

Mariane Maffei Azuma

Influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

Araçatuba- SP

2014

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A997i	<p>Azuma, Mariane Maffei. Influência da infecção endodôntica associada ou à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar / Mariane Maffei Azuma. -Araçatuba, 2014 68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra</p> <p>1. <i>Diabetes mellitus</i> 2. Periodontite periapical 3. Necrose da polpa dentária 4. Interleucina-17 I. Título</p> <p>Black D24 CDD 617.67</p>
-------	--

DADOS CURRICULARES

Mariane Maffei Azuma

Nascimento

17-02-1990

Urânia-SP

Filiação

Milton Hiroshi Azuma

Silmara de Fátima Maffei Azuma

2008/2011

Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2012/2014

Curso de Mestrado em Ciência Odontológica, área de concentração em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Associações

Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas

Associação Internacional de Pesquisas Odontológicas

Dedicatória

Aos meus pais, *Milton e Sílmara*, que me deram a vida e foram meus primeiros mestres, apoiando-me com muito amor em todos os momentos. Vocês acreditaram e fizeram do meu sonho realidade. Obrigada pelo carinho e incentivo, esse momento jamais seria possível sem a determinação de vocês!

À minha tia, madrinha, amiga e segunda mãe, *Marlene*, “in memoriam”, pelo amor, dedicação, mimos e companheirismo incondicional. Estará sempre comigo!

À minha irmã, *Letícia*, por ser meu maior presente. Eu seria muito incompleta sem você, a vida não teria a mesma graça. Você é essencial!

Ao meu namorado e amigo, *Ricardo Honda*, pela paciência e compreensão em todos os momentos, por se fazer presente, pelo amor e cuidado. Os meus anos de graduação e pós-graduação teriam sido muito mais difíceis sem você!

Amo cada um de vocês!

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, *Luciano Tavares Angelo Cintra*, pelos ensinamentos e por ser o meu maior exemplo de dedicação e profissionalismo na carreira acadêmica.

Obrigada pelo incentivo, persistência, paciência e orientação!

À minha amiga de pós-graduação, *Annelise Katrine Carrara Prieto*.

Obrigada pela amizade e por ter feito minhas dificuldades encontradas durante a pós-graduação parecerem muito mais leves!

Ao querido professor, *Mauro Juvenal Nery*, pela amizade, incentivo e introdução à endodontia. Você é espetacular!

À professora, *Valéria Marçal Felix de Lima*, e ao professor, *Edilson Ervolino*, pela contribuição incalculável para a realização deste trabalho. Agradeço a competência, o perfeccionismo e a paciência de vocês!

Agradecimentos

A *Deus*, pelo dom da vida, por iluminar sempre os meus passos e por ter colocado pessoas maravilhosas ao meu lado.

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba* pela formação acadêmica e oportunidades de aprendizado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* pela concessão da bolsa de mestrado.

À *secretaria de Pós-graduação* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba pela orientação e suporte acadêmico.

Aos professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, *Eloí Dezan Júnior e João Eduardo Gomes Filho*, por terem contribuído de forma inestimável com a minha formação ao longo dos cursos de graduação e Mestrado.

Aos professores de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, *Cristiane Duque, Juliano Pelim Pessan, Robson Frederico Cunha e Alberto Botazzo Delbem*, por terem contribuído com a minha formação ao longo do curso de mestrado.

Às minhas amigas, *Ana Clara Fuzíssima, Bruna da Silva Rodrigues, Camila de Souza Fernandes, Daniele Queiroz Mathiel, Isabela Salvador Borges e Jakeline de Carvalho Bernardes*. Obrigada pela amizade, carinho, torcida e ajuda em todos os momentos!

Aos amigos, *Solimar Vieira Honda, Sérgio Honda e Fernando Honda*, pela amizade, apoio e por terem me acolhido com tanto carinho.

Aos meus companheiros de pós-graduação, *Luciana Ferreira Louzada, Renata Oliveira Samuel, Francine Benetti, Clícia Pereira Ribeiro Aguiinaldo Cândido Facundo, Marcela Ito Rey, Annelise Katrine Carra Prieto*. Muito obrigada pela participação ativa no desenvolvimento deste trabalho, companheirismo e ótima convivência.

Aos colegas de pós-graduação, *Diego Valentim, Índia Queiroz, Loiane Massunari, Marcelo Tadahiro Wayama, Gabriely Resende, Carlos Bueno, Ludmilla Santos, Christine Men Martins, Simone Watanabe, Paulo Duarte Tobias, Gustavo Sívieri*, pela ótima convivência.

À técnica de laboratório e pós-graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, *Juliana Perosso*, pela paciência e grande ajuda durante os meus experimentos.

Aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, *Nelci Vieira, Peterson, Cláudia Neves, Elaine e Grazielle*, pela paciência, amizade e auxílio inestimável.

*“Ontem um menino que brincava me falou
Que hoje é semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere, não, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar!
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá!
Nós podemos tudo,
Nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será!”*

Gonzaguinha

AZUMA, MM. **Influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar.** 2014. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes, nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17, nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar. Foram utilizados 40 ratos machos divididos em quatro grupos contendo 10 animais cada grupo: ratos normoglicêmicos (N); ratos normoglicêmicos com periodontite apical (N-PA); ratos com diabetes experimental (DE); ratos com diabetes experimental e com periodontite apical (DE-PA). A diabetes foi induzida por meio da administração de estreptozotocina via veia peniana. Foi realizada avaliação glicêmica, para confirmar o desenvolvimento da doença, no sexto e no último dia do experimento. A infecção endodôntica foi induzida por meio da exposição pulpar do primeiro molar superior direito ao meio bucal. Após 30 dias, foram coletados o fígado e o rim, para a quantificação da IL-17 pelo método ELISA, bem como a hemi-maxila direita para a quantificação da IL-17 pela técnica imunoistoquímica. Os valores obtidos nos testes paramétricos foram tabulados e analisados, estatisticamente, por meio dos testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores obtidos em scores foram analisados, estatisticamente, por meio dos testes de Kruskal-Wallis e teste de Dun ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que os ratos diabéticos (DE e DE-PA) apresentaram maior quantidade de IL-17 nos tecidos hepático e renal quando comparados aos ratos normoglicêmicos (N e N-PA) ($p < 0,05$). A análise histológica mostrou que a periodontite apical de ratos diabéticos (DE-PA) possui maior severidade quando comparada com a dos ratos normoglicêmicos (N-PA) ($p < 0,05$), além disso, houve um aumento significativo dos níveis de IL-17 na periodontite apical dos ratos diabéticos (DE-PA) quando comparados aos normoglicêmicos (N-PA) ($p < 0,05$). Entretanto, a infecção endodôntica induzida em um único elemento dentário não foi capaz de alterar os níveis de IL-17 nos tecidos hepático e renal ($p > 0,05$) Pode-se concluir que a diabetes aumenta os níveis de IL-17 nos tecidos hepático e renal, bem como potencializa a produção de IL-17 na periodontite apical. A diabetes também aumenta a severidade e o desenvolvimento das periodontites apicais.

Palavras-chave: Diabetes. Infecção endodôntica. Periodontite apical. IL-17

AZUMA, MM. **Influence of endodontic infection with or without diabetes in the levels of proinflammatory cytokine IL-17 in periapical, hepatic and renal tissues of Wistar rats.** 2014. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of endodontic infection with or without diabetes, in the levels of proinflammatory cytokine IL-17 in apical periodontitis and hepatic and renal tissues of Wistar rats. Forty male Wistar rats were divided into four groups of ten animals each: normoglycemic rats (N), normoglycemic rats with apical periodontitis (N-AP), rats with experimental diabetes (ED), rats with experimental diabetes and apical periodontitis (ED-AP). Diabetes was induced by injection of streptozotocin in the penile vein. Glycemic control was performed to confirm the development of the disease at the sixth and last day of the experimental period. The endodontic infection was induced by exposure of the upper right first molar to the oral environment. After 30 days, the hepatic and renal tissues were collected for the IL-17 quantification by ELISA, as well the right hemi-jaw for the IL-17 quantification by immunohistochemistry. The values obtained in parametric tests were tabulated and analyzed statistically by means of analysis of variance tests (ANOVA) and Tukey test ($p < 0.05$). The values obtained for scores were statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Dun test ($p < 0.05$). The results showed that diabetic rats (ED and ED-AP) showed a higher IL-17 levels in the hepatic and renal tissues compared to normoglycemic rats (N and N-AP) ($p < 0.05$). The apical periodontitis in diabetic rats (ED-AP) had higher severity when compared to normoglycemic rats (N-PA) ($p < 0.05$), furthermore, there was a large increase in IL-17 levels in apical periodontitis of diabetics rats (ED-AP) when compared with normoglycemic rats (N-AP) ($p < 0.05$). However, the induced endodontic infection did not alter IL-17 levels in hepatic and renal tissues ($p > 0.05$). It may be concluded that diabetes increases IL-17 levels in hepatic and renal tissues, as well as enhances the IL-17 production in apical periodontitis. Diabetes also increases the severity and development of apical periodontitis.

Keywords: Diabetes. Pulpal infection. Apical periodontitis. IL-17.

Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela 1- Divisão dos grupos experimentais	29
Tabela 2 – Nível sérico de glicose (mg/dL) \pm Desvio Padrão*	42
Tabela 3 – Peso dos ratos (g) \pm Desvio Padrão*	43
Tabela 4- Quantidade de IL-17 no fígado (pg/mL) \pm Desvio Padrão*	44
Tabela 5- Quantidade de IL-17 no tecido renal (pg/mL) \pm Desvio Padrão	44
Tabela 6- Representação dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e extensão da inflamação e das médias de perda óssea (μ m)	46

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1- (A) Anestesia via intra-muscular, com xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg). (B) Indução da diabetes experimental com estreptozotocina (60mg/Kg) dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH 4,5), via veia peniana.	30
Figura 2 – Indução da periodontite apical, com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação. As exposições foram padronizadas com 1mm de diâmetro e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal durante 30 dias.	30
Figura 3 – Indução da periodontite apical, com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação. As exposições foram padronizadas com 1mm de diâmetro e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal durante 30 dias.	33
Figura 4- Incisão sagital para a visualização dos órgãos	33
Figura 5 – (A) Remoção do fígado; (B) Remoção do rim.	33
Figura 6 – Quantificação de IL-17 nos tecidos hepático e renal	45
Figura 7- Padrão de imunorreatividade dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA	47
Figura 8- Representação histológica e da imunorreatividade para IL-17 dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA	48

SUMÁRIO

	<i>Páginas</i>
I - INTRODUÇÃO	14
II - REVISÃO DE LITERATURA	19
III - OBJETIVO	27
IV - MATERIAL E MÉTODOS	29
V - RESULTADOS	42
VI - DISCUSSÃO	51
VII - CONCLUSÃO	56
VIII REFERÊNCIAS	58
IX - ANEXO	68

Introdução

I- INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica sistêmica crônica caracterizada por anormalidades endócrinas decorrentes da secreção deficiente de insulina pelas células beta das Ilhotas de Langerhans do pâncreas e/ou da ação deficiente deste hormônio nos tecidos alvo (American Diabetes Association, 2013). Os primeiros registros da doença constam no Papiro de Ebers, em 1500 aC. Estima-se para o ano de 2030, 366 milhões de diabéticos em todo o mundo (Wild et al., 2004), sendo que no Brasil, 12% da população com idade entre 30 e 69 anos e 20% da população acima de 69 anos são portadores da doença (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

Atualmente, de acordo com a Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association, 2013), a doença pode ser classificada em diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; diabetes gestacional (GDM); e outros tipos específicos, como problemas genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doença do pâncreas (fibrose cística), endocrinopatias, ou por meio de drogas ou produtos químicos decorrentes do tratamento de AIDS ou órgãos após transplante (Mealey&Oates, 2006; American Diabetes Association, 2013).

Sabe-se que a DM é uma doença crônica e que possui consequências graves para a saúde sistêmica, assim como para a cavidade bucal (Fouad et al., 2003; Garber et al., 2009; Preshaw et al., 2012). E que, quando não controlada, pode contribuir com a suscetibilidade à infecção e inflamação, como observado nas infecções endodônticas e periodontais (Fouad, 2003, Deshpande et al., 2010; Lakschevitz et al., 2011; Preshaw et al., 2012).

Atualmente, existem vários estudos na literatura que associam a DM com a doença periodontal (DP) (Ou & Li, 2011; Zhang et al., 2011; Chang et al., 2011; Preshaw et al., 2012), os quais mostraram a influência tanto da DP na patogênese da DM, quanto a DM influenciando a patogênese da DP (Taylor & Borgnakke, 2008; Al-Khabbaz & Al-Shammari, 2011; Preshaw, et al., 2012). Um dos mecanismos envolvidos nesta associação inclui a presença de mediadores pró-inflamatórios liberados localmente e sistemicamente (Silva, et al., 2012).

Apesar da infecção endodôntica ser muito prevalente na população em geral, assim como a DP (Chala et al., 2011; Peters et al., 2011; Awuti et al., 2012), ela não tem sido

cientificamente explorada com a mesma abrangência, especialmente em associação com a DM. Sabe-se que os pacientes diabéticos têm maior perda dentária decorrente do insucesso endodôntico (López-López et al., 2011; Ng et al., 2011; Wang et al., 2011), fato que indica a deficiente resposta do organismo frente às infecções (Fouad & Burleson, 2003). Uma das consequências da infecção endodôntica é o desenvolvimento de periodontite apical (PA) (Colic et al., 2010) que é caracterizada, histologicamente, por um tecido de granulação infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Lukic et al., 2008). Tais lesões são formadas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico contínuo oriundo dos canais radiculares infectados (Zhang et al., 2005; Xiong et al., 2009). Essa resposta envolve o recrutamento de diferentes células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010). Estas citocinas são sintetizadas em resposta à presença de bactérias e seus produtos, os quais induzem e mantêm a resposta inflamatória (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010; Fan et al., 2011). Estudos recentes têm revelado alterações na produção de algumas destas citocinas devido à presença da DM (Surendar, et al., 2012; Triñanes, et al., 2012), podendo ser modulada pelas infecções bucais (Amir, et al., 2011; Sun et al., 2011). Estudos mostraram que a DM associada à DP altera a via inflamatória do hospedeiro (Passoja, et al., 2011; Sun et al., 2011). Por outro lado, faltam estudos a respeito da interferência sistêmica que a DM associada com a PA possa causar.

A citocina pró-inflamatória Interleucina 17 (IL-17) foi descoberta em 1993 (Rouvier et al., 1993) e, desde então, tornou-se alvo de pesquisas. A IL-17 é secretada principalmente por células T, denominadas Th 17 (Gaffen, 2011) e apresenta-se ativa em respostas inflamatórias, auto-imunes, antimicrobianas à patógenos e em uma variedade de doenças infecciosas (Schenkein et al., 2010).

Há evidências de que a IL-17 atua ativamente na patogênese da DM (Honkanen, et al., 2010; Marwaha, et al., 2010; Simoni et al., 2011; Zeng, et al., 2011; Silva, et al., 2012). Além disso, existem estudos que mostraram resultados positivos na melhora da DM, por meio da inibição da IL-17 (Jain et al., 2008; Boehm et al., 2009; Emamaullee et al., 2009; Wang et al., 2011; Amirshahrokhi et al., 2012; Zhang et al., 2012) e outros que evidenciaram que o aumento dos níveis de IL-17 está relacionado com o descontrole glicêmico (Simoni et al., 2011; Kumar et al., 2013).

Estudos que relacionaram a DM com a DP e a IL-17, evidenciaram aumento do nível sérico de IL-17, o que acabou potencializando a DP e vice-versa (Santos, et al., 2010; Javed, Zhao et al., 2011; Silva, et al.; 2012). Um único trabalho quantificou os níveis séricos de IL-17 em ratos diabéticos com DP e PA, onde observaram o seu aumento frente a associação destas duas infecções (Cintra et al., 2014).

Com relação à infecção endodôntica, foi observado que na PA crônica pode ocorrer um processo de reagudização, que está correlacionado com um aumento do infiltrado de leucócitos, com predomínio de neutrófilos atraídos por quimiocinas bem como o aumento da expressão de IL-17 (Marçal et al., 2010). Além disso, acredita-se que a IL-17 pode exercer um papel na exacerbação da inflamação em lesões periapicais crônicas (Colic et al., 2007; Colic et al., 2010), e também parece estar envolvida com a reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais (Xiong et al., 2009). Desta forma, torna-se importante avaliar os níveis de IL-17 na PA associada ou não à diabetes, como já verificado em relação à DP (Santos, et al., 2010; Javed, 2011; Silva, et al., 2012) e seus níveis nos tecidos hepático e renal.

O rim é o principal órgão a sofrer danos em condições diabéticas, como a nefropatia diabética, que é uma lesão renal grave, caracterizada por disfunção renal, fibrose e glomeruloesclerose (Heerspink & Zeeuw, 2011; Franceschini et al., 2012; Meguro et al., 2012). Embora a patogênese da nefropatia diabética tenha múltiplos fatores, a dislipidemia e posterior lipotoxicidade desempenham um importante papel no desenvolvimento deste processo patológico (Athiros et al., 2010; Rutledge et al., 2010; Kim et al., 2013). A dislipidemia relacionada com a diabetes leva ao acúmulo excessivo de lipídios nos rins, o que causa danos renais graves, bem como o aumento da resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação (Wahba & Mak et al., 2007; Murea et al., 2010; Chung et al., 2012). A resposta inflamatória também tem sido considerada um dos principais mecanismos pelos quais a lipotoxicidade diabética provoca estresse oxidativo, disfunção e alterações estruturais nos rins, por meio da liberação de vários fatores inflamatórios (Lin et al., 2008; Navarro-Gonzalez & Mora-Fernandez, 2008; Rivero et al., 2009). Assim, julgamos importante quantificar os níveis de IL-17 neste tecido, bem como avaliar se a presença de um único foco de infecção endodôntica associado à periodontite apical seria capaz de agravar os mecanismos responsáveis por causar danos a este tecido, na presença da diabetes.

O fígado atua diretamente na captação de glicose presente no organismo. Um dos mais importantes dentre todos os efeitos da insulina é fazer com que a maioria da glicose absorvida

após uma refeição seja armazenada no fígado sob a forma de glicogênio. Então, entre as refeições, quando o alimento não está disponível e a concentração de glicose começa a cair, a secreção de insulina diminui e, rapidamente, o glicogênio hepático é convertido em glicose, que é liberada de volta ao sangue para impedir que as concentrações de glicose caiam a níveis muito baixos. Quando a quantidade de glicose que penetra nas células hepáticas é maior do que a quantidade que pode ser armazenada sob a forma de glicogênio, a insulina promove a conversão deste excesso de glicose em ácidos graxos. Estes ácidos graxos são empacotados sob a forma de triglicerídeos, que são depositados como gordura no tecido adiposo (Guyton & Hall, 2002). Assim, julgamos importante avaliar se este tecido também sofre algum processo inflamatório, por meio da produção local de IL-17, proveniente da diabetes. Além disso, verificar se a presença de um único foco de infecção endodôntica seria capaz de agravar esse processo inflamatório.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi:

- Avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 no tecido periapical.
- Avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar.
- Avaliar a influência da diabetes na progressão da periodontite apical.

Revisão de Literatura

Mariane Maffei Azuma- Dissertação de Mestrado, 2014

II- REVISÃO DE LITERATURA

1- Diabetes Mellitus e infecção endodôntica

Em 1974, foi publicado o primeiro artigo referente à inter-relação entre desordens sistêmicas e o tratamento endodôntico, onde foi concluído que o tratamento endodôntico em pacientes com DM não tratada, só pode ser realizado quando a condição sistêmica estiver controlada (Glick, 1974). Após alguns anos, a inter-relação entre a DM e a IE foi bastante explorada em modelo animal, onde foi visto que ratos diabéticos com infecção endodôntica perdem mais peso e são mais suscetíveis à morbidade e mortalidade quando comparados a ratos normoglicêmicos (Fouad et al., 2002). Também foi observado, que a DM aumenta a gravidade e a progressão da doença cárie, bem como afeta negativamente o reparo pulpar (Garber et al., 2009). Foi realizado um estudo em camundongos, que mostrou que a hiperglicemia em combinação com reduzida quantidade de saliva, que é ocasionada pela DM, favoreceu a diminuição de proteínas de mineralização do esmalte, o que propiciou a invasão dos túbulos dentinários por bactérias, formando microabscessos na polpa coronária, que evoluíram para necrose pulpar e, conseqüente formação de PA (Yeh et al., 2012), que também tem progressão mais severa em condições diabéticas (Fouad et al., 2002; Iwana et al., 2003; Armada-Dias et al., 2006; Kodama et al., 2011).

Com relação aos estudos realizados em humanos, a relação entre DM e IE foi avaliada, por meio de uma base de dados, onde foi evidenciado que o processo de cura após o tratamento endodôntico, frente a PA, é mais lento em pacientes diabéticos (Fouad et al., 2003). Isso pode ser explicado devido à DM ser uma desordem metabólica comum do metabolismo de carboidratos e lipídios, além de causar distúrbios circulatórios generalizados, devido a alterações nas paredes dos vasos, que ocorre pelo acúmulo de ateromas na parede do lúmen dos mesmos. Além de que, os vasos sanguíneos, especialmente os capilares, possuem maior espessura de paredes, o que dificulta a ação do sistema de defesa. O aumento da espessura da parede de pequenas artérias, veias e capilares é causado pelo acúmulo de glicoproteínas anômolos, como resultado de um processo de glicação não enzimático irreversível, que associado com a diminuição do catabolismo do colágeno, aparentemente reduzem a absorção de nutrientes e oxigênio pelos tecidos e leva ao acúmulo de metabólitos (Ponte et al., 2001; Bender&Bender, 2003). Em adição, há prejuízo da resposta leucocitária e isso leva a uma diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares e falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular (Bender&Bender,

2003). Ocorre depressão da quimiotaxia de leucócitos no sangue periférico, assim como defeitos na fagocitose e morte bacteriana, aumentando a susceptibilidade do paciente (Cutler et al., 1991; Oliver & Tervonen, 1994). Ainda, segundo Bender & Bender, a polpa dentária tem pouca ou nenhuma circulação colateral, logo, é mais propensa ao desenvolvimento de infecção. Além disso, a diabetes aumenta a glicose salivar e crevicular, o que pode influenciar na microflora oral, que favorece o desenvolvimento de cáries e periodontites (Bender & Bender, 2003).

Também foi observado que pacientes diabéticos são mais propensos a ter PA e maior necessidade de tratamento endodôntico (López-López et al., 2011; Marotta et al., 2012), bem como ter mais lesões residuais (Brito et al., 2003; Wang et al., 2011) e maior risco de extração dentária após o tratamento endodôntico (Wang et al., 2011). Isso pode ser explicado pelo fato de que a DM promove alterações na atividade da alcalinofosfatase, nos níveis plasmáticos de glicose, no nível de nitrito e na atividade da mieloperoxidase, o que resulta na alteração de mediadores inflamatórios e modificações nos componentes estruturais da polpa (Catanzaro et al., 2006), além de diminuir a resistência do hospedeiro contra a infecção bacteriana, selecionando, predominantemente, bactérias anaeróbias gram-negativas (Iwama et al., 2006).

Uma outra estratégia para o estudo da inter-relação entre a infecção pulpar e a diabetes é a de analisar os efeitos sistêmicos que essa interação possa causar. Assim, um estudo realizado em ratos normoglicêmicos revelou que a PA diminuiu o sinal insulínico, ocasionando resistência à insulina, por meio da modulação da via inflamatória, onde foi observado um aumento sérico da citocina pró-inflamatória TNF-alfa (Astolpho et al., 2013). Também foi observado que ratos diabéticos com DP e PA apresentaram um aumento de glicose sanguínea e hemoglobina glicada (Cintra et al., 2013a), bem como aumentou os níveis séricos de triglicérides (Cintra et al., 2013b) e IL-17 (Cintra et al., 2014).

2- Diabetes Mellitus e IL-17

A IL-17 foi descoberta em 1993 (Rouvier et al., 1993) e, desde então, está sendo alvo de intensas pesquisas. A família de citocinas da IL-17 é um subconjunto de citocinas que participam tanto da resposta inflamatória aguda quanto da crônica (Iwakura et al., 2011). São divididas em IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, sendo a IL-17-A o membro protótipo que caracteriza a família (Song & Qian, 2013).

Apesar da IL-17 ser considerada a principal citocina secretada pelas células Th 17, estudos mostraram que uma ampla gama de células do sistema imunológico inato, incluindo células cdT, células indutoras de tecido linfóide (Lti), células natural killer invariante (iNKT), células natural killer (NK) e neutrófilos, são fontes consideráveis de sua produção precoce (Korn et al., 2009; Cua & Tato, 2010). Esta citocina desempenha um crítico papel na defesa do hospedeiro e contra a invasão de bactérias e fungos, assim como na patogênese de alergias, doenças auto-imunes, obesidade e tumor. Extensos estudos demonstraram que a IL-17 exerce os seus efeitos pró-inflamatórios por meio da indução da expressão de genes pró-inflamatórios, como quimiocinas, citocinas, matrix metaloproteinases (MMPs), por meio das vias de sinalização NF- κ B, MAPKs e C/EBP (Zhu & Qian, 2012).

Há evidências de que a IL-17 atua ativamente na patogênese da diabetes (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2012; Kumar et al., 2013). Uma importante observação foi a de que o potencial patogênico das células Th17 de humanos com diabetes tipo 1 com início recente, se dá pela secreção espontânea das interleucinas IL-1 e IL-6, que são responsáveis por estimular a expansão das células Th17 (Bradshaw et al., 2009).

Além disso, sabe-se que a IL-17A contribui com a patogênese da diabetes tipo 1 por meio da exacerbação da apoptose das células beta e do aumento da produção local de quimiocinas, agravando a insulite (Grieco et al., 2013). Por sua vez, o aumento de glicose também pode regular a expressão de IL-17 (Kumar et al., 2013).

Somando-se a isso, foi observado em camundongos diabéticos não obesos, um maior número de células natural killer invariantes IL-17 (iNKT17), que são células secretoras de IL-17, nos órgãos linfóides, além de uma maior infiltração das mesmas no pâncreas desses camundongos, mostrando que a maior incidência das células iNKT17 aumenta a severidade da diabetes. Também observaram que o tratamento com o anticorpo de bloqueio anti-IL-17 impediu a exacerbação da doença (Simoni et al., 2011).

Em contrapartida, foi observado em ratos knock-out para IL-17, que a IL-17 é dispensável, pelo menos em parte, na patogênese da diabetes auto-imune neste modelo animal, visto que a ausência desta citocina não foi suficiente para reduzir a gravidade da doença (Joseph et al., 2012).

Um dos fatores que contribui com o desenvolvimento da diabetes é o desequilíbrio entre as células Th17 e células T reguladoras (Tregs) (Ryba-Stanisławowska et al., 2013; Yaochite et al., 2013).

Foi realizado um estudo com ratos Biobreeding, que são ratos que desenvolvem a diabetes mellitus tipo 1 por meio de uma mutação no gene *Gimap5*, que mostrou que os ratos diabéticos tem um desequilíbrio severo entre as células Th17 e Tregs, em especial nos primeiros meses de vida, que pode ser atribuído a um excesso de células T efectoras. Também foi observado que a adição de uma maior quantidade de células Tregs fez com que houvesse interferência no desenvolvimento de DM nos ratos biobreeding, o que mostra a importância do equilíbrio entre as células Th17 e Tregs na patogênese da diabetes (van den Brandt et al., 2010).

Somando-se a isso, foi observado que em crianças com diabetes tipo 1, existe uma grande alteração imunológica referente a ativação da imunidade de IL-17/IL-22 em comparação com as crianças não afetadas pela doença, e que alterações relacionadas com os mecanismos de regulação (FOXP3) e resposta Th1 (produção de IFN- γ) estão associadas com a presença de IL-17 bem como sua maior regulação. Além disso, foram mostrados os efeitos prejudiciais da IL-17 nas células das ilhotas do pâncreas, proporcionando uma ligação entre a imunidade de Th17 e os danos às células β (Honkanen et al., 2010).

Também foi realizado um estudo em camundongos NOD com deficiência nos receptores para IL-17 e camundongos diabéticos com deficiência nos receptores para IL-17 e IFN- γ . Observou-se que camundongos com deficiência no receptor para IL-17 apresentaram atraso no aparecimento da diabetes e a severidade da insulite foi reduzida, entretanto a incidência da diabetes a longo prazo desses ratos foi semelhante a do grupo controle. Os camundongos com deficiência nos receptores para IL-17 e IFN- γ também apresentaram um aparente declínio no início da diabetes de longa duração, mas não na insulite quando comparados aos ratos com deficiência apenas nos receptores para IL-17. Também descobriram que camundongos NOD com dupla deficiência tiveram um fenótipo linfopênico grave, com aumento das células Treg e células CD4+ quando comparados com os que tinham deficiência apenas para IL-17 e com os do grupo controle. Segundo os autores, estes achados indicam que a IL-17/Th17 participa no desenvolvimento da insulite e que tanto a sinalização IL-17 quanto a IFN- γ podem contribuir sinergicamente para o desenvolvimento de diabetes nos camundongos NOD (Kuryia et al., 2013).

Uma outra estratégia de estudo para uma melhor compreensão da relação entre diabetes e IL-17 é a de inibir esta citocina e avaliar, principalmente, o controle glicêmico, a secreção de insulina e a integridade das ilhotas do pâncreas, após a inibição. Um estudo feito em ratos diabéticos mostrou que a IL-17 ao ser inibida, por meio da secreção de IFN- γ (Jain et al., 2008) e por meio da administração de descarboxilase do ácido glutâmico (Boehm et al., 2009), ocasionou menor resistência à insulina. E que a inibição das células Th17 com anti-IL25, promoveu um período de remissão do diabetes tipo 2 em 90% dos ratos tratados com o anti-IL25, o que pode evidenciar o papel das células Th17 em prol do diabetes (Emamaullee et al., 2009).

Um outro resultado promissor foi obtido por meio de um estudo realizado com ratos diabéticos vacinados com células T. Os resultados mostraram que o tratamento diminuiu a hiperglicemia, quando comparados com o grupo controle. Além disso, foi observado uma maior preservação do número das ilhotas pancreáticas bem como um aumento na produção de insulina. Somando-se a isso, a vacinação diminuiu, significativamente, a produção de IL-17 em linfócitos infiltrantes intrapancreáticos (Wang et al., 2011).

A diminuição dos níveis de IL-17, bem como a preservação das ilhotas do pâncreas e secreção de insulina também foram observadas frente a administração de talidomida (Amirshahrokhi et al., 2012) e IL-12 (Zhang et al., 2012) em ratos. Em humanos, foi realizado um estudo com pacientes com diabetes mellitus tipo 2 submetidos a um controle glicêmico com metformina e mudança de hábitos, onde foi observado que os pacientes com um menor controle glicêmico apresentaram maiores níveis de IL-17. Além disso, a redução dos valores de hemoglobina glicada (HbA1c) decorrentes do controle glicêmico de pacientes que tinham uma pobre glico-regulação está relacionado a um significativo decréscimo na concentração de IL-17. Estes dados sugerem que a melhoria na glico-regulação pode reduzir os níveis de IL-17 em pacientes diabéticos tipo 2 (Sumarac-Dumanovic et al., 2013).

3- Infecção endodôntica e IL-17

A relação entre IL-17 e PA tem sido alvo de pesquisas recentes (Alshwaimi et al., 2013; Yang et al., 2014). Estudos mostraram que a IL-17 pode estar associada com o desenvolvimento da PA no início da reabsorção óssea, onde foi visto que pode ocorrer um aumento desta interleucina, principalmente após 14 dias do início do desenvolvimento da PA (Wei et al., 2013). Em adição, um estudo realizado em ratos, mostrou que o desequilíbrio

entre as células Th17 com a dinâmica das células Treg Foxp3+ atua na indução da PA, onde foi visto um aumento significativo no tamanho da lesão entre os dias 7 e 21 após a infecção endodôntica, entre os dias 21 e 35 esse aumento foi mais lento. As células positivas para IL-17 aumentaram durante o período do dia 7 ao dia 35. Entretanto, as células positivas para Foxp3 permaneceram com baixos níveis durante os primeiros 21 dias e aumentaram no dia 35. A relação IL-17+/Foxp3+ e o número de osteoclastos aumentaram simultaneamente do dia 7 ao 21 e diminuíram no dia 35, o que mostra que o desequilíbrio entre as células Treg Foxp3+ e Th17 desempenha um importante papel na progressão da periodontite apical (Yang et al., 2014).

Com relação a PA crônica, foi realizado um estudo in vitro com células mononucleares provenientes de lesões periapicais humanas, onde foi constatado que a produção de IL-17 por estas células foi maior em PAs sintomáticas, assim como a quantidade de neutrófilos e IL-8, o que sugeriu que a IL-17, por meio da estimulação da produção de IL-8, pode desenvolver um papel na exacerbação de lesões periapicais crônicas (Colic et al. 2007, Colic et al. 2009). O seu papel no desenvolvimento da patogênese da PA também foi observado em um estudo realizado em ratos que houve uma crescente quantidade de células Th17 positivas para IL-17 ao longo dos dias 0, 7, 14, 21 e 28 do período experimental, sugerindo sua influência no processo de reabsorção óssea (Xiong et al. 2009). Além disso, foi observado que o aumento de IL-17, juntamente com o aumento de infiltração de leucócitos e predominância de neutrófilos, pode estar relacionada com o processo de reagudização da PA crônica (Marçal et al., 2010). Assim, as células Th17 parecem interagir no local da lesão, o que sugere o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na patogênese de lesões periapicais (Andrade et al., 2013).

Em contrapartida, um estudo feito com camundongos knock-out para IL-17 mostrou que a IL-17 pode exercer um papel protetor contra a inflamação e destruição óssea periapical, via supressão de neutrófilos e células inflamatórias mononucleares (Alshwaimini et al., 2013). Assim, acredita-se ser de grande importância realizar mais investigações a respeito do papel da IL-17 em periodontites apicais.

Objetivo

III- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi:

- Avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 no tecido periapical.
- Avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos periapical, hepático e renal de ratos Wistar.
- Avaliar a influência da diabetes na progressão da periodontite apical.

Material e Métodos

IV- MATERIAL E MÉTODOS

1- Material

1.1- Animais

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 200g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco, Monte Mor- São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz natural e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água filtrada “ad libitum”. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética no uso de animais em experimentação (Processo 00540-2012).

1.2- Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado, via intramuscular, um sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg).

Para a indução da diabetes foi utilizado, via veia peniana, uma dose de 60mg/kg de Estreptozotocina (Sigma-Aldrich® Corp. St. Louis, MO, USA – 60mg/Kg)

2- Métodos

2.1- Indução da diabetes experimental

Na primeira fase do experimento, todos os animais foram anestesiados (Figura 1A). Após anestesia, metade dos animais (20 ratos) recebeu uma dose de Estreptozotocina dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5) (Figura 1B). Os demais animais receberam, também por via endovenosa, solução salina (0.15m), com o intuito de promover nestes animais o mesmo estresse, trauma e volume de líquido, ocasionados pela injeção. Após seis dias, foi realizada a dosagem de glicose sanguínea para confirmação da hiperglicemia. Foram selecionados os ratos que apresentaram resultados acima de 200 mg/dL (Garber et al., 2009; Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014) e, este dia, foi considerado o primeiro dia da doença diabetes.

2.2- Indução da Periodontite Apical

Para a indução da periodontite apical, 20 ratos (10 normais e 10 diabéticos) foram novamente anestesiados pelo mesmo protocolo descrito e as polpas dos primeiros molares superiores do lado direito de cada animal foram expostas, por meio de uma broca de aço carbono (Broca LN Long Neck – Denstispaly Maillefer, Ballaigues-Suíça) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro (Figura 2). Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro. As polpas ficaram expostas na cavidade bucal durante 30 dias.

2.3- Divisão em grupos:

Os grupos foram formados de acordo com as condições sistêmicas e presença ou ausência de periodontite apical e podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais

		Infecções orais	
		Sem infecção	Periodontite apical
Condição sistêmica	Normoglicemia	N	N-PA
	Diabetes experimental	DE	DE-PA

Os 40 ratos estudados foram divididos em 4 grupos experimentais, contendo 10 ratos em cada grupo:

Grupo N: ratos normoglicêmicos sem infecção endodôntica;

Grupo N-PA: ratos normoglicêmicos com infecção endodôntica;

Grupo DE: ratos com diabetes experimental sem infecção endodôntica;

Grupo DE-PA: ratos com diabetes experimental e com infecção endodôntica.

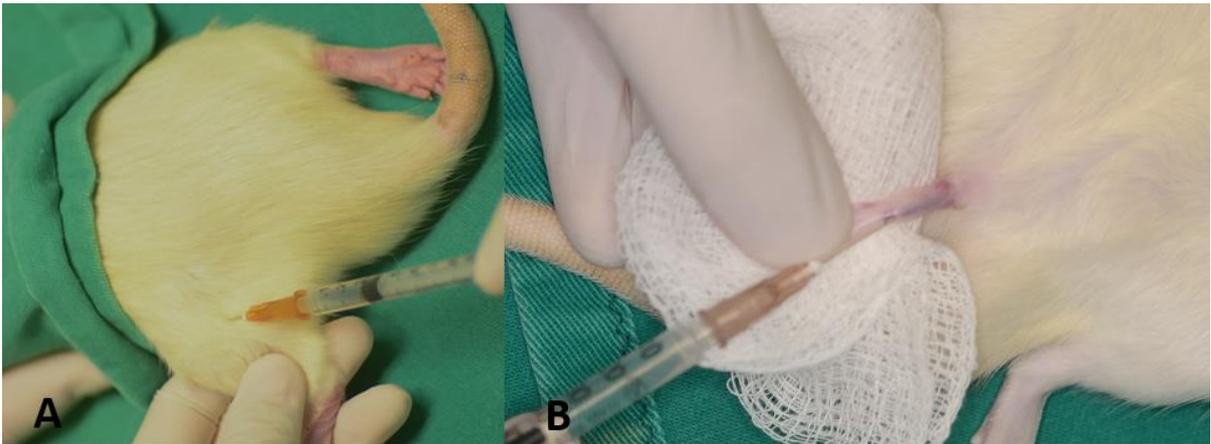


Figura 1. (A) Anestesia via intra-muscular, com xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg). (B) Indução da diabetes experimental com estreptozotocina (60mg/Kg) dissolvida em tampão citrato (0,01M; pH 4,5), via veia peniana.



Figura 2. Indução da periodontite apical, com o auxílio de uma broca (LN Long Neck, Dentisply Maillefer, Ballaigues- Suíça), em baixa rotação. As exposições foram padronizadas com 1mm de diâmetro e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal durante 30 dias.

2.4- Mensuração da glicemia

Foi realizada a mensuração da glicemia de todos os animais previamente à indução da diabetes, em jejum de 12/14 horas. Esta primeira mensuração foi considerada o marco inicial do experimento (dia 0). Após seis dias foi realizada nova mensuração glicêmica (dia 6) e as infecções orais foram induzidas. Ao final do experimento (dia 36) a glicemia foi novamente mensurada para confirmar a manutenção do estado hiperglicêmico. Nos períodos definidos e sempre às 8 horas da manhã, os níveis de glicose sanguínea foram determinados. Utilizando-se agulha 29Gx1/2” (Nipro Corporation, Honjo-Nishi, Kita-ku, Osaka, Japan) realizou-se uma punção na extremidade da cauda do animal, seguida de pequena compressão para a obtenção de uma gota de sangue (Figura 3A). Na sequência, utilizando aparelho para glicemia e as fitas glicotestes (Accu-Check Performa - Roche-Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) os valores foram obtidos e anotados em uma planilha para descrição dos resultados (Figura 3B). Antes e após a punção a extremidade caudal foi limpa e desinfetada com PVPI (Povidini tópico- Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda. São Paulo, SP, Brasil).

2.5- Coleta de Material para análise

Após 30 dias da indução das infecção orais, os animais foram eutanasiados por meio de uma sobre dose do anestésico xilazina, via intra peritoneal, seguido por deslocamento cervical.

2.6- Coleta dos órgãos

Para a coleta do fígado (Figura 5A) e do rim (Figura 5B), foi realizada uma incisão sagital na parte ventral dos animais, onde os órgãos puderam ser visualizados (Figura 4). Com o auxílio de uma pinça clínica e de uma tesoura, os órgãos foram removidos, colocados em tubos criogênicos com tampa de rosca (Axygen- Zhejiang Province, Huangyan, China) e, imediatamente, armazenados em nitrogênio líquido.

2.7- Coleta das hemi-maxilas

Após a eutanásia, toda a pele correspondente a face direita do animal foi removida e foram realizados dois cortes com tesoura, no ângulo da boca, separando a maxila da mandíbula. Foi realizada uma incisão, com lâmina de bisturi intercambiável número 15 (Solidor- Diadema, São Paulo- Brasil), em profundidade no palato do animal, com localização no plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, separando a maxila esquerda

da direita. Separadas as maxilas, com o auxílio de uma tesoura reta (Golgran- São Caetano do Sul, São Paulo- Brasil), foi realizado outro corte com localização tangente a face distal dos molares superiores direito e esquerdo, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita e esquerda contendo os dentes posteriores, objeto do estudo.

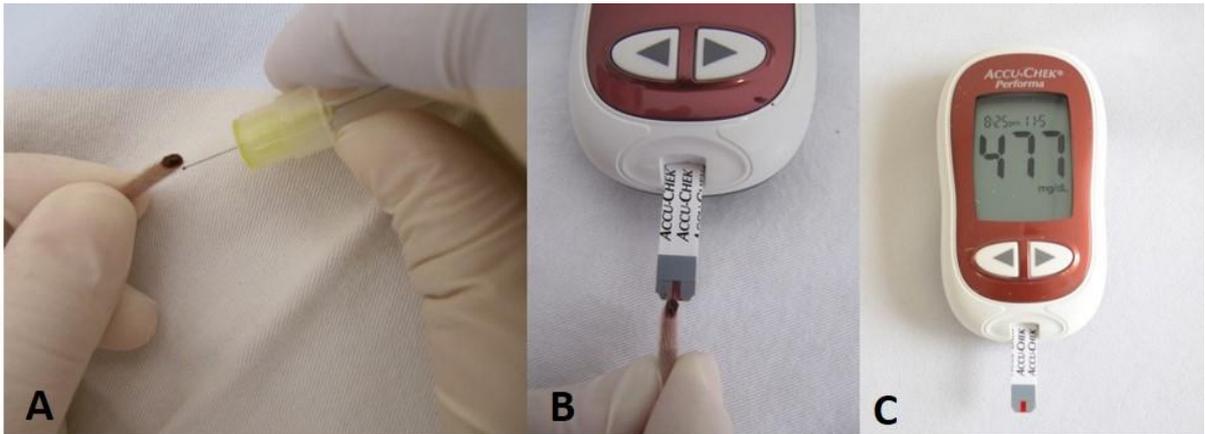


Figura 3. (A) Punção na extremidade da cauda do rato; (B) Mensuração da glicemia, por meio de fitas glicotestes; (C) Visualização da glicemia no dia 6, por meio do aparelho Accu-Chek Performa (Roche-Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).



Figura 4. Incisão sagital para a visualizações dos órgãos.

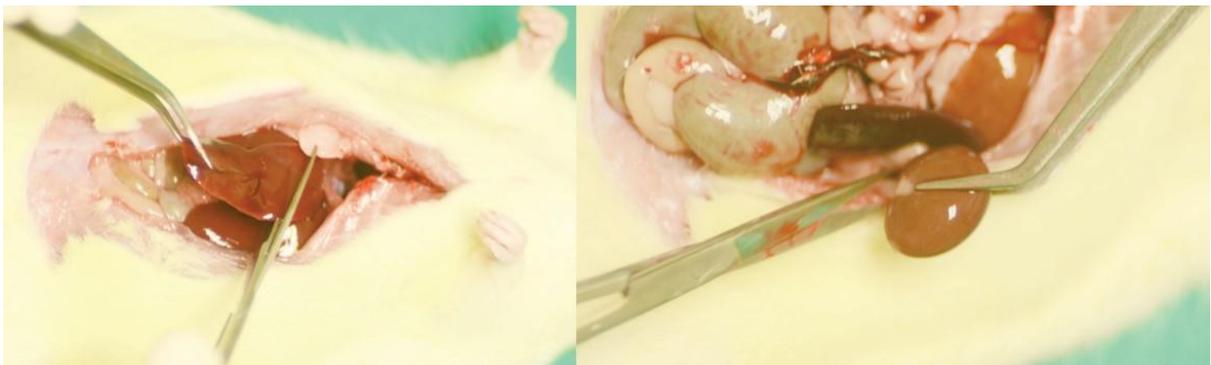


Figura 5. (A) Remoção do fígado; (B) Remoção do rim.

2.8- Processamento laboratorial

2.8.1- Homogeneização dos tecidos

Os tecidos renal e hepático foram cortados em fragmentos e pesados. Para cada amostra, foram utilizados 0,2g de cada órgão. Os fragmentos foram colocados em tubo de vidro, imerso em gelo, contendo 800 µl de PBS. Os tecidos foram homogeneizados com o aparelho Ultraturrax T10 IKA(Labortechnik, Staufen, Alemanha), durante 5 minutos. O tecido homogeneizado foi centrifugado a 10000x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C.

2.8.2- Quantificação da IL-17 A pelo método ELISA

A- Preparação do reagente

Colocou-se, primeiramente, todos os componentes do kit (Rat IL-17A ELISA MAX™ Deluxe, cat #437904, Biolegend, San Diego, CA, USA) na temperatura de 25°C e fez-se o preparo dos reagentes de acordo com as recomendações do fabricante.

B- Procedimento

O protocolo de detecção utilizado para as citocinas foi o recomendado pelo fabricante do kit. Inicialmente foram pipetados 100µl do anticorpo primário (já diluído) em cada poço. Foi colocada a placa de vedação para a incubação em “overnight” à 4°C. Foi realizada a aspiração e lavagem por 5 vezes com tampão fosfato-salino (PBS) contendo Tween 20 a 0.05%. Posteriormente, foi adicionado 200µl de PBS associado à albumina sérica bovina (BSA) que permaneceu incubado por 1 hora e novamente foi feita a aspiração e lavagem como descrita anteriormente. Foram pipetados então 100µl do recombinante, e realizou-se a diluição seriada para fazer a curva padrão. Foram pipetadas 100µl das amostras nos poços apropriados. Novamente foi realizado o selamento da placa e a incubação das amostras à temperatura ambiente por 2 horas. A aspiração e a lavagem foram realizadas novamente da mesma forma já descrita. Foram adicionados 100µl de anticorpo secundário em cada poço, a placa de vedação foi colocada para incubação da amostra por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente foi realizada a aspiração e lavagem. Então foram adicionados 100µl de reagente enzimático diluído (Estreptavidina-HRP) a cada poço. Foi feito o selamento da placa e a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A aspiração e lavagem nesta etapa foi feita 7 vezes e os poços foram mergulhados por um minuto em tampão de lavagem. Posteriormente

foram adicionados 100µl de solução de substrato TMB em cada poço. A incubação foi realizada sem o selador de placa durante quinze minutos à temperatura ambiente e isenta de luz. Por fim, foram adicionados 50µl de solução de parada (H₂SO₄) em cada poço (Figura 6). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Packard ELISA reader, Packard Bioscience Company, Illinois, EUA) ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

2.8.3- Processamento histológicos das amostras

As hemimaxilas direitas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 18 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda a solução de fixação. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10%. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos primeiros molares superiores e estruturas de suporte em seu sentidos longitudinal. Após a inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrômetro (Leica- RM 2045). Algumas lâminas foram separadas para serem coradas com hematoxilina e eosina e outras para serem submetidas à técnica imunistoquímica.

A-Imunistoquímica (Método da Imunoperoxidase Direta)

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em solução tampão citrato, pH 6,0 (*Antigen Retrieval Buffer*®, Spring, CA, USA), em câmara pressurizada (*Decloaking Chamber*®, Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunistoquímica as lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas a três lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e, na seqüência, em 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à incubação com o anticorpo primário anti-IL-17 do rato gerado em coelho (SC-7927; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), durante 24 horas, em câmara úmida. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado por 2 horas e, na

seqüência, tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP) por 1 hora (Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e posteriormente foi efetuada a contracoloração com Hematoxilina de Harris.

B- Análise imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma de algumas células e na matriz extracelular. Uma análise semi-quantitativa da imunomarcção para IL-17 foi efetuada em dois cortes histológicos de cada espécime. Em cada uma destas secções histológicas foram analisados três campos na região periapical da raiz disto-vestibular com um aumento de 250x. Cada campo de análise apresentava uma dimensão de 800µm x 600µm e se posicionava em toda a adjacência do ápice da raiz mesiovestibular de modo que toda a região periapical desta raiz ficasse contida na análise. Foi efetuada uma análise semi-quantitativa da imunomarcção, e o estabelecimento dos escores foi baseado em adaptação de Garcia et al. (2013), onde: **0**– padrão de imunomarcção nulo (ausência total de imunorreatividade na área); **1**– baixo padrão de imunomarcção (\cong 1/4 da área apresentando imunorreatividade); **2**– moderado padrão de imunomarcção (\cong 1/2 da área apresentando imunorreatividade); **3**– alto padrão de imunomarcção (\cong 3/4 da área apresentando imunorreatividade); **4**– padrão de imunomarcção extremamente elevado (imunorreatividade na quase totalidade da área).

C- Análise por H.E.

A análise microscópica foi realizada nos grupos N, N-PA, DE e DE-PA de forma descritiva e quantitativa em cortes teciduais representativos de cada grupo. A análise quantitativa foi realizada em função das variáveis: infiltrado inflamatório quando à sua intensidade e extensão e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores de 1 a 4 para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a presença de reabsorções radiculares. Para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração linear e por área, respectivamente, empregando programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

Os critérios considerados para cada análise segundo cada escore foram:

A – Intensidade do infiltrado inflamatório

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário (Holland et al., 2007; Cintra et al., 2014) (Quadro 1).

Quadro 1 – Escores para o critério intensidade do infiltrado inflamatório

Escore 1	Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
Escore 2	Infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo);
Escore 3	Infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo);
Escore 4	Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo).

B – Extensão do infiltrado inflamatório

A extensão do infiltrado inflamatório foi estabelecida após uma verificação prévia de todos os espécimes. Após esta primeira análise a máxima magnitude da inflamação foi considerada e os critérios estabelecidos para o período de análise.

Quadro 2 – Escores para o critério extensão do infiltrado inflamatório junto ao tecido periapical

Escore 1	Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
Escore 2	Células inflamatórias ocupando extensão de até 300µm do ápice radicular;
Escore 3	Células inflamatórias ocupando extensão entre 300µm e 600µm do ápice radicular;
Escore 4	Células inflamatórias ocupando extensão maior que 600µm do ápice radicular.

C – Perda de estrutura óssea

Foram selecionados cortes representativos de cada espécime dos grupos com necrose pulpar com e sem diabetes (Grupos 2 e 6) para a verificação da perda de estrutura óssea periapical proveniente da infecção pulpar. Foi empregado o software Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado (μm^2) obtidos em medidas de área.

2.9- Análise estatística

Os valores obtidos por meio dos testes de glicemia (mg/dL), massa corporal (g) e IL-17 (pg/ml) foram tabulados e submetidos à análise estatística por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, Illinois, USA). Após passarem pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, foi aplicado o teste de variância (ANOVA) para os valores quantitativos enquanto que para comparações múltiplas entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Para os dados na forma de escores foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (Siegel *et al.*, 1956) para comparação entre mais de 2 grupos, para posteriormente, quando observada alguma diferença significativa, realizar o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958). Também foi empregado o teste de Mann Whitney (Siegel *et al.*, 1956) para comparação entre dois grupos isoladamente. Para os valores absolutos de perda de estrutura óssea foi realizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0,05$), para comparação entre as médias. Todos os valores expressos na forma de escores foram analisados com o Software Pacote (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes).

Resultados

V- RESULTADOS

1- Níveis de glicemia e massa corporal dos ratos

Observou-se no período inicial (dia 0) que os ratos, em jejum, de todos os grupos apresentaram valores glicêmicos semelhantes e abaixo de 100 mg/dL e que houve um aumento da glicemia no sexto dia após a indução da diabetes nos grupos em que a diabetes experimental foi induzida, e que esse aumento se manteve ao longo dos 30 dias de experimento (Tabela 2), o que confirmou a presença da diabetes nos grupos DE e DE-PA. Os valores glicêmicos dos ratos dos grupos N e N-PA se mantiveram constantes ao longo de todo o experimento (Tabela 2).

Além disso, houve uma perda de massa corporal significativa nos ratos em que a diabetes experimental foi induzida (grupos DE e DE-PA) e um aumento de massa dos ratos normoglicêmicos (grupos N e N-PA) ao longo dos 30 dias de experimento (Tabela 3). A presença da mono-infecção endodôntica não alterou os níveis glicêmicos, tampouco a massa corporal dos ratos.

Tabela 2- Nível sérico de glicose (mg/dL) ± Desvio Padrão*

Grupos	Dia 0	Dia 6	Dia 36	N
N	73,7±9,80 ^a	79,8±11,06 ^a	95±7,33 ^a	10
N-PA	79,8±9,14 ^a	82,8±8,97 ^a	89±8,78 ^a	10
DE	73,5±12,29 ^a	597,3±6,26 ^b	586±20,96 ^b	10
DE-PA	74,4±7,86 ^a	555,4±51,88 ^c	600±0,00 ^b	10

*Letras sobrescritas diferentes (a, b, c) em colunas representam diferença estatística ($p < 0.05$). Tabela representativa dos valores de glicemia (mg/dL) dos grupos N, N-PA, DE, DE-PA no dia 0 (antes da indução da diabetes), no dia 6 (seis dias após a indução da diabetes) e no dia 36 (último dia do período experimental), onde foi observado um grande aumento da glicemia nos ratos dos grupos DE e DE-PA no dia 6 e a sua manutenção ao longo do período experimental ($p < 0,05$).

Tabela 3- Peso dos ratos (g) \pm Desvio Padrão*

Grupos	Dia 0	Dia 36
N	269,8 \pm 20,65 ^a	410 \pm 31,08 ^a
N-PA	268,1 \pm 23,57 ^a	381,1 \pm 31,50 ^a
DE	273,5 \pm 11,72 ^a	210 \pm 38,33 ^b
DE-PA	260 \pm 24,16 ^a	211,4 \pm 30,51 ^b

* Letras sobrescritas diferentes (a, b) em colunas representam diferença estatística ($p < 0,05$). Tabela representativa dos valores de massa corporal (g) dos ratos dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA ao longo do período experimental. Foi observado perda de massa corporal significativa nos grupos DE e DE-PA ao longo do período experimental quando comparados com os grupos N e N-PA ($p < 0,05$).

2- Quantificação de IL-17 nos tecidos hepático e renal pelo método ELISA

Os resultados obtidos podem ser visualizados nas tabelas 4 e 5 e na figura 6. Diante destes valores e da análise estatística, pode-se observar que a presença da diabetes isolada ocasionou um aumento significativo da citocina pró-inflamatória IL-17 nos tecidos hepático e renal ($p < 0,05$). Entretanto, a presença de periodontite apical não foi capaz de alterar a quantidade de IL-17 nos mesmos tecidos tanto dos ratos diabéticos quanto dos ratos nomoglicêmicos ($p > 0,05$).

Tabela 4- Quantidade de IL-17 no fígado (pg/mL) ± Desvio Padrão*

Grupos	Dia 36
N	400,8± 94,5 ^a
N-PA	416,2±157,4 ^a
DE	604,7±116,4 ^b
DE-PA	520,5±129 ^b

*Letras sobrescritas diferentes (a, b) em colunas representam diferença estatística ($p < 0.05$). Tabela representativa dos níveis de IL-17 no tecido hepático dos diferentes grupos (N, N-PA, DE, DE-PA). Foi observado maiores níveis de IL-17 no tecido hepático dos grupos DE e DE-PA quando comparados com os dos grupos N e N-PA ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos N e N-PA e entre os grupos DE e DE-PA ($p > 0,05$).

Tabela 5- Quantidade de IL-17 no tecido renal (pg/mL) ± Desvio Padrão

Grupos	Dia 36
N	266,6± 63,3 ^a
N-PA	271,8±59,8 ^a
DE	384,3±96 ^b
DE-PA	364,6±63,1 ^b

*Letras sobrescritas diferentes (a, b) em colunas representam diferença estatística ($p < 0.05$). Tabela representativa dos níveis de IL-17 no tecido renal dos diferentes grupos (N, N-PA, DE, DE-PA). Foi observado maiores níveis de IL-17 no tecido renal dos grupos DE e DE-PA quando comparados com os dos grupos N e N-PA ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos N e N-PA e entre os grupos DE e DE-PA ($p > 0,05$).

Figura 6- Quantificação de IL-17 nos tecidos hepático e renal

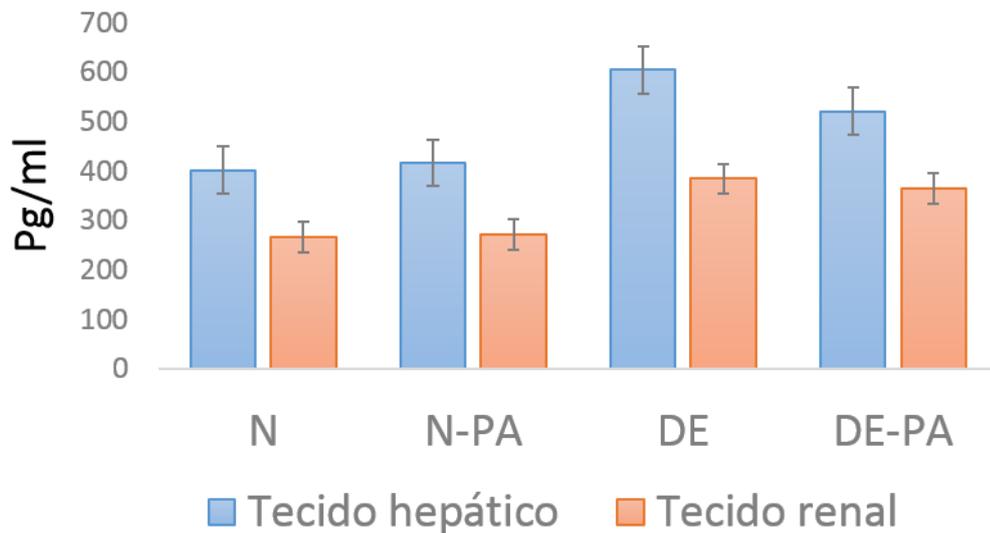


Figura 6- Representação gráfica da quantidade de IL-17 presente nos tecidos hepático renal entre os diferentes grupos. N: ratos normoglicêmicos sem PA; N-PA: ratos normoglicêmicos com PA; DE: ratos com diabetes experimental sem PA; DE-PA: ratos com diabetes experimental com PA. Foram observadas diferenças entre os grupos N e DE; N e DE-PA; N-PA e DE; N-PA e DE-PA ($p < 0.05$). Foi observado maiores níveis de IL-17 nos tecidos hepático e renal dos grupos DE e DE-PA quando comparados com os dos grupos N e N-PA ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos N e N-PA e entre os grupos DE e DE-PA ($p > 0,05$).

2- Análise histológica

Não foi observada inflamação nos tecidos periapicais dos ratos normoglicêmicos (N) nem dos ratos com diabetes experimental (DE) sem infecção endodôntica (Figura 8A e figura 8C). Já os grupos com infecção endodôntica (N-PA e DE-PA) apresentaram periodontite apical, que se encontrava restrita a região periapical (Figura 8E e 8G). Além disso, estas lesões eram compostas, principalmente, por neutrófilos (células polimorfonucleares) e células mononucleares. Histologicamente, o infiltrado inflamatório do grupo DE-PA foi mais severo do que o do grupo N-PA ($p < 0,05$) e, histometricamente, o grupo DE-PA apresentou uma maior área de periodontite apical quando comparado com o grupo N-PA ($p < 0,05$) (Figura 8E e 8G). Os valores em scores obtidos na análise histológica e os valores das médias da análise histométrica se encontram na tabela 6.

Tabela 6- Representação dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e extensão da inflamação e das médias de perda óssea (μm)

		GRUPOS				
		Scores	N	N-PA	DE	DE-PA
Infiltrado Inflamatório	1		10/10	0/10	10/10	0/10
	2		0/0	1/10	0/10	0/10
	3		0/0	7/10	0/10	4/10
	4		0/0	2/10	0/10	6/10
	Mediana		1 ^a	3 ^b	1 ^a	4 ^c
Extensão da inflamação	1		10/10	0/10	10/10	0/10
	2		0/10	3/10	0/10	0/10
	3		0/10	5/10	0/10	2/10
	4		0/10	2/10	0/10	8/10
	Mediana		1 ^a	3 ^b	1 ^a	4 ^c
Perda óssea		Média (μm)	0 ^a	0797712,1 ^b	0 ^a	0985946,7 ^c

Tabela 6- Tabela representativa dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e extensão do infiltrado inflamatório e dos valores para perda de estrutura óssea dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA. Os resultados mostraram que o grupo N apresentou células inflamatórias ausentes ou em número desprezível, bem como ausência de perda óssea. O grupo N-PA apresentou células inflamatórias ocupando, predominantemente, extensão de até 600 μm do ápice radicular e apresentou perda de estrutura óssea com área média de 0797712,1 μm . O grupo DE apresentou células inflamatórias ausentes ou em número desprezível, bem como ausência de perda óssea. O grupo DE-PA apresentou células inflamatórias ocupando, predominantemente, extensão maior que 600 μm do ápice radicular e perda óssea com área média de 0985946,7 μm .

4- Análise Imunoistoquímica para detecção de IL-17

A técnica imunoistoquímica empregada para a marcação de IL-17 mostrou alta especificidade na detecção de tal citocina, o qual foi comprovada pela ausência total de imunomarcagem no controle negativo da reação imunoistoquímica. A imunomarcagem apresentou uma coloração acastanhada confinada a algumas células e a matriz extracelular. A imunomarcagem estava presente, predominantemente, no ligamento periodontal, nas margens do osso alveolar e na periodontite apical.

Para IL-17 prevaleceram os seguintes padrões de imunomarcagem: baixo, em N; baixo à moderado, em DE; moderado, em N-PA e; moderado à alto, em DE-PA. A distribuição dos escores e o padrão de imunorreatividade representativo de cada grupo experimental estão apresentados na nas figuras 7 e 8.

Foi observado que os grupos com periodontite apical (N-PA e DE-PA) apresentaram níveis de IL-17 mais elevados quando comparados aos grupos sem infecção endodôntica (N e DE) ($p < 0,05$). Os grupos diabéticos (DE e DE-PA) também apresentaram níveis mais elevados de IL-17 quando comparados aos grupos normoglicêmicos (N e N-PA) ($p < 0,05$). O grupo diabético com periodontite apical (DE-PA) apresentou níveis de IL-17 mais elevados quando comparados com o grupo normoglicêmicos com periodontite apical (N-PA) ($p < 0,05$).

Figura 7- Padrão de imunorreatividade dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA

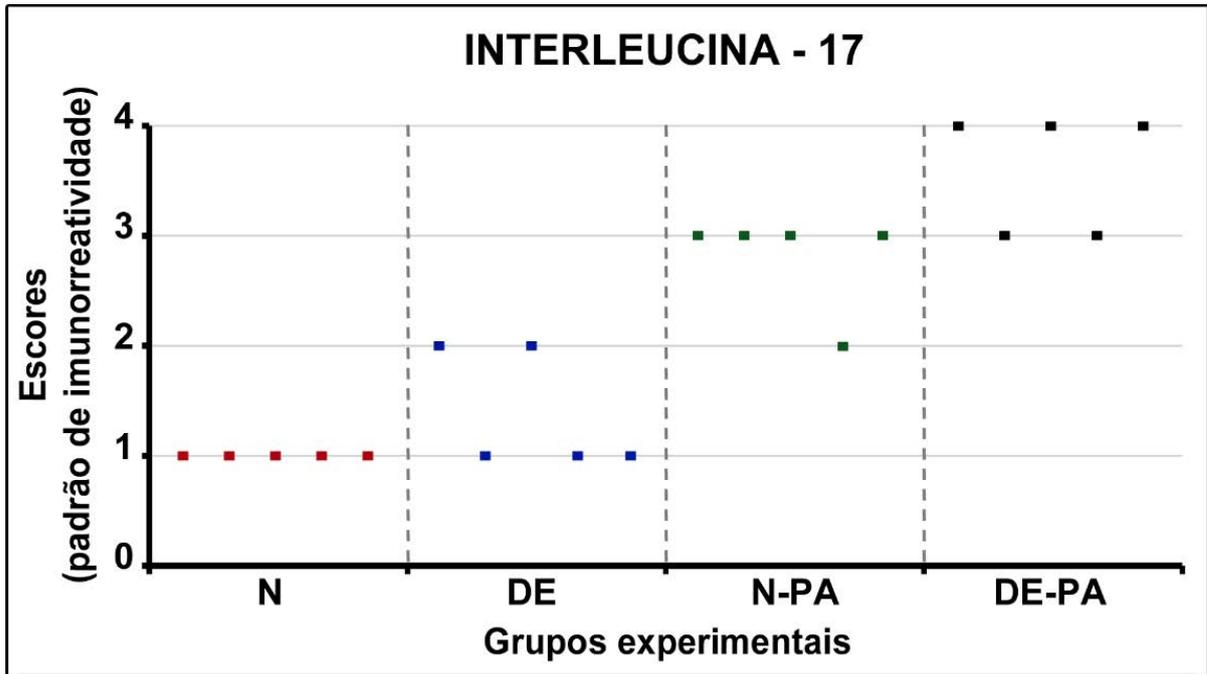


Figura 7: Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção para IL-17 na região periapical nos diferentes grupos experimentais. Foi observado um padrão de imunorreatividade baixo em N; de baixo a moderado em DE; de moderado a alto em N-PA e alto em DE-PA.

Figura 8- Representação histológica e da imunorreatividade para IL-17 dos grupos N, N-PA, DE e DE-PA

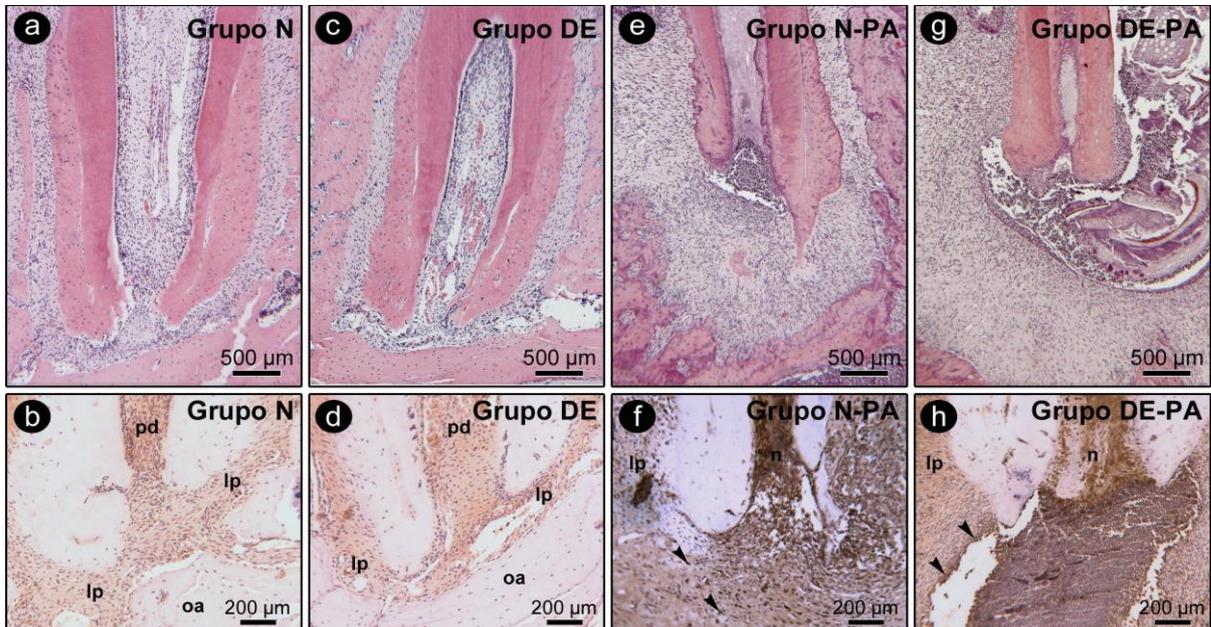


Figura 8. A- Representação histológica (HE) da região periapical do grupo N, onde podemos observar ausência de infiltrado inflamatório; B- Imunomarcção da região periapical do grupo N, onde podemos observar um padrão de imunorreatividade baixo; C- representação histológica (HE) da região periapical do grupo DE, onde podemos observar ausência de infiltrado inflamatório; D- Imunomarcção da região periapical do grupo DE, onde podemos observar um padrão de imunorreatividade baixo a moderado; E- representação histológica (HE) da região periapical do grupo N-PA, onde podemos observar um infiltrado inflamatório ocupando extensão menor que 600 µm da periodontite apical; F- Imunomarcção da periodontite apical do grupo N-PA, onde podemos observar um padrão de imunorreatividade moderado a alto; G- representação histológica (HE) da região periapical do grupo DE-PA, onde podemos observar um infiltrado inflamatório ocupando extensão maior que 600 µm da periodontite apical; H- Imunomarcção da periodontite apical do grupo DE-PA, onde podemos observar um padrão de imunorreatividade alto.

Discussão

VI- DISCUSSÃO

Os ratos utilizados neste estudo tinham massa corporal semelhante e eram normoglicêmicos. A diabetes experimental foi induzida por meio de uma injeção de estreptozotocina e os níveis de glicose encontrados foram, aproximadamente, 6 vezes maiores do que os encontrados nos ratos normoglicêmicos. Os ratos diabéticos apresentaram notável polidipsia, poliúria, apatia e perda de peso. Este modelo de estudo foi escolhido, visto que estudos relatam que o metabolismo geral de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina é muito semelhante ao metabolismo de pacientes diabéticos humanos (Garber et al., 2009). A estreptozotocina tem sido amplamente utilizada em pesquisas para desenvolver diabetes em ratos (Dirice, et al., 2011; Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014). A droga é levada para as células por meio de receptores de GLUT2 devido à sua semelhança com a molécula de glicose, e é capaz de limitar a sua ação principalmente nas células beta pancreáticas. O seu efeito tóxico é exercido por meio de mecanismos, tais como a formação de óxido nítrico, alquilação e fragmentação do ADN (Yamamoto, Uchigata, Okamoto, 1981; Turk, et al., 1993).

O modelo de estudo para a infecção endodôntica foi realizado de acordo com estudos anteriores que relataram a expansão da lesão e a destruição óssea entre os dias 7 e 15 após a exposição pulpar ao meio oral (Garber et al., 2009; Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014).

No presente estudo, as concentrações de glicose no sangue foram mais elevadas, e acima de 200mg/dL, nos ratos após a indução da diabetes experimental quando comparadas as dos ratos normoglicêmicos ($p < 0.05$), o que comprova a eficácia do método de indução de diabetes. Apesar de existirem estudos na literatura que mostram que a DP aumenta a glicemia de ratos diabéticos (Moeintaghavi et al., 2012; Botero et al. 2012) e que a PA potencializa esse aumento (Cintra et al., 2013) nossos resultados mostraram que a presença de uma única PA não foi capaz de alterar a glicemia tanto dos ratos diabéticos quanto dos ratos normoglicêmicos ($p > 0,05$), o que mostra que mais estudos precisam ser realizados para compreender a influência que a PA pode causar sistemicamente. Um dos caminhos será o de estudar a influência que duas ou mais periodontites apicais possam exercer sob o controle glicêmico, visto que a população brasileira apresenta uma média de 2,7 periodontites apicais presentes por indivíduo (Marota et al., 2012), denotando ser comum a presença de mais de um foco residual de infecção em um mesmo paciente.

A quantificação da IL-17 foi realizada por meio do método ELISA de captura, que é uma metodologia extremamente confiável para a quantificação de uma ampla variedade de testes em matrizes complexas, tais como o soro, o plasma e lisados celulares, bem como a partir de sobrenadantes de cultura de tecidos e culturas de células ativadas *in vitro* (Kai et al., 2012).

Até o momento, não existiam estudos na literatura que quantificassem a IL-17 no tecido hepático, tampouco no renal, frente a presença de diabetes experimental. Os resultados obtidos são coerentes com os estudos existentes na literatura, visto que já foi relatado o aumento de IL-17 nos tecidos linfóides e pancreáticos (Simoni et al., 2011), bem como na corrente sanguínea (Sumarac-Dumanovic et al., 2013) de diabéticos. Além disso, existem diversos estudos que mostram resultados positivos na melhora da DM, por meio da inibição da IL-17 (Jain et al., 2008; Boehm et al., 2009; Emamaullee et al., 2009; Wang et al., 2011; Amirshahrokhi et al., 2012; Zhang et al., 2012) e outros que evidenciaram que o aumento dos níveis de IL-17 está relacionado com o descontrole glicêmico (Simoni et al., 2011; Kumar et al., 2013).

Com relação às infecções bucais, nossos resultados mostraram que a presença de uma única periodontite apical não foi capaz de alterar a quantidade de IL-17 nos tecidos hepático e renal na presença ou ausência de diabetes experimental. Entretanto, existem relatos na literatura que mostram que a DP foi capaz de alterar o nível sérico de IL-17 em pacientes normais (Schenkein et al., 2010) e em pacientes diabéticos (Santos, et al., 2010; Zhao et al., 2011). Sabe-se também que a PA potencializa a expressão de IL-17 no tecido hematológico de ratos diabéticos com DP (Cintra et al., 2014). Essa comparação se deve porque sabe-se que a patogênese da DP é semelhante à da PA, representadas pela resposta do organismo frente a um agente agressor, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e consequente reabsorção óssea (Silva, et al., 2007). O que nos mostra que mais investigações precisam ser realizadas em relação a influência da periodontite apical em tecidos durante a presença ou ausência de doenças sistêmicas.

Com relação aos achados histológicos, foi observado que a DM acelera o desenvolvimento e progressão da PA em ratos, com presença de um infiltrado inflamatório, contendo neutrófilos e células mononucleares, o que é consistente com outros estudos realizados (Fouad et al., 2003; Iwama et al., 2003; Cintra et al., 2014). Estes resultados sugerem que ocorre uma intensa resposta inflamatória em condições de hiperglicemia, o que

também condiz com outros achados na literatura (Cintra et al., 2013, Iwama et al., 2003; Cintra et al., 2014). Histometricamente, as periodontites apicais dos ratos diabéticos também foram maiores quando comparadas com as dos ratos normoglicêmicos ($p < 0,05$). Tem sido relatado que a diminuição de insulina em diabéticos correlaciona-se com um balanço negativo de cálcio no organismo (Schneider & Schedl, 1972), o que leva a remodelação óssea reduzida e diminuição do crescimento (Hough et al., 1981). Este desequilíbrio de cálcio e remodelação óssea reduzida podem também explicar porque as periodontites apicais foram maiores nos ratos diabéticos quando comparadas as dos ratos normoglicêmicos.

Observou-se no presente estudo, um aumento de IL-17 na região periapical dos ratos normoglicêmicos com periodontite apical (N-PA) quando comparados ao grupo controle (N) ($p < 0,05$) e também foi observado um aumento de IL-17 nos grupos diabéticos com periodontite apical (DE-PA) quando comparados aos ratos diabéticos (DE), o aumento de IL-17 frente a presença de PA encontrado em nosso estudo, está de acordo com outros estudos existentes na literatura (Xiong et al., 2009; Marçal et al., 2010; Aishwaimi et al., 2013; Yang et al., 2014). Isso pode ser explicado devido a PA ser caracterizada por uma persistente migração e infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e mastócitos (Takahashi, 1998). Investigações prévias sugerem que os linfócitos T CD4⁺ são as células inflamatórias infiltrantes predominantes presentes na PA e que desenvolvem um papel nesta doença (Kawashima et al., 1996; Colic et al., 2006). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que é, principalmente, secretada por linfócitos T, que são mediadores do sistema imune adaptativo (Iwakura et al., 2011). Além disso, a IL-17 promove a expansão e o recrutamento de células de defesa do sistema imune inato para amplificar a inflamação e mobilizar neutrófilos (Korn et al., 2009; Cua & Tato, 2010), assim, sugere-se que a IL-17 desenvolve um papel protetor contra a infecção, estimulando a reabsorção óssea na região periapical (Xiong et al., 2009)

Até o momento, não existia nenhum estudo na literatura que comparasse a quantidade de IL-17 presente na região periapical de ratos diabéticos com ratos normoglicêmicos. Os resultados deste estudo mostraram que existe um aumento de IL-17 na região periapical de ratos diabéticos sem periodontite apical (DE) quando comparados aos ratos do grupo controle (N) ($p < 0,05$). E também houve um aumento de IL-17 na periodontite apical de ratos com diabetes experimental com periodontite apical (DE-PA) quando comparados com os ratos normoglicêmicos com PA (N-PA) ($p < 0,05$). Estudos mostram que a DM atua no processo de desenvolvimento, progressão e severidade da PA (Fouad et al, 2002; Iwana et al, 2003;

Armada-Dias et al, 2006; Kodama et al. 2011), maior risco de perda dentária (Brito et al, 2003; Wang et al, 2011), bem como na maior liberação de IL-17 (Xiong et al., 2009; Marçal et al., 2010). Os achados deste estudo são de extrema importância, visto que sugerem que a IL-17 é uma das citocinas que atua no desenvolvimento de lesões periapicais frente a doença diabetes e abre caminho para que outros mediadores inflamatórios sejam estudados para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos responsáveis por exacerbar a reabsorção óssea em diabéticos.

Conclusão

VII- CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- A presença da infecção endodôntica altera a quantidade de IL-17 presente na região periapical;
- A presença da infecção endodôntica em um único elemento dentário não altera a quantidade de IL-17 nos tecidos hepático e renal.
- A presença de diabetes experimental aumenta a quantidade de IL-17 nos tecidos periapicais de ratos com periodontite apical e sem periodontite apical.
- A presença de diabetes experimental aumenta o tamanho e a severidade da periodontite apical;
- A presença de diabetes experimental aumenta a quantidade de IL-17 nos tecidos hepático e renal;

Referências

VIII- REFERÊNCIAS

1. Alshwaimi E, Berggreen E, Furusho H, Rossall JC, Dobeck J, Yoganathan S, Stashenko P, Sasaki H. IL-17 receptor A signaling is protective in infection stimulated periapical bone destruction. *J Immunol.* 2013; 191(4):1785-91.
2. Al-Khabbaz AK, Al-Shammari KF. Diabetes mellitus and periodontal health: dentists' knowledge. *Med Princ Pract.* 2011; 20(6):538-44.
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2013; 36 (Suppl. 1): s67-S74.
4. Amir J, Waite M, Tobler J, Catalfamo DL, Koutouzis T, Katz J, Wallet SM. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. *Cell Immunol.* 2011; 272(1):45-52.
5. Amirshahrokhi K, Ghazi-Khansari M. Thalidomide attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice by inhibition of proinflammatory cytokines. *Cytokine.* 2012; 60(2):522-7.
6. Andrade AL, Nonaka CF, Gordón-Núñez MA, Freitas Rde A, Galvão HC. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endod.* 2013; 39(8):990-4.
7. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rôcas IN, Gahyva SM, Siqueira-Junior JF. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J. Appl. Oral Sci.* 2006; 14(5):371-375.
8. Athyros VG, Mitsiou EK, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Impact of managing atherogenic dyslipidemia on cardiovascular outcome across different stages of diabetic nephropathy. *Expert Opin Pharmacother.* 2010; 11: 723– 730.
9. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E, Sumida DH. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod.* 2013; 39(5):648-52.
10. Awuti G, Younusi K, Li L, Upur H, Ren J. Epidemiological survey on the prevalence of periodontitis and diabetes mellitus in uyghur adults from rural hotan area in xinjiang. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:758921.
11. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod.* 2003; 29(6):383-389.
12. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol.* 2009; 183(7):4432-9.

13. Boehm BO, Rosinger S, Sauer G, Manfras BJ, Palesch D, Schiekofer S, Kalbacher H, Burster T. Protease-resistant human GAD derived altered peptide ligands decrease TNF- α and IL-17 production in peripheral blood cells from patients with type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol*. 2009; 46(13):2576-84.
14. Botero JE, Yepes FL, Roldán N, Castrillón CA, Hincapie JP, Ochoa SP, Ospina CA, Becerra MA, Jaramillo A, Gutierrez SJ, Contreras A. Tooth and Periodontal Clinical Attachment Loss are Associated With Hyperglycemia in Diabetic Patients. *J Periodontol*. 2012; 83, 1245-50.
15. Brito LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96:449-452.
16. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodriguez RR. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci*. 2006; 48(4):195-199.
17. Chala S, Abouqal R, Abdallaoui F. Prevalence of apical periodontitis and factors associated with the periradicular status. *Acta Odontol Scand*. 2011; 69(6):355-9.
18. Chang PC, Chung MC, Wang YP, Chien LY, Lim JC, Liang K, Chong LY, Kuo YP, Chen CH, Chiang HC. Patterns of Diabetic Periodontal Wound Repair: A Study Utilizing Micro-Computed Tomography and Immunohistochemistry. *J Periodontol*. 2012; 83(5):644-52.
19. Chung HW, Lim JH, Kim MY, Shin SJ, Chung S, et al. High-fat diet-induced renal cell apoptosis and oxidative stress in spontaneously hypertensive rat are ameliorated by fenofibrate through the PPAR α -FoxO3a-PGC-1 α pathway. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 2213–2225.
20. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2013a; 17(6):1595-9.
21. Cintra LT1, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. In press: 2014.
22. Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J*. 2013b.
23. Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Vasilijic S, Rudolf R, Lukic A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions, *Mol Immunol*. 2009; 47(1):101-13.
24. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39(9):690-6.

25. Colić M, Lukić A, Vučević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M, Dimitrijević J. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12):1120-30.
26. Colić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vučević D, Marjanović M, Lukić A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(4):315-20.
27. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7):479-89.
28. Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dike TE. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patients. A case report. *J Periodontol.* 1991; 62(6):394-401.
29. Deshpande K, Jain A, Sharma R, Prashar S, Jain R. Diabetes and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2010; 14(4):207-12.
30. Dirice E, Kahraman S, Elpek GO, Aydin C, Balci MK, Omer A, Sanlioglu S, Sanlioglu AD. TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY- applied NOD mice. *Exp Diabetes Res.* 2011; 625813.
31. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Ann Math Statist* 1958; 29(4):1095-1111.
32. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2009; 58(6):1302-11.
33. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl).* 2011; 124(14):2162-6.
34. Fouad AF, Barry J, Russo J, Radolf J, Zhu Q. Periapical lesion progression with controlled microbial inoculation in a type I diabetic mouse model. *J Endod.* 2002; 28 (1):8-16.
35. Fouad AF, Burlinson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134(1):43-51.
36. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ.* 2003; 67(4):459-67.
37. Franceschini N, Shara NM, Wang H, Voruganti VS, Laston S. The association of genetic variants of type 2 diabetes with kidney function. *Kidney Int.* 2012; 82: 220–225.
38. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod.* 2009; 35(1):60-62.

39. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2013 .
40. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(5):613-9.
41. Glick DH. Interrelationship of Systemic and Endodontic Clinical Problems. *Dental Clinics of North America* 1974; 18(2):233-41.
42. Grieco FA, Moore F, Vigneron F, Santin I, Villate O, Marselli L, Rondas D, Korf H, Overbergh L, Dotta F, Marchetti P, Mathieu C, Eizirik DL. IL-17A increases the expression of proinflammatory chemokines in human pancreatic islets. *Diabetologia.* 2013. In press.
43. GUYTON, A.C., HALL, J.E *Tratado De Fisiologia Médica* 10. Ed. Rj .Guanabara Koogan, 2002.
44. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011; 34(2):149-62.
45. Heerspink HJ, de Zeeuw D. The kidney in type 2 diabetes therapy. *Rev Diabet Stud.* 2011; 8: 392–402.
46. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *JEndod.* 2011; 37(12):1659-62.
47. Holland R, Mazuqueli L, de Souza V, Murata SS, Dezan Júnior E, Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007; 33(6): 693-7.
48. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T, Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010; 185(3):1959-67.
49. Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Teitelbaum SL. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. *Endocrinology.* 1981; 108:2228-2234.
50. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, Nakamura H. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101(5):681-686.
51. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamazaki M, Nakamura H, Kameyama Y, Kapila Y. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J. Dent Res.* 2003; 82(4):322-325.

52. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Ellis JS, Hoeman CM, Franklin CL, Zaghoulani H. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med*. 2008; 205(1):207-18.
53. Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K. Cytokine Profile in the Gingival Crevicular Fluid of Periodontitis Patients With and Without Type 2 Diabetes: A literature Review. *J Periodontol*. 2011.
54. Joseph J, Bittner S, Kaiser FM, Wiendl H, Kissler S. IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. *J Immunol*. 2012; 188(1):216-21.
55. Kai J, Puntambekar A, Santiago N, Lee SH, Sehy DW, Moore V, Han J, Ahn CH. A novel microfluidic microplate as the next generation assay platform for enzyme linked immunoassays (ELISA). *Lab Chip*. 2012; 12 (21): 4257-62.
56. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod*. 1996; 22(6):311-6.
57. Kim MY, Lim JH, Youn HH, Hong YA, Yang KS, et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1 α axis in db/db mice. *Diabetologia*. 2013; 56: 204–217.
58. Kodama Y, Matsuura M, Sano T, Nakahara Y, Ozaki K, Narama I, Matsuura T. Diabetes enhances dental caries and apical periodontitis in caries-susceptible WBN/KobSlc rats. *Comp Med*. 2011; 61(1):53-9.
59. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:485-517.
60. Kumar P, Natarajan K, Shanmugam N. High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: Molecular mechanisms of IL-17 family gene expression. *Cell Signal*. 2013; 26(3):528-539.
61. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, Horie I, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Iwakura Y, Sasaki H, Nagayama Y, Kawakami A, Abiru N. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signaling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 2013; 56(8):1773-80.
62. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M. Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev*. 2011; 7(6):433-9.
63. Lin J, Glynn RJ, Rifai N, Manson JE, Ridker PM, et al. Inflammation and progressive nephropathy in type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*. 2008; 31: 2338–2343.
64. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod*. 2011; 37(5):598-601.

65. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl* 2008; 65: 435–40.
66. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues V Jr, Rodrigues DB. T helper cell type 17/regulatory T cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*. 2010; 36(6):995-9.
67. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod*. 2012; 38(3):297-300.
68. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, Xu L, Priatel JJ, Levings MK, Tan R. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010; 185(7):3814-8.
69. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006; 77(8):1289-303.
70. Meguro S, Tomita M, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, Shimada A, Kawai T, Itoh H, Atsumi H. Factors Associated with the Decline of Kidney Function Differ among eGFR Strata in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol*. 2012; 2012: 687867.
71. Moeintaghavi A, Arab HR, Bozorgnia Y, Kianoush K, Alizadeh M. Non-surgical periodontal therapy affects metabolic control in diabetics: a randomized controlled clinical trial. *Aust Dent J*. 2012; 57(1): 31-7.
72. Murea M, Freedman BI, Parks JS, Antinozzi PA, Elbein SC, et al. Lipotoxicity in diabetic nephropathy: the potential role of fatty acid oxidation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010; 5: 2373–2379.
73. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 433–442.
74. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J*. 2011; 44(7):610-25.
75. Oliver RC, Tervonen T. Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol* 1994; 65(5):530-8.
76. Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, Kanamura N, Iwakura Y, Imanishi J, Kita M. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol Immunol*. 2009; 53(5):287-94.
77. Ou L, Li RF. Effect of periodontal treatment on glycosylated hemoglobin levels in elderly patients with periodontal disease and type 2 diabetes. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(19):3070-3.

78. Passoja A, Knuuttila M, Hiltunen L, Karttunen R, Niemelä O, Raunio T, Vainio O, Hedberg P, Tervonen T. Serum interleukin-6 may modulate periodontal inflammation in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(8):687-93.
79. Peters LB, Lindeboom JA, Elst ME, Wesselink PR. Prevalence of apical periodontitis relative to endodontic treatment in an adult Dutch population: a repeated cross-sectional study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 111(4):523-8.
80. Ponte E, Tabaj D, Maglione M, Melato M. Diabetes mellitus and oral disease. *Acta Diabetol* 2001; 38: 57-62.
81. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012; 55(1):21-31.
82. Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, et al. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116: 479–492.
83. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*. 1993; 150(12):5445-56.
84. Rutledge JC, Ng KF, Aung HH, Wilson DW. Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6: 361–370.
85. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Myśliwska J. Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2013; 74(6):701-7.
86. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Napimoga MH, Bastos MF, Duarte PM. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(12):1049-58.
87. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010; 89(9):943-7.
88. Schneider L, Schedl H. Diabetes and intestinal calcium absorption in rat. *Am J Physiol*. 1972; 223:1319-1323.
89. Siegel S. Non-parametric statistic for the behavioral sciences. McGraw-Hill Book Co., New York 1956; 184-94.
90. Silva JA, Ferrucci DL, Peroni LA, Abrahão PG, Salamene AF, Rossa-Junior C, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Sequential IL-23 and IL-17 and increased Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an experimental model of periodontal disease in type 1 diabetes. *J Cell Physiol*. 2012; 227(6):2441-50
91. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007; (86): 306-19.
92. Simoni Y, Gautron AS, Beaudoin L, Bui LC, Michel ML, Coumoul X, Eberl G, Leite-de-Moraes M, Lehuen A. NOD mice contain an elevated frequency of iNKT17 cells that exacerbate diabetes. *Eur J Immunol*. 2011; 41(12):3574-85.

93. Sociedade Brasileira de Diabetes. Calcule o número de diabéticos na sua cidade. Acesso em agosto de 2011. Disponível em <http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/calculadoras/numero-de-diabeticos>.
94. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*. 2013; 62(2):175-82.
95. Sumarac-Dumanovic M, Jeremic D, Pantovic A, Janjetovic K, Stamenkovic-Pejkovic D, Cvijovic G, Stevanovic D, Micic D, Trajkovic V. Therapeutic improvement of glucoregulation in newly diagnosed type 2 diabetes patients is associated with a reduction of IL-17 levels. *Immunobiology*. 2013; 218(8):1113-8.
96. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ, Qin GM. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Intern Med*. 2011;50(15):1569-74.
97. Surendar J, Mohan V, Pavankumar N, Babu S, Aravindhan V. Increased Levels of Serum Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Associated with Activated Peripheral Dendritic Cells in Type 2 Diabetes Subjects (CURES-99). *Diabetes Technol Ther*. 2012; 14(4):344-9.
98. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*. 1998; 31:311-25.
99. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 2008; 14(3):191-203.
100. Triñanes J, Salido E, Fernández J, Rufino M, González-Posada JM, Torres A, Hernández D. Type 1 Diabetes Increases the Expression of Proinflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in the Artery Wall of Candidate Patients for Kidney Transplantation. *Diabetes Care*. 2012; 35(2):427-33.
101. Turk J, Corbett JA, Ramanadham s, Bohrer A, Mcdaniel ML. . Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Resear Com*. 1993; 197 (3): 1458-1464.
102. van den Brandt J, Fischer HJ, Walter L, Hünig T, Klötting I, Reichardt HM. Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *J Immunol*. 2010; 185(4):2285-94.
103. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 2: 550–562.
104. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod*. 2011; 37(1):1-5.
105. Wang M, Yang L, Sheng X, Chen W, Tang H, Sheng H, Xi B, Zang YQ. T-cell vaccination leads to suppression of intrapancreatic Th17 cells through Stat3-mediated ROR γ t inhibition in autoimmune diabetes. *Cell Res*. 2011; 21(9):1358-69.

106. Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, Koizumi Y, Suda H. Kinetics of Th17 related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Aust Endod J*. 2013; 39(3):164-70.
107. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27:1047-53
108. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod*. 2009; 35(2):216-20.
109. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981; 294(5838):284-6.
110. Yang S1, Zhu L1, Xiao L1, Shen Y2, Wang L1, Peng B3, Haapasalo M2. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014; 40(1):56-62.
111. Yaochite JN, Caliari-Oliveira C, Davanzo MR, Carlos D, Malmegrim KC, Cardoso CR, Ramalho LN, Palma PV, da Silva JS, Cunha FQ, Covas DT, Voltarelli JC. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology*. 2013; 218(3):338-52.
112. Yeh CK, Harris SE, Mohan S, Horn D, Fajardo R, Chun YH, Jorgensen J, Macdougall M, Abboud-Werner S. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. *Lab Invest*. 2012; 92(6):868-82.
113. Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, Zhao Y. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(2):175-86.
114. Zhang J, Huang Z, Sun R, Tian Z, Wei H. IFN- γ induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice. *J Autoimmun*. 2012; 38(1):20-8.
115. Zhang L, Li X, Bi LJ. Alterations of collagen-I, MMP-1 and TIMP-1 in the periodontal ligament of diabetic rats under mechanical stress. *J Periodontol Res*. 2011; 46(4):448-55.
116. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31:574-7.
117. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(6):509-16.
118. Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(11):487-511.

Anexo

