pelo qual atua o TGF- β 1, para que assim possamos compreender melhor qual de fato é seu papel na DP, principalmente na presença de uma doença sistêmica como o diabetes.

A produção das MMPs também é um ponto importante a ser verificado, pois estas enzimas têm sido associadas com a progressão da DP, em virtude de possuírem substratos que são essenciais para a integridade da região periodontal (Kim, Chung et al. 2013). A expressão gênica de MMP-2, apesar de verificarmos leve tendência para diminuição da expressão nos grupos com DP, mostrou não haver diferença estatística entre os grupos analisados. Dados prévios da literatura também mostraram que a expressão gênica de MMP-2 em tecido gengival de ratos com DP não apresentaram diferença estatística nos grupos analisados, independentemente do período de indução da DP (Rodini, Batista et al. 2008). Em relação a expressão de MMP-9, nossos dados apresentaram significativa diminuição no grupo DM+DP, demonstrando o mesmo perfil da expressão do RNA mensageiro e da produção da proteína do TGF- β 1, como mencionado anteriormente. A literatura demonstra que a expressão gênica de MMP-9 diminui 15 dias após a indução de DP em animais diabéticos (Silva, Lorencini et al. 2008), assim como no nosso estudo.

Em relação a atividade enzimática, nossos dados demonstraram uma resposta contrária a expressão do RNA mensageiro como citado anteriormente, visto que a indução da DP experimental em nossos grupos mostrou aumento significativo na atividade de MMP-2 e MMP-9, e uma potencialização da MMP-2 em animais com diabetes. Dados da literatura também mostraram aumento das MMPs em na presença de DP. Autores observaram aumento na atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 durante a progressão de gengivite experimental em ratos Wistar (Lorencini,

Silva et al. 2009). Em amostras de tecido gengival com inflamação severa de pacientes, também foi observado aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9, comparados ao grupo controle (Ejeil, Igondjo-Tchen et al. 2003). Autores também relataram que a alta atividade de MMP-2 em vasculatura arterial tem sido associada ao diabetes (Chung, Booth et al. 2008). Recentemente foi constatado que o diabetes causa prejuízos vasculares via MMP-2 endotelial (Chao, Chuang et al. 2016), corroborando assim com nossos resultados.

O aumento das MMPs demonstrado em nosso estudo, pode estar relacionado com o estímulo inflamatório, e das células residentes. Autores demonstraram que fragmentos de tecido gengival de ratos com gengivites, apresentaram marcação de MMP-2 e MMP-9 em células do epitélio gengival, células inflamatórias, fibroblastos e em vasos sanguíneos (Lorencini, Silva et al. 2009). Lorencini et al. (2009), também verificaram que a presença de MMP-2 foi mais evidente no tecido entre 3 a 5 dias de inflamação, em que a principal célula marcada foi o fibroblasto presente no tecido conjuntivo. Fibroblastos são capazes de sintetizar e liberar vários tipos de MMPs, e a MMP-2 é uma delas (Achong, Nishimura et al. 2003). Autores também correlacionaram o aumento de MMP-9 com o pico de recrutamento de células inflamatórias para o local da inflamação, principalmente neutrófilos, pois a MMP-9 é constitutivamente expressa por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Lorencini, Silva et al. 2009). A atividade dos neutrófilos durante a inflamação é capaz de liberar uma grande variedade de substâncias armazenadas em seus grânulos, incluindo MMPs (Westerlund, Ingman et al. 1996). Estes dados estão de acordo com os do nosso estudo, onde se sugere que o aumento da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 ocorre em virtude da formação do biofilme, em que

favorece a estimulação das células residentes, e recrutamento de células inflamatórias tais como neutrófilos, proporcionando assim a liberação das MMPs.

Este aumento da atividade de MMP-2 e MMP-9 observado em nosso estudo e em dados de literatura pode estar relacionado aos prejuízos teciduais causados pela DP, especialmente quando associados com o diabetes. Esta destruição tecidual pode ocorrer em virtude da degradação de substratos específicos, como o colágeno (Lazar, Loghin et al. 2015). Em nossos resultados pode ser verificado que a DP diminuiu a porcentagem da área de colágeno na região do periodonto, tanto no grupo N+DP como no DM+DP, principalmente observado no osso alveolar, visto que o osso alveolar possui matriz orgânica composta por cerca de 90% de colágeno (Becker, Schuppan et al. 1986), e esta redução da quantidade de colágeno foi potencializada no grupo DM+DP. Em relação a expressão do RNA mensageiro de col1a2, observamos também que ocorreu uma diminuição no tecido gengival. Dados da literatura corroboram com os nossos resultados, os quais analisaram o colágeno em amostras gengivais de pacientes durante a DP, e mostraram que a DP causa destruição MEC, e redução da expressão de colágeno, levando a alterações teciduais significativas (Almeida, Valverde et al. 2015). Outros estudos, mostraram que a indução de DP em ratos reduziu a porcentagem de fibras de colágeno em cortes histológicos, proporcionalmente ao tempo indução da inflamação (Lorencini, Silva et al. 2009). Em amostras de tecido gengival de pacientes com periodontite severa, foi observado a diminuição da área de fibras de colágeno (33%), em comparação a indivíduos saudáveis (60%) (Seguier, Gogly et al. 2001), o mesmo perfil observado por Ejeil et al. (2003), o qual observou diminuição significativa das fibras de colágeno no grupo com inflamação gengival severa (35%), em comparação com o grupo controle (53%). A condição diabética é um outro fator importante que

altera a produção de colágeno (Spanheimer, Umpierrez et al. 1988). Dados prévios da literatura relataram que há diminuição significativa da produção de colágeno em cartilagem articular e tecido ósseo parietal em ratos diabéticos, e esta redução foi correlacionada com a concentração de glicose plasmática (Spanheimer, Umpierrez et al. 1988). Indivíduos diabéticos apresentam alteração significativa no tecido periodontal (Monea, Mezei et al. 2012). Em tecido conjuntivo e epitélio gengival de ratos diabéticos com DP foi observado que o diabetes favorece a degeneração destas estruturas teciduais (Silva, Lorencini et al. 2008). Esta redução do colágeno observado em nosso estudo, pode ter ocorrido em virtude da elevada atividade das MMPs, e este desequilíbrio pode favorecer a destruição das estruturas periodontais, proporcionando possível perda do suporte e sustentação dos dentes.

Em resumo, nossos resultados mostraram uma pronunciada resposta inflamatória no grupo DM+DP, marcada por significativa perda óssea, elevados parâmetros pro-inflamatórios, tais como, migração de neutrófilos, aumento da produção de CXCL2 e CCL3 e aumento da atividade de MMP-2 com diminuição de colágeno. Isto sugere que a evolução do processo inflamatório ocorrido na DP é agravado sob influência do diabetes, podendo comprometer gravemente os tecidos periodontais em virtude da perda óssea e desequilíbrio entre produção de colágeno e atividade das MMPs. Estudos futuros estão sendo conduzidos no sentido de avaliar os mecanismos envolvidos nestes processos para que possamos obter novas ferramentas para o controle da agravante destruição periodontal em pacientes com diabetes.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

Com os dados obtidos no presente estudo podemos concluir que há influência do diabetes no desenvolvimento do processo inflamatório, reparo tecidual e reabsorção óssea durante a doença periodontal.

REFERÊNCIAS

Referências

- Achong, R., I. Nishimura, H. Ramachandran, T. H. Howell, J. P. Fiorellini and N. Y. Karimbux (2003). "Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat." J Periodontol **74**(4): 494-500.
- Al-Sabbagh, M., A. Alladah, Y. Lin, R. J. Kryscio, M. V. Thomas, J. L. Ebersole and C. S. Miller (2012). "Bone remodeling-associated salivary biomarker MIP-1alpha distinguishes periodontal disease from health." J Periodontal Res **47**(3): 389-395.
- Almeida, T., T. Valverde, P. Martins-Junior, H. Ribeiro, G. Kitten and L. Carvalhaes (2015). "Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues." Rom J Morphol Embryol **56**(1): 33-40.
- Bascones-Martinez, A., P. Matesanz-Perez, M. Escribano-Bermejo, M. A. Gonzalez-Moles, J. Bascones-Ilundain and J. H. Meurman (2011). "Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **16**(6): e722-729.
- Beam, H. A., J. R. Parsons and S. S. Lin (2002). "The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus." J Orthop Res **20**(6): 1210-1216.
- Becker, J., D. Schuppan, H. Benzian, T. Bals, E. G. Hahn, C. Cantaluppi and P. Reichart (1986). "Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine." J Histochem Cytochem **34**(11): 1417-1429.
- Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." J Periodontol **64**(5 Suppl): 474-484.
- Bonato, C. F., C. C. do-Amaral, L. Belini, L. M. Salzedas and S. H. Oliveira (2012). "Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis." J Periodontal Res **47**(6): 783-792.
- Branton, M. H. and J. B. Kopp (1999). "TGF-beta and fibrosis." Microbes Infect **1**(15): 1349-1365.
- Chao, C. L., C. P. Chuang, Y. F. Cheng, K. R. Lee, Y. Chang, S. P. Cheng, W. K. Chan and F. M. Ho (2016). "The Protective Role of Autophagy in Matrix Metalloproteinase-Mediated Cell Transmigration and Cell Death in High-Glucose-Treated Endothelial Cells." Inflammation.
- Chaves Neto, A. H., C. L. Yano, E. J. Paredes-Gamero, D. Machado, G. Z. Justo, M. P. Peppelenbosch and C. V. Ferreira (2010). "Riboflavin and photoproducts in MC3T3-E1 differentiation." Toxicol In Vitro **24**(7): 1911-1919.
- Chung, A. W., A. D. Booth, C. Rose, C. R. Thompson, A. Levin and C. van Breemen (2008). "Increased matrix metalloproteinase 2 activity in the human internal mammary artery is associated with ageing, hypertension, diabetes and kidney dysfunction." J Vasc Res **45**(4): 357-362.
- Clark, A. W., C. A. Krekoski, S. S. Bou, K. R. Chapman and D. R. Edwards (1997). "Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia." Neurosci Lett **238**(1-2): 53-56.
- de Molon, R. S., V. I. Mascarenhas, E. D. de Avila, L. S. Finoti, G. B. Toffoli, D. M. Spolidorio, R. M. Scarel-Caminaga, S. Tetradis and J. A. Cirelli (2015). "Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice." Clin Oral Investig.
- Derosa, G., A. D'Angelo, C. Tinelli, E. Devangelio, A. Consoli, R. Miccoli, G. Penno, S. Del Prato, S. Paniga and A. F. Cicero (2007). "Evaluation of metalloproteinase 2

- and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects." Diabetes Metab **33**(2): 129-134.
- Di Benedetto, A., I. Gigante, S. Colucci and M. Grano (2013). "Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss." Clin Dev Immunol **2013**: 503754.
- Diana, J. and A. Lehuen (2014). "Macrophages and beta-cells are responsible for CXCR2-mediated neutrophil infiltration of the pancreas during autoimmune diabetes." EMBO Mol Med **6**(8): 1090-1104.
- Driscoll, K. E. (1994). "Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation." Exp Lung Res **20**(6): 473-490.
- Duarte, P. M., J. P. Bezerra, T. S. Miranda, M. Feres, L. Chambrone and L. M. Shaddox (2014). "Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis." J Clin Periodontol **41**(1): 11-18.
- Ejeil, A. L., S. Igondjo-Tchen, S. Ghomrasseni, B. Pellat, G. Godeau and B. Gogly (2003). "Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva." J Periodontol **74**(2): 188-195.
- Federação Internacional do Diabetes. Disponível em < <http://www.idf.org/about-diabetes/facts-figures>>. Acesso em 09 de agosto de 2016.
- Fine, D. H., K. Markowitz, K. Fairlie, D. Tischio-Bereski, J. Ferrandiz, D. Godbole, D. Furgang, J. Gunsolley and A. Best (2014). "Macrophage inflammatory protein-1alpha shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis." PLoS One **9**(6): e98541.
- Garlet, G. P., M. J. Avila-Campos, C. M. Milanezi, B. R. Ferreira and J. S. Silva (2005). "Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration." Microbes Infect **7**(4): 738-747.
- Genco, R. J. and W. S. Borgnakke (2013). "Risk factors for periodontal disease." Periodontol 2000 **62**(1): 59-94.
- Gomes, A. C., J. E. Filho and S. H. de Oliveira (2008). "MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, MIP-2, and LTb4." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **106**(3): 450-456.
- Gordon, M. K. and R. A. Hahn (2010). "Collagens." Cell Tissue Res **339**(1): 247-257.
- Graves, D. (2008). "Cytokines that promote periodontal tissue destruction." J Periodontol **79**(8 Suppl): 1585-1591.
- Graves, D. T. and Y. Jiang (1995). "Chemokines, a family of chemotactic cytokines." Crit Rev Oral Biol Med **6**(2): 109-118.
- Grossi, S. G. and R. J. Genco (1998). "Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship." Ann Periodontol **3**(1): 51-61.
- Gurkan, A., G. Emingil, S. Cinarcik and A. Berdeli (2006). "Gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta1 in several forms of periodontal disease." Arch Oral Biol **51**(10): 906-912.
- Hajishengallis, G., T. Chavakis, E. Hajishengallis and J. D. Lambris (2015). "Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis." J Leukoc Biol **98**(4): 539-548.
- Han, G., F. Li, T. P. Singh, P. Wolf and X. J. Wang (2012). "The pro-inflammatory role of TGFbeta1: a paradox?" Int J Biol Sci **8**(2): 228-235.
- Havemose-Poulsen, A. and P. Holmstrup (1997). "Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature." Crit Rev Oral Biol Med **8**(2): 217-236.

- Iacopino, A. M. (2001). "Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation." Ann Periodontol **6**(1): 125-137.
- Jakus, V., M. Sapak and J. Kostolanska (2012). "Circulating TGF-beta1, glycation, and oxidation in children with diabetes mellitus type 1." Exp Diabetes Res **2012**: 510902.
- Jiang, Z. L., Y. Q. Cui, R. Gao, Y. Li, Z. C. Fu, B. Zhang and C. C. Guan (2013). "Study of TNF-alpha, IL-1beta and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis." Dis Markers **34**(5): 295-304.
- Khalaf, H., J. Lonn and T. Bengtsson (2014). "Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF-beta1 as a marker for disease progression." Cytokine **67**(1): 29-35.
- Kim, J. H., D. E. Lee, S. H. Choi, J. H. Cha, E. J. Bak and Y. J. Yoo (2014). "Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis." J Periodontal Res **49**(6): 792-800.
- Kim, J. J., J. Choi, M. K. Lee, K. Y. Kang, M. J. Paik, S. K. Jo, U. Jung, H. R. Park and S. T. Yee (2014). "Immunomodulatory and Antidiabetic Effects of a New Herbal Preparation (HemoHIM) on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." Evid Based Complement Alternat Med **2014**: 461685.
- Kim, K. A., S. B. Chung, E. Y. Hawng, S. H. Noh, K. H. Song, H. H. Kim, C. H. Kim and Y. G. Park (2013). "Correlation of expression and activity of matrix metalloproteinase-9 and -2 in human gingival cells of periodontitis patients." J Periodontal Implant Sci **43**(1): 24-29.
- Lazar, L., A. Loghin, E. S. Bud, D. Cerghizan, E. Horvath and E. E. Nagy (2015). "Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with tissue inflammation degree in periodontal disease." Rom J Morphol Embryol **56**(4): 1441-1446.
- Li, C. H. and S. Amar (2007). "Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model." Journal of Periodontology **78**(6): 1120-1128.
- Liao, C. H., W. Fei, Z. H. Shen, M. P. Yin and C. Lu (2014). "Expression and distribution of TNF-alpha and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model." Asian Pac J Trop Med **7**(5): 412-416.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Llambes, F., S. Arias-Herrera and R. Caffesse (2015). "Relationship between diabetes and periodontal infection." World J Diabetes **6**(7): 927-935.
- Loe, H. (1993). "Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus." Diabetes Care **16**(1): 329-334.
- Lorencini, M., J. A. Silva, C. A. Almeida, A. Bruni-Cardoso, H. F. Carvalho and D. R. Stach-Machado (2009). "A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening." Tissue Cell **41**(1): 43-50.
- Lorencini, M., J. A. Silva, C. L. de la Hoz, H. F. Carvalho and D. R. Stach-Machado (2009). "Changes in MMPs and inflammatory cells in experimental gingivitis." Histol Histopathol **24**(2): 157-166.
- Manouchehr-Pour, M., P. J. Spagnuolo, H. M. Rodman and N. F. Bissada (1981). "Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis." J Dent Res **60**(3): 729-730.

- Matthews, D. C. (2002). "The relationship between diabetes and periodontal disease." J Can Dent Assoc **68**(3): 161-164.
- McMullen, J. A., T. E. Van Dyke, H. U. Horoszewicz and R. J. Genco (1981). "Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus." J Periodontol **52**(4): 167-173.
- Menten, P., A. Wuyts and J. Van Damme (2002). "Macrophage inflammatory protein-1." Cytokine Growth Factor Rev **13**(6): 455-481.
- Miotla, J. M., V. C. Ridger and P. G. Hellewell (2001). "Dominant role of L- and P-selectin in mediating CXC chemokine-induced neutrophil migration in vivo." Br J Pharmacol **133**(4): 550-556.
- Mishima, Y., A. Kuyama, A. Tada, K. Takahashi, T. Ishioka and M. Kibata (2001). "Relationship between serum tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus." Diabetes Res Clin Pract **52**(2): 119-123.
- Miyauchi, M., S. Kitagawa, M. Hiraoka, A. Saito, S. Sato, Y. Kudo, I. Ogawa and T. Takata (2004). "Immunolocalization of CXC chemokine and recruitment of polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide." Histochem Cell Biol **121**(4): 291-297.
- Monea, A., T. Mezei and M. Monea (2012). "The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a histological study." Rom J Morphol Embryol **53**(3): 491-495.
- Naguib, G., H. Al-Mashat, T. Desta and D. T. Graves (2004). "Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation." J Invest Dermatol **123**(1): 87-92.
- Nauseef, W. M. (2007). "How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view." Immunol Rev **219**: 88-102.
- Okada, H. and S. Murakami (1998). "Cytokine expression in periodontal health and disease." Crit Rev Oral Biol Med **9**(3): 248-266.
- Oue, E., J. W. Lee, K. Sakamoto, T. Iimura, K. Aoki, K. Kayamori, Y. Michi, M. Yamashiro, K. Harada, T. Amagasa and A. Yamaguchi (2012). "CXCL2 synthesized by oral squamous cell carcinoma is involved in cancer-associated bone destruction." Biochem Biophys Res Commun **424**(3): 456-461.
- Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**(8): 617-629.
- Pettersson, U. S., G. Christoffersson, S. Massena, D. Ahl, L. Jansson, J. Henriksnas and M. Phillipson (2011). "Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes." PLoS One **6**(7): e22480.
- Pranckeviciene, A., J. Siudikiene, R. Ostrauskas and V. Machiulskiene (2014). "Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **158**(1): 117-123.
- Rai, B., S. Kharb, R. Jain and S. C. Anand (2008). "Biomarkers of periodontitis in oral fluids." J Oral Sci **50**(1): 53-56.
- Reichel, C. A., M. Rehberg, M. Lerchenberger, N. Berberich, P. Bihari, A. G. Khandoga, S. Zahler and F. Krombach (2009). "Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1787-1793.
- Rodini, C. O., A. C. Batista, T. J. Dionisio, C. F. Santos, F. Q. Cunha and V. S. Lara (2008). "Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat." J Mol Histol **39**(3): 275-282.

- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-242.
- Ryan, M. E. and L. M. Golub (2000). "Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy." Periodontol 2000 **24**: 226-238.
- Ryu, O. H., S. J. Choi, A. M. Linares, I. S. Song, Y. J. Kim, K. T. Jang and T. C. Hart (2007). "Gingival epithelial cell expression of macrophage inflammatory protein-1alpha induced by interleukin-1beta and lipopolysaccharide." J Periodontol **78**(8): 1627-1634.
- Saadi-Thiers, K., O. Huck, P. Simonis, P. Tilly, J. E. Fabre, H. Tenenbaum and J. L. Davideau (2013). "Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection." J Periodontol **84**(3): 396-406.
- Sakalihasan, N., P. Delvenne, B. V. Nussgens, R. Limet and C. M. Lapiere (1996). "Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms." J Vasc Surg **24**(1): 127-133.
- Seguier, S., B. Gogly, A. Bodineau, G. Godeau and N. Brousse (2001). "Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue?" J Periodontol **72**(10): 1398-1406.
- Sexton, W. M., Y. Lin, R. J. Kryscio, D. R. Dawson, 3rd, J. L. Ebersole and C. S. Miller (2011). "Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment." J Clin Periodontol **38**(5): 434-441.
- Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin and et al. (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." Nature **359**(6397): 693-699.
- Silva, J. A., M. Lorencini, L. A. Peroni, C. L. De La Hoz, H. F. Carvalho and D. R. Stach-Machado (2008). "The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease." J Periodontal Res **43**(1): 48-54.
- Silva, J. A., M. Lorencini, J. R. Reis, H. F. Carvalho, V. H. Cagnon and D. R. Stach-Machado (2008). "The influence of type I diabetes mellitus in periodontal disease induced changes of the gingival epithelium and connective tissue." Tissue Cell **40**(4): 283-292.
- Silva, T. A., G. P. Garlet, S. Y. Fukada, J. S. Silva and F. Q. Cunha (2007). "Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease." J Dent Res **86**(4): 306-319.
- Sima, C. and M. Glogauer (2013). "Diabetes mellitus and periodontal diseases." Curr Diab Rep **13**(3): 445-452.
- Sivan, S. S., A. J. Hayes, E. Wachtel, B. Caterson, Y. Merkher, A. Maroudas, S. Brown and S. Roberts (2014). "Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc." Eur Spine J **23 Suppl 3**: S344-353.
- Skaleric, U., B. Kramar, M. Petelin, Z. Pavlica and S. M. Wahl (1997). "Changes in TGF-beta(1) levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs." European Journal of Oral Sciences **105**(2): 136-142.
- Sorsa, T., L. Tjaderhane and T. Salo (2004). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases." Oral Dis **10**(6): 311-318.

- Souto, G. R., C. M. Queiroz, Jr., F. O. Costa and R. A. Mesquita (2014). "Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis." J Periodontol **85**(10): 1416-1423.
- Spanheimer, R. G., G. E. Umpierrez and V. Stumpf (1988). "Decreased collagen production in diabetic rats." Diabetes **37**(4): 371-376.
- Stanko, P. and L. Izakovicova Holla (2014). "Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **158**(1): 35-38.
- Steinsvoll, S., T. S. Halstensen and K. Schenck (1999). "Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue." J Clin Periodontol **26**(6): 366-373.
- Tejiram, S., J. Zhang, T. E. Travis, B. C. Carney, A. Alkhalil, L. T. Moffatt, L. S. Johnson and J. W. Shupp (2016). "Compression therapy affects collagen type balance in hypertrophic scar." J Surg Res **201**(2): 299-305.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, M. J. Smith, V. C. Smith, T. D. Dang and D. R. Rowley (2002). "Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling." Clin Cancer Res **8**(9): 2912-2923.
- Vikram, V., T. Ramakrishnan, K. Anilkumar and N. Ambalavanan (2015). "Changes in Transforming Growth Factor-beta1 in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Chronic Periodontitis Following Periodontal Flap Surgery." J Clin Diagn Res **9**(2): ZC13-16.
- Westerlund, U., T. Ingman, P. L. Lukinmaa, T. Salo, L. Kjeldsen, N. Borregaard, L. Tjaderhane, Y. T. Konttinen and T. Sorsa (1996). "Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis." J Dent Res **75**(8): 1553-1563.
- Wu, Y. Y., E. Xiao and D. T. Graves (2015). "Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease." Int J Oral Sci **7**(2): 63-72.
- Yucel-Lindberg, T. and T. Bage (2013). "Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis." Expert Rev Mol Med **15**: e7.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.
- Zorena, K., D. Raczynska, P. Wisniewski, E. Malinowska, M. Mysliwiec, K. Raczynska and D. Rachon (2013). "Relationship between serum transforming growth factor beta 1 concentrations and the duration of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents." Mediators Inflamm **2013**: 849457.