



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**ROMERITO LINS DA SILVA**

**Investigação da expressão de genes do metabolismo lipídico em  
pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, Dislipidemia e Doença  
Periodontal Crônica**

**ARARAQUARA**

**2016**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**ROMERITO LINS DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO  
METABOLISMO LIPIDÍCO EM PACIENTES COM DIABETES  
MELLITUS TIPO 2, DISLIPIDEMIA E DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

**ARARAQUARA**

**2016**

Silva, Romerito Lins da

Investigação da expressão de genes do metabolismo lipídico em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2. Dislipidemia e doença periodontal crônica / Romerito Lins da Silva.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

63 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Scarel Caminaga

1. Diabetes mellitus tipo 2      2. Doenças periodontais  
3. Dislipidemias 4. Expressão gênica 5. Adipocinas I. Título

**ROMERITO LINS DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO LIPÍDICO EM  
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, DISLIPIDEMIA E DOENÇA  
PERIODONTAL CRÔNICA**

Dissertação para obtenção do grau de mestre

**Comissão Julgadora**

Presidente e orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Prof. Dr. Bruno César de Vasconcelos Gurgel

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 22 de Março de 2016.

## **DADOS CURRICULARES**

**ROMERITO LINS DA SILVA**

**NASCIMENTO:** 02.03.1987 – Mossoró – Rio Grande do Norte

**FILIAÇÃO:** Antônio Roberto de Oliveira Silva

Rosali Lins da Silva

**2007-2011** Curso de Graduação

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

**2014-2016** Mestrado em Odontologia - Área de Concentração Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*"Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento.*

*Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas. "*

**(Provérbios 3:5,6)**

Com muito amor, dedico este trabalho...

A Deus, pois nenhuma destas palavras poderiam estar escritas se não por sua vontade.

Por seu amor e imensa misericórdia derramados sobre minha mãe Rosali, meu pai Antônio Roberto, minha irmã Roberta e toda a minha família.

# *Agradeço de todo coração...*

*Á Deus, por nos últimos anos ter me permitido lutar diversas batalhas com joelhos dobrados.*

“O Senhor, com sabedoria fundou a terra; com entendimento preparou os céus.  
Pelo seu conhecimento se fenderam os abismos, e as nuvens destilam o orvalho.  
Filho meu, não se apartem estas coisas dos teus olhos: guarda a verdadeira sabedoria e  
o bom siso;  
Porque serão vida para a tua alma, e adorno ao teu pescoço.  
Então andarás confiante pelo teu caminho, e o teu pé não tropeçará.  
Quando te deitares, não temerá; ao contrário, o teu sono será suave ao te deitares.”

**Provérbios 3:19-24**

*Aos meus pais, Antônio Roberto e Rosali. Agradeço por todo amor, incentivo e responsabilidade que tiveram ao me conduzir a mais esta conquista. Não é fácil estar a 2698,2 km de distância, mas seu exemplo sempre me inspirou, me deu força e ânimo. Obrigado por me proporcionarem a verdadeira herança, aquela que jamais alguém poderá roubar. OS AMO ETERNAMENTE.*

*À minha tia Maria da Conceição por todo apoio e amor dedicado, obrigado por ter me ensinando sempre o verdadeiro sentido da responsabilidade e profissionalismo. À minha querida avó Maria das Dores, por sempre me amar e me permitir cuidar quando necessário. AS AMO INCONDICIONALMENTE.*

*À minha querida irmã Roberta, por sempre me apoiar, compartilhar amor e ser mais um exemplo de determinação e força. Obrigado pelo incentivo e por ser minha confidente. Entre nós o verdadeiro sentido da palavra irmão existe na essência. A AMO ETERNA E INCONDICIONALMENTE.*

“Mas a misericórdia do Senhor é desde a eternidade e até a eternidade sobre aqueles que o temem, e a sua bondade permanece, passando de pais a filhos;.”

**Salmos 103:17,18**

*À minha querida orientadora, Profa. Dra. Raquel Scarel Caminaga. OBRIGADO por ter me acolhido quando muitas incertezas permeavam meus pensamentos. Obrigado por verdadeiramente orientar e a me ensinar ser mais objetivo, sempre com muita competência e maestria. Por me confiar ao convívio de seu laboratório, por ter acreditado em mim durante esses dois anos. Sua dedicação ao trabalho e paixão pela pesquisa sempre será inesgotável fonte de inspiração e incentivo para mim, assim como a forma como colocas Deus á frente de todos os seus projetos. Muito obrigado por TUDO.*

*Aos meus companheiros de laboratório, Rafael Nepomuceno, Sâmia Corbi e Livia Finoti. Agradeço “Rafa” pela paciência, disposição e ajuda a me ensinar sempre que precisei. Sâmia, obrigado por ter vindo a mim quando mais precisava, pela ajuda, incentivo, dicas e claro, muitos risos. Sem vocês a realização deste trabalho não seria possível. “Li” sua amizade para mim é como uma flor! A mais perfumada... Obrigado por ter me ofertado uma amizade sincera, pura e confiável.*

*Às queridas Giovanna Anovazzi, Suzane Pigossi, Sâmara Tfaile, Bruna Valerinni, Thamires Cireli, meu muito obrigado pelo prazer de poder conviver com vocês e a dividir o laboratório de genética molecular sempre com boas conversas e momentos de felicidade.*

“Que a mensagem de Cristo, com toda a sua riqueza, viva no coração de vocês. Ensinem e instruam uns aos outros com toda a sabedoria. Cantem salmos, hinos e canções espirituais; louvem a Deus, com gratidão no coração.”

#### **Colossenses 3:16**

*À minha querida amiga Kahena Soldati e família. Não tenho palavras para agradecer ao tudo que vocês me fizeram. Obrigado pela cama cedida, pelos almoços de domingo em família, pelo ouvido de “penico” quando eu falava muita bobagem. Obrigado por ter me colocado dentro de sua casa e ser essa amiga maravilhosa e de coração tão bom. Amo muito você!*

*Aos queridos Jonleno Coutinho e Dayane Brandão. Será eterno e para toda a vida! Amigos queridos, obrigado pelo convívio, por permitirem cuidar de vocês quando estavam tristes por causa da distância de casa. Por terem cuidado de mim e claro, pelos risos e conversas aleatórias sempre cheias de alegrias e verdades! Obrigado amigos!*

*Aos meus companheiros de turma Bruno, Luba, Maurício, Willo, Leslie, Mariana, Mayara e Luís. Muito obrigado pelo convívio e experiências trocadas.*

*À minha amiga Cibele que me recebeu em Araraquara há três anos e me permitiu conhecer este mundo no qual faço parte hoje. Obrigado amiga por sua amizade sincera e por sempre ser um espelho de inspiração para mim.*

“ Uma pessoa longe de casa é como  
um pássaro longe do ninho.”

“Assim como os perfumes alegram a  
vida, a amizade sincera dá ânimo para  
viver.”

#### **Provérbios 27-8, 9**

*Às amigas de toda vida, Camila Caroline e Idaisa Figueiredo. Obrigado Camila por ter entrado em minha vida. Você foi usada por Deus para me permitir hoje amar nosso SENHOR. Um presente de imenso valor para mim... Minha jornada em Araraquara não poderia ser o que é sem o convite que me foi feito por você a conhecer JESUS CRISTO. Obrigado “Ida” por sempre acreditar em mim, a me incentivar e compartilhar alegria... Você me ensina a querer ser alegre em todos os dias e a levar o mundo com mais leveza. Obrigado!*

*Às amigas do peito Ruth e Bruna. Sem sua amizade eu não seria nada. Irmãs que me apoiam mesmo longe... Mesmo sem vê-las como gostaria! AS AMO INCONDICIONALMENTE.*

*Às minhas primas Kananda, Kadja, Danila, Dalila e Taty que sempre iam me ver e se esforçavam para matar as saudades apesar do tempo sempre curto em minha terra. Seu carinho sempre me auxilia. Obrigado!*

*Às hoje muito queridas Camila Coutinho e Victória Ceridono. Obrigado por compartilharem comigo os momentos de solidão, sempre com muita honestidade, alegria e tiradas engraçadíssimas.*

“Algumas amizades não duram nada, mas um  
verdadeiro amigo é mais chegado que um irmão.”

#### **Provérbios 24-18**

# *Agradecimentos*

*À Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de sua Diretora, Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon, e da Vice-Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.*

*Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.*

*À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e a Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.*

*Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. Élcio Marcantonio Junior, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio e Profa. Dra. Daniela Leal Zandim Barcelos que colaboraram com a minha formação.*

*A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, D. Maria do Rosário, Maria José (Zezé), Claudinha e especialmente a Isa e Suleima pela paciência e amizade.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Alexandre e Cristiano, pela gentileza com que sempre me receberam, pela enorme paciência e competência e por resolverem tantas dúvidas!*

*Aos funcionários da Biblioteca, Marley, Eliane, Adriano, Maria Inês e Ceres, pela disposição de sempre.*

*Aos Pacientes, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigado!*

*A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.*

*Muito Obrigado!*

Silva RL. Investigação da expressão de genes do metabolismo lipídico em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, Dislipidemia e Doença Periodontal Crônica. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

### **Resumo**

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e a Dislipidemia são doenças metabólicas que podem induzir a progressão de doenças coexistentes com patogênese inflamatória semelhante, como a doença periodontal (DP). Adipocinas são proteínas produzidas pelo tecido adiposo que possuem atividade metabólica, podendo influenciar o estado hiper-inflamatório do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi investigar a influência do DM2 (metabolicamente compensado ou descompensado), Dislipidemia e DP crônica, na expressão de genes relacionados à adipocinas em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e buscar correlacionar a expressão desses genes com o perfil clínico periodontal, glicêmico e lipídico. Investigaram-se cinco grupos de pacientes (30 indivíduos cada): G1 (diabetes descompensado, dislipidemia e doença periodontal), G2 (diabetes compensado, dislipidemia e doença periodontal), G3 (dislipidemia e doença periodontal), G4 (apenas doença periodontal) e G5 (sistemicamente e periodontalmente saudável). Os pacientes foram submetidos a exame periodontal completo e avaliação bioquímica dos perfis glicêmico e lipídico. Foi extraído RNA do sangue de cada paciente para investigação da expressão dos genes Adiponectina (*ADIPOQ*), Receptor 1 da Adiponectina (*ADIPOR1*), Leptina (*LEP*) e Resistina (*RETN*) por meio da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Para a expressão gênica realizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Nas correlações entre os parâmetros clínicos, bioquímicos e de expressão gênica utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (dados paramétricos) ou Spearman (dados não paramétricos). O estado de descompensação metabólica do DM2 pareceu estar associado à maior expressão do gene *LEP* no grupo G1 (DM2 descompensado) comparando-se com o grupo G2 (DM2 compensado), G4 e G5 (não dislipidêmicos). Expressão significativamente maior do gene *RETN* foi observada no grupo Controle comparando-se aos grupos com DM2, independentemente do nível de descompensação metabólica. A expressão dos genes investigados correlacionou-se significativamente com alguns parâmetros glicêmicos e lipídicos, mas não com os físicos. Os níveis de expressão dos genes *ADIPOR1*, *LEP* e *RETN* pareceram ser influenciados pela DP crônica, com correlação positiva com

parâmetros clínicos indicativos de saúde periodontal e negativa com parâmetros indicativos de doença ativa. Conclui-se que não houve diferença entre os grupos para a expressão do gene *ADIPOR1*, no entanto, a modulação de expressão dos genes *RETN* e *LEP* variou para os diferentes grupos, especialmente nos indivíduos com DM2. Houve correlação dos genes *ADIPOR1*, *LEP* e *RETN* com parâmetros glicêmicos, lipídicos e de saúde periodontal nos indivíduos estudados.

**Palavras-Chave:** Diabetes mellitus tipo 2; Doenças periodontais; dislipidemias; expressão gênica; adipocinas.

Silva RL. Adipokines genes expression investigation in poorly/well-controlled type 2 diabetes or normoglycemic patients affected by both dyslipidemia and chronic periodontitis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

### **Abstract**

Type 2 Diabetes Mellitus (T2D) and dyslipidemia are metabolic diseases that can induce the progression of coexisting inflammatory injury and they have similar pathogenesis to chronic periodontitis (CP). Adipokines are proteins produced by fat tissue that have metabolic activity and can influence the host hyper-inflammatory state. The aim of this study was to investigate in poorly or well-controlled T2D and normoglycemic individuals, both conditions associated with dyslipidemia and CP, the systemic expression of adipokines genes and its correlation with glycemic, lipid and periodontal profiles. One hundred fifty patients were separated into groups (G) of 30 subjects each: (G1) poorly controlled T2D with dyslipidemia and CP; (G2) well-controlled T2D with dyslipidemia and CP; (G3) normoglycemic individuals with dyslipidemia and CP; (G4) individuals with CP; (G5) systemic and periodontal healthy individuals (control). All patients underwent physical and periodontal examination and biochemical evaluation of glycemic and lipid profiles. Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients for gene expression investigation of: Adiponectin (*ADIPOQ*), Adiponectin Receptor 1 (*ADIPOR1*), Leptin (*LEP*) and Resistin (*RETN*) by Reverse Transcriptase followed by real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Gene expression was evaluated by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Correlations among clinical, biochemical and gene expressions were investigated by Pearson correlation coefficient (parametric data) or Spearman (nonparametric data). The poor control of T2D seems to be associated with increased expression of the *LEP* in G1 (G1) compared with G2 (well-controlled T2D), G4 and G5 (not dyslipidemics). Significant higher expression of the *RETN* gene was observed in the Control group in comparison to the groups of T2D patients, independently of the glycemic control. The expression levels of the investigated genes were significantly correlated with some glycemic and lipid parameters, but not with physical parameters. The expression of the *ADIPOR1*, *LEP* e *RETN* genes seemed to be influenced by CP with a positive correlation between clinical parameters that are indicative of periodontal health and negative correlation with active disease parameters.

In conclusion, there was no difference among groups for the expression of the *ADIPOR1* gene; however, the expression modulation of *RETN* and *LEP* genes varied among the different groups, especially in individuals with T2D. There were correlation of *ADIPOR1*, *LEP* and *RETN* genes with glycemic, lipid and periodontal health parameters in the studied subjects.

**Key Words:** Type 2 diabetes mellitus; Periodontal diseases; Dyslipidemias; Gene expression; Adipokines.

## SUMÁRIO

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b> | <b>14</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO .....</b> | <b>27</b> |
| <b>3 PUBLICAÇÃO .....</b> | <b>28</b> |
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>     | <b>56</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>       | <b>63</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo do relacionamento bidirecional entre doenças periodontais e saúde sistêmica do indivíduo é conhecido como “Medicina Periodontal”, proposta por Offenbacher et al.<sup>58</sup> (1996). Não restam dúvidas da interdependência entre saúde oral e sistêmica, mas ainda muitos estudos são necessários para melhor compreensão desta. O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e a Dislipidemia são doenças metabólicas que podem induzir ou favorecer a progressão de doenças coexistentes com patogênese inflamatória semelhante, como a doença periodontal (DP). É importante considerar que as três patologias em questão: o DM2, dislipidemia e a DP tem caráter inflamatório e são multifatoriais, de modo que sua ocorrência está relacionada com o biofilme dental, a carga genética do indivíduo, hábitos nutricionais e de atividade física (Nelson<sup>55</sup>, 2013). Dependendo da combinação desses fatores o paciente pode manifestar uma ou mais dessas patologias.

### 1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, de sua ação, ou ambos (Marchetti et al.<sup>49</sup>, 2012). De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA – *American Diabetes Association*), o teste indicado para o diagnóstico do controle do nível de hiperglicemia em pacientes diabéticos é o teste de hemoglobina glicada (HbA1c), considerando-se descompensados os indivíduos com níveis de HbA1c  $\geq 7\%$  (Association<sup>11</sup>, 2014).

Existem dois tipos principais de Diabetes: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). O DM alcançou proporções epidêmicas, afetando mais de 300 milhões de pessoas no mundo (American Diabetes Association<sup>12</sup>, 2013). Em 2012, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) estimou que a prevalência de DM no Brasil fosse de 10,3%, a maioria nas regiões Sudeste e Nordeste do país. Só em 2011 foram gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) 87,9 milhões em internações hospitalares devido a complicações do DM2 (Ahmed<sup>3</sup>, 2005; Ministério da saúde<sup>64</sup>, 2012).

O Diabetes mellitus tipo2, anteriormente chamado de diabetes não insulino-dependente, resulta da resistência à insulina, que altera o seu uso endogenamente por células alvo (Mealey et al.<sup>50</sup>, 2006). A destruição autoimune das células  $\beta$  não ocorre como na DM1, e os pacientes mantêm a capacidade para alguma produção de insulina.

No DM2 os pacientes ainda são capazes de produzir insulina e a incidência de cetoacidose é muito baixa em comparação com o tipo 1. No entanto a cetoacidose pode ocorrer em associação com estresse desencadeado por outra doença, como uma infecção. Pacientes afetados pela DM2 podem permanecer sem diagnóstico por muitos anos, já que a hiperglicemia ocorre gradualmente, e por vezes sem os sintomas clássicos. No entanto, tais pacientes estão em risco aumentado de desenvolver complicações macro e microvasculares. Apesar de pacientes com DM2 não precisarem de tratamento com insulina para sobreviver, ela é frequentemente usada como parte de seu tratamento médico (Mealey et al.<sup>50</sup>, 2006).

O DM2 resulta da interação entre o estilo de vida, fatores ambientais e genéticos (Tamayo et al.<sup>71</sup>, 2014). Exemplos de fatores que vem contribuindo para a epidemia do DM e que são modificáveis pelo indivíduo são: sedentarismo, consumo excessivo de álcool e o estresse psicossocial (Chen et al.<sup>17</sup>, 2012; Hu<sup>35</sup>, 2011). Sua percentagem varia em diferentes raças ou subgrupos étnicos e a genética desta forma de diabetes é complexa e não claramente definida (Association AD<sup>11</sup>, 2014). A prevalência global de diabetes aumenta assim como o número de pessoas que desenvolvem suas complicações. Em contraste com a prevalência relativamente bem documentada (global) de diabetes, muito pouco se sabe sobre a epidemiologia de suas complicações, sendo estas responsáveis pela maior parte da morbidade e mortalidade associada (Tamayo<sup>71</sup> et al., 2014).

A epidemia do DM se expandiu em conformidade com o aumento mundial do sobrepeso e obesidade, destacando-se o aumento percentual de gordura corporal, principalmente na região abdominal (Ahmed<sup>3</sup>, 2005; Chen et al.<sup>17</sup>, 2012). A maioria dos pacientes com DM2 após os 40 anos de idade são obesos (entre 60 a 70%), de modo que a obesidade tem sido considerada o principal fator de risco para o DM2 (Peer et al.<sup>60</sup>, 2013). A resistência à insulina pode melhorar com a redução de peso e / ou tratamento farmacológico, mas é raramente restaurado ao normal. O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física (Mealey et al.<sup>50</sup>, 2006).

O conceito de DM envolve a alteração metabólica não somente de carboidratos, mas também de proteínas e lipídios. Nos pacientes com DM2, o excesso de glicose no sangue interage de forma não enzimática com proteínas, lipídios e também ácidos nucleicos, ocorrendo a formação de produtos finais da glicação avançada (AGE – *advanced glycation end-products*) (Ahmed<sup>4</sup>, 1991). AGEs são produzidos de modo

excessivo pelo organismo sob condição de hiperglicemia ou de alto stress oxidativo (Pietropaoli et al.<sup>61</sup>, 2010). Macrófagos, monócitos e células endoteliais possuem receptores específicos para AGE, chamados RAGE, que geram aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Katz et al.<sup>40</sup>, 2005). Devido à ação de AGEs, aumento de mediadores pró-inflamatórios e inibição da liberação de citocinas anti-inflamatórias associadas ao reparo tecidual, os macrófagos, monócitos e neutrófilos podem expressar um fenótipo com caráter destrutivo (Ahmed<sup>4</sup>, 1991; Allen et al.<sup>5</sup>, 2011). Além disso, evidências mostram que no DM2 os neutrófilos apresentam-se com deficiência de aderência, quimiotaxia e fagocitose (Golub et al.<sup>30</sup>, 1982; Preshaw et al.<sup>62</sup>, 2012).

Também como consequência dos AGEs, ocorre a secreção hepática de proteínas de fase aguda como a Proteína C Reativa (PCR), correlacionada com DM2, aumento dos níveis de HbA1c em pacientes com DM2 (Cox et al.<sup>20</sup>, 2012; Kanai et al.<sup>38</sup>, 2008), com a DP e doenças cardiovasculares (Bohlender et al.<sup>16</sup>, 2005). Hipertensão e anormalidades do metabolismo de lipoproteínas são frequentemente encontradas em pessoas com DM2 (Adams<sup>2</sup>, 1996). Evidências sugerem que o DM2 pode iniciar ou acelerar o processo infeccioso da doença periodontal. Embora essa associação possa diferir entre grupos étnicos, dieta e cultura, a doença periodontal é considerada a sexta complicação mais frequente do DM2 (Furukawa, wakai<sup>26</sup>, 2007). A microbiota subgengival parece ser modulada pelo DM2, com influência na resposta imune celular e humoral, refletindo na expressão de genes associados com a destruição periodontal (Abdo et al.<sup>1</sup>, 2013).

## **1.2 Metabolismo de lipídios**

Colesterol e Triglicerídeos são essenciais para a integridade da membrana celular, como fonte de energia, além de atuarem como moléculas de sinalização celular. Por ser insolúvel em água, seu transporte é mediado por moléculas solúveis, chamadas Lipoproteínas. Lipoproteínas ricas em triglicerídeos são secretadas na circulação sanguínea, quer pelo intestino (como quilomícrons), como pelo fígado como lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (Franssen, Monajemi<sup>25</sup>, 2011). Estas partículas transportam os triglicerídeos para os tecidos alvos como o tecido adiposo e muscular, onde podem ser hidrolisados pela enzima Lipoproteína Lipase (LPL) localizada na superfície endotelial. Após essa hidrólise, ácidos graxos não esterificados

(NEFA) são formados, podendo ser agregados ao tecido adiposo para armazenamento ou usados pelo músculo esquelético como fonte de energia. A LPL envolvida neste processo é produzida principalmente pelo tecido adiposo e muscular, sendo que sua síntese e função estão sob rigoroso controle da insulina. Há um decréscimo concomitante na atividade da LPL no músculo durante o estado de absorção do alimento (Goldberg<sup>28</sup>, 1996).

O fígado também é capaz de produzir triglicerídeos sob a influência da insulina, secretados para o sangue como VLDL. Além de regular LPL e estimular a expressão de múltiplas enzimas intracelulares lipogênicas, a insulina controla a captação e processamento de NEFA no tecido adiposo e muscular durante e após a absorção do alimento. A insulina atua também no fígado modulando a Proteína 1, subunidade C, ligadora do elemento regulador de esterol, que se localiza na membrana de hepatócitos e que participa da transcrição da maioria dos genes envolvidos na lipogênese (Franssen, Monajemi<sup>25</sup>, 2011; Horton<sup>34</sup>, 2002).

### 1.3 Dislipidemia

A Dislipidemia é uma disfunção metabólica caracterizada por mudanças qualitativas e quantitativas das lipoproteínas no sangue, e alteração no metabolismo de lipídios (NCEP<sup>54</sup>, 2002). De acordo com National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III), são considerados afetados pela dislipidemia os indivíduos que apresentam níveis alterados de pelo menos um dos parâmetros: (i) Hipercolesterolemia: nível de colesterol total  $\geq 200\text{mg/dL}$ ; (ii) Hipertrigliceridemia: níveis de triglicérides  $\geq 150\text{ mg/dL}$ ; (iii) Baixos níveis de HDL: níveis de HDL  $\leq 40\text{ mg/dL}$  e (iv) Altos níveis de LDL: níveis de LDL  $\geq 130\text{ mg/dL}$  (NCEP<sup>54</sup>, 2002; Cleeman et al.<sup>19</sup>, 2001).

As causas da Dislipidemia podem ser genéticas, ambientais, ou ambas. Dentre as causas genéticas, incluem hipercolesterolemia familiar, apolipoproteína B100 defeituosa, hiperlipidemia combinada (familiar), entre outras. Entre as causas ambientais, incluem a dieta pouco saudável, falta de exercícios físicos, uso de algumas drogas e estresse. A compreensão dos mecanismos metabólicos subjacentes à dislipidemia tem progredido na última década. As alterações lipídicas associadas com a obesidade são semelhantes às que ocorrem em pacientes com DM2 ou insulino-resistentes. A resistência à insulina tem sido demonstrada como fator preditor ao surgimento de dislipidemia na maioria dos indivíduos (Franssen, Monajemi<sup>25</sup>, 2011).

Já a dislipidemia diabética é um conjunto complexo de anomalias. Além dos já citados níveis de LDL elevados e baixos níveis de HDL, os triglicerídeos séricos se mostram elevados em jejum e no pós-prandial há excessiva lipemia e preponderância da molécula de LDL em sua forma pequena. A Hipertrigliceridemia pode ser a principal causa das outras anormalidades lipídicas, uma vez que irá conduzir a depuração retardada das lipoproteínas ricas em triglicerídeos e formação de moléculas pequenas de LDL (Klop<sup>42</sup>, 2013). Segundo Taskinen<sup>72</sup> (2002), a dislipidemia diabética é um fenômeno muito comum na prática clínica diária afetando tanto homens quanto mulheres.

Segundo Gray<sup>70</sup> (1997), há uma gradual diminuição do tamanho do LDL conforme progride a perturbação do metabolismo glicêmico (do normal avançando para alteração no citado metabolismo, culminando em diabetes). Os níveis da molécula de LDL de tamanho pequeno se correlacionam com a medida de fluxo na dilatação arterial em indivíduos DM2, independente de outras variáveis como índice de massa corporal, HbA1c e pressão arterial. A molécula pequena de LDL, por conseguinte, parece estar associada com um dos primeiros sinais de disfunção endotelial (Taskinen<sup>72</sup>, 2002).

Na dislipidemia diabética não só a concentração de HDL é reduzida, mas também a sua composição e distribuição é alterada. Mudanças no HDL em DM2 são mediadas por duas vias: (1) elevação de triglicerídeos no plasma ou (2) proporção reduzida entre a lipoproteína lipase hepática e lipases. Ambas resultam em uma modulação na composição do HDL com uma taxa aumentada de seu catabolismo em circulação. Este processo resulta em menores níveis de HDL (Taskinen<sup>72</sup>, 2002). Essas vias metabólicas são bastante complexas, existindo a participação de diversas outras moléculas importantes, como as Apolipoproteínas M e AII (ApoA-I, ApoA-II), proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP), lipase hepática (HL), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e lecitina colesterol acil-transferase (LCAT). É válido destacar que vários desses fatores são modulados pela resistência à insulina (Taskinen<sup>72</sup>, 2002).

Dentre as desordens metabólicas relacionadas à dislipidemia destacam-se a obesidade associada ao DM2 (ECEP<sup>54</sup>, 2002). O termo “Diabesidade” (contração de “diabetes” e “obesidade”) tem sido bastante utilizado demonstrando a estreita relação e grande frequência entre obesidade e Diabetes (Kral<sup>44</sup>, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os critérios para classificar um indivíduo como obeso baseiam-se no índice de massa corpórea ( $IMC \geq 30,0 \text{ Kg/m}^2$ , proporção (relação)

cintura-quadril (RCQ)  $\geq 0.85$  (mulheres) e  $\geq 0.90$  (homens), medida de circunferência abdominal  $\geq 80$  cm (mulheres) e  $\geq 94$  cm (homens), sendo este também um ponto de corte para risco de desenvolver patologia cardiovascular (Amaral<sup>7</sup>, 2007). A obesidade está intimamente relacionada à etiologia da dislipidemia, pois compartilham a mesma fonte de fatores de risco. Ainda assim, todos os componentes dessa associação possuem ligação com o aumento do risco de problemas cardiovasculares (Franssen, Monajemi<sup>25</sup>, 2011). Assim, é notável a conformidade nas alterações lipídicas que ocorrem tanto na obesidade quanto no DM2, deixando clara a proximidade que a dislipidemia possui com essas doenças.

Ainda segundo a OMS, essa característica epidêmica da obesidade possui uma prevalência crescente em diversos países. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, cerca de metade da população com mais de 20 anos está acima do peso ideal. Em 2012, a federação internacional de diabetes (IDF) estimou a prevalência de diabetes no Brasil em 10,3% (Bertoldi<sup>15</sup>, 2013). A dieta, juntamente com o estilo de vida tem sido largamente influenciada pelas novas tendências de crescente mecanização e urbanização, forçando grande parte da população a mudarem seus hábitos. Uma dieta pobre em nutrientes, rica em gorduras e açúcares favorece o surgimento da obesidade, DM2 e da dislipidemia (Stadler<sup>69</sup>, 2011).

#### 1.4 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é uma desordem imuno-inflamatória em resposta a microrganismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannarella forsythia*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Andriankaja et al.<sup>9</sup>, 2010; Haffajee et al.<sup>32</sup>, 2008; Marchetti et al.<sup>49</sup>, 2012). Conforme a Academia Americana de Periodontia (1999) as doenças periodontais podem ser classificadas como Não-destrutivas ou Destrutivas, sendo as mais prevalentes a Gingivite e a Periodontite Crônica, respectivamente. Na ausência de tratamento, a gingivite pode progredir para periodontite (Ammons et al.<sup>8</sup>, 1972); embora a gingivite possa ser prevenida por meio de higiene oral regular. A periodontite crônica ocorre de forma progressiva e é diagnosticada quando há perda de inserção periodontal e reabsorção de osso alveolar evidenciada radiograficamente (Sima, Glogauer<sup>66</sup>, 2013). A periodontite crônica é caracterizada também por ciclos de progressão e estabilidade da doença (Nath, Raveendran<sup>53</sup>, 2011).

A taxa de progressão de várias formas de periodontite é difícil de estudar, pois há muitos fatores que influenciam a rapidez com que os tecidos periodontais são destruídos, caracterizando sua natureza multifatorial. Em casos de periodontite crônica, não há um padrão para o número ou tipos de dentes envolvidos. A doença pode ser localizada em poucos dentes ou afetar toda a dentição. O consenso de 1999 define que a extensão da doença pode ser considerada localizada se <30% dos sítios estão afetados, como é considerada generalizada se o envolvimento for >30% nos sítios (ou dentes). Isto serviu para facilitar a localização geral do problema. A prevalência e gravidade da periodontite crônica aumentam com a idade (Armitage<sup>10</sup>, 1999; Nath<sup>53</sup>, 2011), sendo responsável pela maior causa de perdas dentárias, e acomete aproximadamente 10-15% da população mundial (Baelum, Lopez<sup>13</sup>, 2004).

Devido a problemas como metodologia e falta de critérios claros para definição de saúde / doença, que por sua vez é devido à dificuldade no diagnóstico da Periodontite, os estudos sobre epidemiologia da doença periodontal na população brasileira ainda são poucos (Gjerme et al.<sup>27</sup>, 2002). A perda dentária pode ser o efeito final da doença periodontal. Assim, dentes perdidos devido às sequelas da doença não são, obviamente, passíveis de inscrição em levantamentos epidemiológicos sendo, portanto, uma das principais características que podem subestimar a prevalência e a gravidade da doença (Papapanou<sup>59</sup>, 1996).

Os métodos atuais trouxeram avanços frente às limitações no diagnóstico da doença, baseando-se na condição no presente momento e na história pregressa da doença (Gjerme et al.<sup>27</sup>, 2002). As diversas características do problema são usadas para avaliá-lo, onde tanto podem refletir o grau de inflamação (sangramento à sondagem) como a experiência acumulada durante a vida do indivíduo com a doença (perda clínica de inserção, perda óssea radiográfica) (Gjerme et al.<sup>27</sup>, 2002).

Embora a infecção por periodontopatógenos seja essencial para o início da DP, sua presença na cavidade oral não é suficiente para explicar a progressão e o nível de severidade da doença (Kornman et al.<sup>43</sup>, 1997). Como já mencionado, a DP tem sido caracterizada como uma doença complexa de etiologia multifatorial (Stabholz et al.<sup>68</sup>, 2010). As doenças complexas costumam acometer indivíduos na vida adulta, ser relativamente comuns (Loss et al.<sup>46</sup>, 2005), manifestarem um quadro clínico relativamente brando com progressão lenta e crônica. A DP, como patologia multifatorial, sofre influência da ação de vários genes (poligênica) em que cada gene tem uma contribuição relativamente pequena de risco à doença (Loss et al.<sup>46</sup>, 2005;

Shapira et al.<sup>65</sup>, 2005). Além disso, fatores ambientais desempenham um importante papel na expressão da doença, como a eficácia dos hábitos de higiene oral, o acesso a cuidados dentários, susceptibilidade a infecções periodontais e outros componentes comportamentais como fumo e stress psicossocial. A presença de doenças sistêmicas como o Diabetes mellitus também participam da etiologia multifatorial da DP (Stabholz et al.<sup>68</sup>, 2010).

### 1.5 Metabolismo do tecido adiposo e Adipocinas

O tecido adiposo não funciona apenas como um órgão armazenador de gordura envolvido na homeostase energética, mas também como órgão endócrino capaz de secretar múltiplas proteínas imunomoduladoras, conhecidas como adipocinas. O tecido adiposo secreta níveis balanceados de adipocinas, tanto com atividade anti-inflamatória (Adiponectina) como pro-inflamatória (Leptina, Resistina, Fator de Necrose Tumoral – [TNF- $\alpha$ ] e Interleucina 6 [IL-6]) (Goncalves et al.<sup>31</sup>, 2015).

A Leptina caracteriza-se como um importante hormônio regulador do metabolismo de lipídios (Maffei et al.<sup>48</sup>, 1995). É uma proteína de 16-kDa crítica para regulação do peso corpóreo atuando na inibição da ingestão de alimentos e estimulação do gasto calórico. O gene que codifica essa proteína denomina-se *LEP* podendo-se consultar a seu respeito no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) do [National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) (NCBI) o *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) que se caracteriza como um banco de informações sobre genes, proteínas e patologias humanas disponível gratuitamente e frequentemente atualizado. Detalhadas e amplas informações sobre o gene *LEP* podem ser obtidas no site OMIM sob número 164160.

Este gene codifica uma proteína que é secretada por adipócitos brancos, desempenhando um papel importante na regulação do peso corporal, além de estar vinculada ao desenvolvimento de DM2. Esta proteína, que atua através do receptor da leptina, funciona como parte de uma via de sinalização que pode inibir a ingestão de alimentos e/ou regular o gasto de energia para manter constante a massa adiposa corporal (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEP>). Essa proteína também tem uma variedade de funções incluindo a regulação hematopoiética, cicatrização de feridas e participação na resposta imune e inflamatória (Hernández<sup>33</sup>, 2012; Nokhbehsaim et al.<sup>57</sup>, 2014). Foi verificado que quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior a concentração de leptina produzida, uma vez que o percentual de

gordura influencia nessa liberação. Mutações no gene LEP e/ou em suas regiões regulatórias causam obesidade mórbida com hipogonadismo, além de mutações que prejudicam a produção de leptina causando obesidade severa e hereditária em humanos. Outra mutação recentemente identificada no gene LEP também leva à obesidade, mas não por afetar a produção da proteína, mas sim por prejudicar a ligação desta ao seu receptor (Wabitsch et al.<sup>73</sup>, 2015).

A conexão entre o excesso de tecido adiposo e o desenvolvimento de doenças incluindo DM2, dislipidemia, e aterosclerose é bem estabelecida. Como mencionado, até recentemente, o tecido adiposo era comumente visto como um exclusivo depósito de lipídios. Contudo, sabe-se agora que os adipócitos participam diretamente na homeostase corporal e no desenvolvimento de algumas doenças (Berg et al.<sup>14</sup>, 2002). Sugere-se que a leptina possua um papel modulador da resposta imune, atuando em processos inflamatórios e patologias imuno-mediadas. Em outros tecidos, a leptina possui funções metabólicas importantes como: secreção de insulina pelo pâncreas, produção de glicose hepática no fígado e captação de glicose pelo músculo (La Cava, Matarese<sup>45</sup>, 2004). A leptina possui efeitos pró-inflamatórios que previnem algumas doenças infecciosas. No sistema imune, a leptina aumenta a produção de citocinas, a adesão e a fagocitose em macrófagos, além de estimular a proliferação das células T, levando ao aumento da competência imunológica (Regini<sup>63</sup>, 2009).

Em monócitos e macrófagos, a leptina aumenta produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, e estimula a ativação de neutrófilos e a proliferação de monócitos in vitro circulantes. O óxido nítrico sintetase (NOS) e espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidos pela leptina, também induzem a ativação, proliferação e migração de monócitos circulantes (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). Com relação ao periodonto, Jhonson e Serio<sup>36</sup> (2001) observou uma diminuição da concentração de leptina em biópsias de tecido gengival à medida que aumentava a severidade da DP. Karthikeyan e Pradeep<sup>39</sup> (2007), detectou que a concentração de leptina no fluido crevicular gengival (FCG) era inversamente proporcional ao grau de severidade da DP. Frente a este resultado, os autores propuseram que a leptina provavelmente pode atuar como um agente protetor gengival e que por algum mecanismo poderia prevenir o estabelecimento da DP.

A Adiponectina (ADIPOQ, OMIM 605441) é a adipocina antidiabética expressa exclusivamente em adipócitos. Esta adipocina é mais conhecida por seu papel na

regulação da sensibilidade à insulina (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). A adiponectina aumenta a oxidação muscular dos ácidos graxos e reduz a concentração de glicose plasmática por meio do AMPK (adenina monofosfato quinase), apesar desse mecanismo ainda não estar bem esclarecido. A produção de adiponectina pode ser regulada negativamente por níveis aumentados de TNF- $\alpha$  que foram detectados no tecido adiposo de sujeitos obesos (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). Também tem sido sugerido que a adiponectina influencie na regeneração de vários tecidos como o ósseo e o muscular (Fiaschi<sup>24</sup>, 2013). A adiponectina também possui efeitos antiaterogênicos, ou seja, demonstra a capacidade de inibir a adesão de monócitos ao endotélio vascular, a expressão de moléculas de adesão e também a expressão de TNF- $\alpha$  (Goldstein, Scalia<sup>29</sup>, 2004). Assim, pode-se destacar que os níveis de adiponectina são inversamente correlacionados com os níveis de alguns mediadores inflamatórios, como IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR (Regini<sup>63</sup>, 2009). Interessantemente, a adiponectina como uma adipocina anti-inflamatória, anula os efeitos dos lipopolissacarídeos (LPS) de *P. gingivalis* em células epiteliais, sugerindo que a mesma tem efeito protetor no tecido periodontal. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre a ação da adiponectina na homeostase e regeneração periodontal (Nohkbehsaim et al.<sup>56</sup>, 2014).

Sugere-se que a adiponectina sirva de apoio à regeneração em vários tecidos, tais como o ósseo e muscular (Fiaschi<sup>24</sup>, 2013). Porém, a adiponectina pode apresentar níveis elevados e adotar comportamento pro-inflamatório sob certas condições e doenças como é o caso da artrite reumatoide (Nohkbehsaim et al.<sup>56</sup>, 2014). Os sinais pró-inflamatórios podem reduzir a capacidade de regeneração de células periodontais e inibir o processo regenerativo (Nohkbehsaim et al.<sup>57</sup>, 2014). Até o momento, pouco se sabe sobre as ações da adiponectina na homeostase e regeneração do periodonto.

Os efeitos biológicos da adiponectina dependem não somente dos seus níveis circulantes na corrente sanguínea, mas também da especificidade tecidual e disponibilidade de seus receptores: *ADIPOR1* e *ADIPOR2*, sendo o primeiro de expressão geral e o segundo de ação principalmente hepática (Julio, Sánchez<sup>37</sup>, 2010). Devido à importância da Adiponectina, neste estudo também enfocamos o seu Receptor 1 (*ADIPOR1*, OMIM 607945). A função encontrada para o gene *ADIPOR1* no conceituado site (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADIPOR1>) é que este codifica uma proteína que atua como um receptor para adiponectina, um hormônio secretado por adipócitos e que regula o catabolismo de ácidos graxos e os níveis de glicose. A ligação de adiponectina resulta na ativação de uma via de sinalização da

quinase ativada por AMP, que afeta os níveis de oxidação de ácidos graxos e a sensibilidade à insulina.

A Resistina (*RETN*, OMIM 605565) é uma adipocina fortemente relacionada à resistência à insulina. Segundo alguns estudos, a expressão de resistina nos adipócitos humanos é reduzida, mas nos macrófagos e monócitos é elevada, o que sugere um importante papel inflamatório (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). Os níveis de resistina estão aumentados em pacientes com obesidade genética ou induzida por dieta; portanto, especula-se estar ligada a resistência insulínica associada à obesidade (Regini<sup>63</sup>, 2009). Resultados sobre a resistina, mostram que seus níveis podem estar aumentados, inalterados ou que decresceram em indivíduos portadores de DM2 (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). Além disso, esse gene é expresso em adipócitos e pode ser o hormônio potencialmente ligado à obesidade em pacientes com DM2 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RETN>).

Seus efeitos no metabolismo da glicose são antagônicos aos da insulina, pois promovem resistência a esse hormônio por meio de aumento da glicogênese hepática, tendo rápido efeito sobre este tecido. Embora a resistina tenha sido primeiramente postulada como contribuinte para a resistência à insulina, cada vez mais evidências indicam que essa adipocina está envolvida no processo inflamatório (Regini<sup>63</sup>, 2009). Apenas alguns estudos têm investigado os efeitos da resistina na modulação de respostas inflamatórias, mostrando que a resistina regula a expressão da molécula 1 de adesão a células vasculares (MCP-1) e ICAM-1 em células endoteliais. Os efeitos de adesão dessas moléculas são antagonizados pela adiponectina (Fantuzzi<sup>23</sup>, 2005). Alguns agentes pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e lipopolissacarídeos podem regular a expressão do gene da resistina (Regini<sup>63</sup>, 2009).

### **1.6 Interações entre DM2, Obesidade, Dislipidemia e DP**

Lembrando que o DM2 tem assumido o status de epidemia global ocasionado como reflexo das condições da vida atual, destacando-se a alimentação rica em carboidratos e a falta de exercícios físicos regulares que estimulam a potencial carga genética para desenvolvimento dessa doença, é muito importante discorrer sobre as conhecidas interações entre DM2, Obesidade, Dislipidemia e DP. A principal relação entre essas patologias é que todas têm característica multifatorial.

Diabetes tipo 2 (DM2) é uma anomalia multifatorial envolvendo 57 genes localizados em 16 cromossomos diferentes e 136 polimorfismos de nucleotídeo único

(SNPs). Os fatores ambientais incluem alterações epigenéticas, nutrição, ambiente intrauterino e obesidade. Além disso, a etnia desempenha um papel em conferir susceptibilidade ao diabetes tipo 2 (Kaul, Ali<sup>41</sup>, 2015). A dislipidemia também é uma doença multifatorial estando fortemente ligado ao estilo de vida adotado, onde a obesidade possui íntima relação com a etiologia da doença (Klop<sup>42</sup>, 2013). A Doença Periodontal (DP) também tem caráter multifatorial, com influência de fatores como a presença de microrganismos periodontopatogênicos, suscetibilidade genética do hospedeiro, reação do sistema imune, hábito de fumar, stress e presença de doenças sistêmicas (Stabholz et al.<sup>68</sup>, 2010).

Fica assim evidente que além das três citadas patologias terem etiologia multifatorial, em cada uma delas ocorre um estado hiper-inflamatório sistêmico do paciente com a geração elevada de espécies reativas do oxigênio (ROS). Considerando que o tecido adiposo também é uma fonte endócrina de modulações que interfere na sensibilidade à insulina a partir da produção de leptina, adiponectina, resistina e outras citocinas, fica evidente a interação entre DM2, Obesidade e Dislipidemia. A desregulação metabólica dada pelo DM2 e dislipidemia compartilham mecanismos inflamatórios crônicos comuns observados na progressão da periodontite. Esse estado hiper-inflamatório pró-oxidante é fundamental para acentuar a destruição periodontal. Sabe-se que a extensão dos danos ao periodonto é determinada pela resposta inflamatória, já que a atividade de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) está aumentada e há níveis elevados de produção de citocinas e de superóxido durante a fagocitose de patógenos (Soory<sup>67</sup>, 2012). Citocinas pró-inflamatórias também secretadas pelo tecido adiposo podem atuar diretamente sobre o periodonto. Foi observado que indivíduos com DP têm níveis séricos elevados de colesterol total, LDL e de triglicérides, quando comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis (Losche et al.<sup>47</sup>, 2012).

É reconhecida a relação entre DM2 e dislipidemia, já que fazem parte da Síndrome Metabólica (SM), que é um conjunto complexo de sintomas aparentemente originados da obesidade visceral. Em pacientes com síndrome metabólica os níveis de adiponectina são inversamente proporcionais ao percentual de massa de tecido adiposo (Shearer et al.<sup>57</sup>, 2005; Offenbacher et al.<sup>58</sup>, 2010).

Mais de um milhão de pessoas são afetadas por dislipidemias; e em associação com o DM2, como já dito são as principais causas da morbidade e mortalidade devido

ao elevado índice de doenças cardiovasculares severas decorrentes (Association<sup>12, 51</sup>, 2007). Quando a DP está também associada a estas duas patologias, o quadro pode ser ainda mais grave, pois a DP parece ser também um fator de risco independente para doenças cardiovasculares (DeStefano et al.<sup>22</sup>, 1993; Morrison et al.<sup>52</sup>, 1999). Não está definido na literatura científica se é o DM2 (Abdo et al.<sup>1</sup>, 2013) ou a Dislipidemia (Chu et al.<sup>18</sup>, 1999; Cutler et al.<sup>21</sup>, 1999) o preditor mais forte para o desenvolvimento ou progressão da DP.

Apesar de DM2 e Dislipidemia geralmente ocorrerem como comorbidades sinérgicas expondo o indivíduo a um maior risco à DP, até o momento não foi encontrado na literatura nenhum estudo investigando em indivíduos que apresentassem concomitantemente DM2, Dislipidemia e DP, a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Portanto, nossa hipótese é que essas condições patológicas influenciem a expressão de adipocinas. Cabe ainda mencionar que o uso de sangue humano para análise de expressão gênica oferece vantagem porque é mais acessível que outros tecidos, sendo bastante interessante para estudos clínicos e pesquisa experimental em humanos. Além disso, em se tratando de doenças sistêmicas, conhecer o padrão de expressão dos genes de interesse contribui para compreender de modo mais direto sua participação no quadro patológico das citadas doenças. A participação de citocinas e do estresse oxidativo está documentada na etiologia e progressão da periodontite; no entanto, a participação de adipocinas nesse contexto, e em conjunto com as patologias sistêmicas DM2 e Dislipidemia ainda se mostra pouco explorada e compreendida (Alokail et al.<sup>6</sup>, 2014).

## 2 PROPOSIÇÃO

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram:

I- Avaliar a expressão dos genes Adiponectina (*ADIPOQ*), Receptor 1 de Adiponectina (*ADIPOR1*), Leptina (*LEP*) e Resistina (*RETN*) em indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (metabolicamente compensados ou descompensados), Dislipidemia e Doença Periodontal Crônica;

II- Avaliar a possível correlação da expressão dos genes mencionados com parâmetros periodontais e os perfis glicêmico e lipídico dos pacientes.

### 3 PUBLICAÇÃO

Nesta seção apresentamos o artigo científico em língua inglesa referente à pesquisa desenvolvida nesta dissertação e que será submetido à publicação.

#### 3.1 Publicação 1

Adipokines genes expression investigation in poorly/well-controlled type 2 diabetes or normoglycemic patients affected by both dyslipidemia and chronic periodontitis

Romerito L. da Silva<sup>1</sup>, Rafael Nepomuceno Oliveira<sup>1</sup>, Sâmia C. T. Corbi<sup>1</sup>, Alliny S. Bastos<sup>1</sup>, Raquel A. Dos Santos<sup>2</sup>, Catarina S. Takahashi<sup>3,4</sup>, Silvana R. P. Orrico<sup>1</sup>, Raquel M. Scarel-Caminaga<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Sciences of the University of Franca, Franca, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Philosophy Sciences and Letters of Ribeirão Preto, USP –University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil.

**Running title:** Lipid genes expression in diabetic patients with dyslipidemia and periodontitis

As normas para esta publicação seguem as que são adotadas para esta Universidade.

## Abstract

Type 2 Diabetes Mellitus (T2D) and dyslipidemia are metabolic diseases that can induce the progression of coexisting inflammatory injury which may have similar pathogenesis to chronic periodontitis (CP). Adipokines are proteins produced by fat tissue that have metabolic activity and can influence the host hyper-inflammatory state. The aim of this study was to investigate the gene expression of adipokines in the PBMC of individuals with T2D, dyslipidemia and CP, and correlate their adipokine gene expression with their glycemic, lipid and periodontal profiles. One hundred fifty patients were separated into groups (G) of 30 subjects each: (G1) poorly controlled T2D with dyslipidemia and CP; (G2) well-controlled T2D with dyslipidemia and CP; (G3) normoglycemic individuals with dyslipidemia and CP; (G4) individuals with CP; (G5) systemic and periodontal healthy individuals (control). All patients underwent physical and periodontal examination and biochemical evaluation of glycemic and lipid profiles. Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients for gene expression investigation of: Adiponectin (*ADIPOQ*), Adiponectin Receptor 1 (*ADIPOR1*), Leptin (*LEP*) and Resistin (*RETN*) by Reverse Transcriptase followed by real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Expression of *ADIPOQ* was not detected, while *ADIPOR1* was similar among the groups. The poor glycemic control of T2D patients (G1) seemed to influence the higher levels of *LEP*, but not the lower levels of *RETN* which was found in both T2D groups compared to the controls. Strong positive correlation was demonstrated between *RETN* levels and both total and LDL cholesterol, as well as for visible dental plaque. There was strong positive correlation between *ADIPOR1* expression and both probing depth  $\leq 3$ mm and clinical attachment loss  $\leq 2$ mm, and negative correlation with the bleeding on probing and clinical attachment loss  $\geq 5$ mm. In conclusion, the systemic expression of the adipokines *LEP* and *RETN* were related with the concomitant presence of T2D, dyslipidemia and CP, also demonstrated by their significant correlations with biochemical and periodontal parameters.

**Key Words:** Type 2 diabetes mellitus; periodontal diseases; dyslipidemias; inflammation; gene expression; adipokines, leptin, adiponectin, resistin.

## INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) comprises a group of genetically and clinically heterogeneous metabolic disorders characterized by hyperglycemia that results from a defective insulin secretion and/or activity<sup>34</sup>. DM is classified according to its etiology as type 1 (T1D) and type 2 (T2D). T2D encompasses individuals who have insulin resistance, usually have relative (rather than absolute) insulin deficiency and decreased  $\beta$ -cell function<sup>2, 3</sup>. Dyslipidemia is a metabolic disorder characterized by qualitative and quantitative changes of lipoproteins in the blood, and alterations in lipid metabolism<sup>33</sup>. This disorder results in high LDL-cholesterol and serum triglycerides, an excessive postprandial lipemia, preponderance of small, dense LDL (LDL-phenotype pattern B), together with a lowering of HDL-cholesterol. The cause may be genetic, environmental, or both<sup>46</sup>.

T2D is characterized not only by changes in carbohydrate metabolism, but also by changes in metabolism of lipids, defined in the literature as diabetic dyslipidemia<sup>14, 31</sup>. Dyslipidemia in association with diabetes mellitus are among the major causes of morbidity and mortality due to high rate of severe cardiovascular diseases arising<sup>31</sup>.

Chronic Periodontitis (CP) is a chronic bacterial infection that affects both the gingiva and the bone that supports the teeth and is caused by anaerobic Gram-negative microorganisms that are present in the bacterial plaque that adheres to the teeth, but the immune system of the host also plays essential role in its pathogenesis. Thus, systemic conditions that could alter host immune response are considered risk factors for CP<sup>1, 34</sup>. This is the case of T2D, which is the sixth main complication of diabetes<sup>1</sup>. T2D patients present more prevalent and severe periodontitis than healthy patients, independently of confounding factors<sup>45</sup>. In addition to the relationship between T2D and dyslipidemia, recent studies indicate an association between elevation in blood lipoproteins and alterations in periodontal conditions<sup>1, 12, 15</sup>. However, more studies are necessary to achieve definitive conclusions.

Over the last two decades, adipose tissue has been established as highly active endocrine and metabolically important organs that modulate energy expenditure and glucose homeostasis<sup>27</sup>. White adipose tissue is responsible for the secretion of a variety of bioactive signaling molecules, termed adipokines<sup>27, 36</sup>. These adipokines function as classic circulating hormones with autocrine, paracrine, and endocrine actions. The dysregulation of adipokines has been implicated in obesity, T2D and cardiovascular

disease<sup>6, 27</sup>. Adipose tissue secretes various adipokines with anti-inflammatory (Adiponectin) and pro-inflammatory (Leptin, Resistin, Tumor Necrosis Factor [TNF- $\alpha$ ], and interleukin-6 [IL-6]) activity to modulate inflammation and insulin resistance<sup>18, 27</sup>. Leptin gene (*LEP*) is an adipose-derived hormone and although is mainly synthesized by adipose tissue, is also produced at low levels in other tissues. Leptin can modulate lipid, bone metabolism, insulin sensitivity and regulates the immune system and mainly pro-inflammatory actions<sup>36</sup>. Adiponectin gene (*ADIPOQ*) has been noted as an important anti-atherogenic and anti-inflammatory protein; on the contrary, the Resistin gene (*RETN*), also produced by the adipose tissue, has been identified in several others tissues<sup>6</sup>. More recently, it has been found in monocytes and is suggested to be intrinsically related to the inflammatory process<sup>51</sup>.

Because it has been increasingly common to find T2D patients also affected by a combination of dyslipidemia and chronic periodontitis, we hypothesize that these conditions could imbalance the expression of pro- and anti-inflammatory adipokines. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the expression of the *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, *LEP* and *RETN* genes in poorly or well-controlled T2D and normoglycemic individuals, both conditions associated with dyslipidemia and CP; and investigate correlations with clinical (physical and periodontal) and biochemical (glucose and lipid profiles) data of patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Selection criteria**

The study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Araraquara School of Dentistry (UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06) and was carried out between May 2009 and November 2010. All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and they provided their written consent to participate.

Patients were initially screened by a questionnaire of general health history. Initial inclusion criteria were age from 35–60 years and presence of at least 15 natural teeth. Patients were excluded based on the following criteria: history of antibiotic therapy in the previous 3 months and/or nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in the previous 6 months, pregnancy or use of contraceptives or any other hormone, current smokers or former smokers, history of anemia, periodontal treatment or surgery

in the preceding 6 months, use of hypolipemic drugs such as statins or fibrates, and history of diseases that interfere with lipid metabolism, such as hypothyroidism and hypopituitarism.

### **Clinical record and physical evaluation**

The individuals answered a structured questionnaire about demographic characteristics, personal and family medical history, and use of medications. A trained examiner collected information regarding diabetes, including patient history about use of hypoglycemic medication, and presence of diabetes-associated complications. Subjects completed a physical examination including measurement of waist and hip circumference (centimeters), height (meters), weight (kilograms), and body mass index (BMI).

### **Laboratory measurements: metabolic control and lipoprotein profile**

All analyses were performed by the same laboratory, and blood samples were collected after a 12-h overnight fast for the evaluation of fasting plasma glucose (mg/dL) by modified Bondar and Mead method, glycated hemoglobin (HbA1c) by enzymatic immunoturbidimetry, insulin levels by the chemiluminescence method (U/L), and lipid profile [total cholesterol (TC), triglycerides, and high-density lipoprotein (HDL)] by enzymatic methods. Low-density lipoprotein (LDL) was determined by the Friedewald formula.

Patients were considered as non-diabetics (normoglycemic individuals) those who presented fasting glucose levels  $<100$  mg/dl and HbA1c  $<6.5\%$ . T2D patients diagnosed by an endocrinologist, who monitored their glycemic control by evaluation of glycated hemoglobin (HbA1c), were divided into poorly glycemic controlled patients (HbA1c  $\geq 8\%$ , 64mmol/mol) or well glycemic controlled patients (HbA1c  $\leq 7.5\%$ ). The HbA1c  $\geq 8\%$  for poorly glycemic controlled patients was based on previous studies and avoided including patients<sup>26, 30, 40, 49</sup>. Insulin resistance was also evaluated for insulin levels by the chemiluminescence method (micro-international units per milliliter).

To avoid the inclusion of individuals with transitory dyslipidemia, the cutoff points used were the highest values according to the National Cholesterol Educational Program Adult Treatment III (total cholesterol  $\geq 240$  mg/dl, LDL  $\geq 160$  mg/dl, HDL  $\leq 40$  mg/dl, and triglycerides  $\geq 200$  mg/dl). Patients were considered affected by dyslipidemia who presented abnormal levels of at least one of the above-mentioned parameters<sup>10</sup>.

### **Periodontal clinical examination**

All patients were subjected to a periodontal clinical examination performed in six sites per tooth by a single trained calibrated examiner (A.B.S, Kappa = 0.89). Periodontal pocket depth (PPD), clinical attachment loss (CAL), and bleeding on probing (BOP) were evaluated with a periodontal probe PCPUNC15-6 (Hu-Friedy®). Also was evaluated the visible plaque and marginal bleeding index. Severe periodontal disease was defined as the presence of deep periodontal pockets  $\geq 6$ mm with clinical attachment loss  $\geq 4$ mm and bleeding on probing in at least 8 sites distributed in different quadrants of the dentition (supplemental table 1)<sup>25</sup>.

### **Study population**

After all examinations described in the topics above, one hundred fifty patients were selected and divided into five groups (G) containing 30 individuals each, based upon diabetic and dyslipidemic status: (G1) poorly controlled diabetics with dyslipidemia and periodontal disease; (G2) well controlled diabetics with dyslipidemia and periodontal disease; (G3) normoglycemic individuals with dyslipidemia and periodontal disease; (G4) systemically healthy individuals with periodontal disease and (G5) systemically healthy individuals without periodontal disease.

Because the patients enrolled here were the same investigated in previous studies of our research group with different focuses, detailed information regarding recruiting, clinical criteria for include patients and power analysis could be viewed in<sup>7</sup> and Corbi<sup>11</sup> et al., (2014).

### **Reverse Transcriptase - real-time quantitative PCR (RT-qPCR)**

Peripheral venous blood collected from each subject was immediately submitted to centrifugation on a Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Oslo, Noruega) density gradient and consecutive washings with saline (NaCl 0.9%) to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Total RNA samples were extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Rockville, MD, USA) according to manufacturer's instructions. Samples containing total RNA were purified by RNeasy Protection Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was quantified by NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Oslo, Noruega) and its integrity was assessed by agarose gel electrophoresis (1%). Absorbances ( $\lambda=260/280$  and  $260/230$ ) were measured, and samples with ratios lower than 1.8 and higher than 2.2 were discarded. cDNA was

synthesized using the oligo dT with the SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time quantification of target mRNA was performed using a *TaqMan*<sup>TM</sup> systems (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Briefly, each amplification was performed in a total volume of 25 $\mu$ l containing 12,5 $\mu$ l *TaqMan*<sup>TM</sup> PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 500nM each forward and reverse PCR primers, and 3ng of cDNA. The investigated target genes were: *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, *LEP* and *RETN1*. The specificity of the amplified PCR products was confirmed by dissociation curve analysis, all reactions were performed in duplicate and the examiner was blinded regarding what group each sample belonged. Relative quantitation of mRNA was carried out after normalization of the gene expression to the *GAPDH* endogenous control gene. The Expression Suite Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), was used to calculate gene expression, using the comparative C $\tau$  ( $\Delta$ C $\tau$ ) method for multiple data analysis.

### Statistical analysis

The distribution and normality of the variables were evaluated by the D'Agostino-Pearson test and parametric tests were applied (multiple comparison with the One-way ANOVA followed by Tukey test) or nonparametric (multiple comparison by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). The general characteristics of each group were described with mean and standard deviation (SD). GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Inc., USA) was used to perform these statistical analyses. The significance level ( $\alpha=0.05$ ) was corrected for multiple comparisons by Bonferroni's correction accordingly; therefore, corrected  $\alpha$  was presented in the legend of Table 1. To investigate correlations (adjusted for age and sex) among various studied parameters, Spearman's rank correlation test was performed using SPSS® IBM software version 19. The significance level was set at  $\alpha=0.05$ .

## RESULTS

From a total of 1788 patients screened, 150 of them (30 patients per group) obeyed the research inclusion criteria. Our previous study<sup>7</sup> showed no significant differences between groups regarding gender. On Table 1, Fasting glucose and HbA1c, as expected, were significantly higher in G1, confirming the poor glycemic control; also these parameters were higher in G2 group than in nondiabetics (G3, G4 and G5). Insulin levels showed no significant differences between G1 and G2 groups. BMI, Waist-to-hip

ratio and abdominal circumference in diabetics groups (G1 and G2) were higher than in G5 group. As expected, the total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides levels were higher in G1, G2 and G3 groups than G4 and G5, confirming the clinical dyslipidemia (Table 1). Supplementary table 1 showed that periodontal tissue destruction (including bone loss) and local inflammation were significantly more severe in diabetics, particularly in G1 group, which presented high percentage of periodontal sites with bleeding on probing, probing depth  $\geq 6$ mm, clinical attachment loss  $\geq 5$ mm and suppuration. The G2 group showed significant difference in relation to the presence of deeper periodontal sites when compared to groups without T2D (G3, G4 and G5).

Regarding gene expression analysis, *ADIPOQ* gene was not expressed on circulating PBMC, but its receptor, the *ADIPOR1* was found in similar levels among groups (Figure 1A). We observed statistically significant higher mRNA levels of *LEP* in the G1 group in comparison with G2, G4 and G5 (Figure 1B). The *RETN* gene was significantly lower expressed in both T2D groups (G1 and G2), independently of their glycemic control status (Figure 1C).

We developed correlation analysis of adipokines genes expression with all biochemical and periodontal patients' data. Only significant findings of those correlation analyses were presented in Table 2. Positive correlation was observed between *ADIPOR1* gene expression with insulin levels ( $r=0,563$ .  $p < 0.05$ ), while for HDL-cholesterol there was a weak negative correlation ( $r = -0.218$ .  $p < 0.05$ ). Regular positive correlation was found between fasting plasma glucose levels and the *LEP* expression ( $r = 0.475$ .  $p < 0.05$ ). The highest positive correlation findings were obtained for *RETN* gene expression with both total cholesterol ( $r = 0.729$ .  $p < 0.05$ ) and LDL cholesterol ( $r = 0.783$ .  $p < 0.05$ ) (Figure 2). Significant correlation were also observed between adipokines genes expression and periodontal parameters. Their main findings were the negative correlation between *ADIPOR1* with the periodontal clinical parameters, such as visible plaque and  $CAL \geq 5$  mm; besides positive correlation with  $PPD \leq 3$  mm and strong correlation with  $CAL \leq 2$  mm. The *RETN* was negatively correlated with visible plaque (Table 2).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study which investigated the *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, *LEP* and *RETN* adipokines gene expression in individuals concomitantly affected by T2D, dyslipidemia and CP. Periodontitis is more prevalent and severe

among patients with DM2 than among healthy controls<sup>8, 45, 47</sup>. Thus, DM2 may initiate or deteriorate periodontitis. This is in agreement with our results, since the G1 group demonstrated higher MB, BOP, PD and advanced CAL ( $\geq 6\text{mm}$ ), as well as more sites with suppuration, compared to all other groups. These findings are supported by other studies that show a correlation between the decompensation and levels of HbA1c and fasting glucose with the prevalence and severity of the <sup>DP16, 20, 37</sup>. Thus, there is an association between DM2 and periodontitis that seems to be bilaterally causal in nature.

Contradicting our initial hypothesis, the expression of adipokines was not influenced by the concomitant occurrence of the three inflammatory diseases (T2D, dyslipidemia and CP), but we found significant different mRNA levels of the *ADIPOR1*, *LEP* and *RETN* related with a specific metabolic condition. In spite of mRNA levels of *ADIPOQ* were not detected in PBMC (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADIPOQ>), its receptor, the *ADIPOR1* was found in similar levels among groups. This indicates that the *ADIPOQ* protein, produced by adipocytes, is secreted to the blood and acts as a hormone, playing influence in circulating leukocytes, since the receptor *ADIPOR1* is present on them. Positive correlation was observed between *ADIPOR1* gene expression with insulin levels ( $r=0,563$ ,  $p < 0.05$ ). The same can also be observed in a study by Civitarese et al., 2004 held in different tissues, where there was a strong positive correlation between *ADIPOR1* expression and insulin. This finding suggests a close relationship, which emphasizes the participation of *ADIPOR1* in insulin sensitivity potential<sup>9</sup>.

Another important adipokine, leptin has been associated with increasing of fat mass, greater is the concentration of leptin produced by adipocytes and increased is their release into circulation<sup>43</sup>. We noted that patients belonging to the G1 and G2 groups, according to the OMS parameters, are obese individuals, since they present body mass index (BMI)  $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ , waist-hip ratio (WHR)  $\geq 0.85$  (women) and  $\geq 0.90$  (men), measured waist circumference  $\geq 80 \text{ cm}$  (women) and  $\geq 94 \text{ cm}$  (men), which is also a cutoff point for risk of developing cardiovascular pathology<sup>36</sup>. The mass of adipose tissue in these patients is higher when compared to the other groups. Insulin has direct relationship with leptin levels<sup>17</sup>, and in the present study we found positive correlation between *LEP* expression and fasting plasma glucose levels ( $r = 0.475$ ,  $p < 0.05$ ), which was highest in the G1 group. Also, we observed significantly higher levels of *LEP* in the G1 group in comparison to the other groups. Thus, the glycemic control might be the

factor that is triggering the difference in the *LEP* expression between the T2D groups, since in the G1 group fasting glucose levels and HbA1c were significantly higher in comparison to the well-controlled individuals (G2). In animal models, leptin infusion or overexpression leading to hyperleptinemia, initially result in the expected decrease of food intake and body weight, but over time animals become resistant to leptin. Leptin overexpression animals gained more weight than non-leptin resistant animals, illustrating that the hyperleptinemia is not sufficient, but also necessary to induce leptin resistance, which in turns enhances weight gain<sup>42</sup>. Overexpression of leptin induces the production of pro-inflammatory Th1 cytokines (such as IL-2 and IFNG, whereas suppresses the production of anti-inflammatory Th2 cytokines (such as IL-4 and IL-10)<sup>27</sup>. We observed here the overexpression of the *LEP* gene in the G1 patients together with higher expression of both *IFNG* and *IL10* genes (data not shown). This contributes to a hyperinflammatory state, which in turns, contribute to the insulin resistance condition. It is known that leptin resistance may induce insulin resistance, T2D, chronic inflammation, hypertension, atherothrombosis, and myocardial injury<sup>29</sup>.

Regarding resistin, it is known that in mice this hormone affects glucose metabolism and insulin sensitivity, and in humans resistin is an inflammatory molecule produced predominantly by macrophages and leukocytes<sup>4 41</sup>. Resistin circulates in mouse serum, and its level is increased markedly in both genetic and diet-induced obesity. In the present study we observed for our patients the highest positive correlation findings between *RETN* gene expression with both total cholesterol ( $r = 0.729$ ,  $p < 0.05$ ) and LDL cholesterol ( $r = 0.783$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

Administration of resistin impairs glucose tolerance and insulin action in normal mice. This is reversed by immunoneutralization of resistin, improving blood glucose and insulin action in T2D mouse model<sup>44</sup>. In this context, it is thought that resistin acts as an insulin antagonist affecting glucose metabolism. Moreover, serum resistin levels are directly proportional to body fat mass, since in human studies, serum resistin protein levels were found to be high in obesity or other diseases associated with insulin resistance<sup>13</sup>. While the majority of papers have reported that resistin levels (i.e. protein levels) in serum increases according to the metabolic glycemic and lipid alteration and chronic inflammatory status, here we measured the *RETN* mRNA levels in PBMC. We observed significant lower *RETN* gene expression in both T2D groups independently of the glycemic control (G1 and G2) in

comparison to the control (G5). In spite of we did not measure serum levels of resistin, it is probably that its levels were high in T2D patients, but we assessed the *RETN* mRNA levels, which were lower in T2D than in controls.

Interestingly, Le Lay et al.<sup>28</sup> (2001) and Way et al.<sup>50</sup> (2001) found low *RETN* mRNA levels in genetic and dietary rodent obesity models, which opposes with increased resistin serum concentrations in the same animal models<sup>44</sup>. Rajala et al.<sup>38</sup> (2004) confirmed that divergence in *RETN* mRNA versus protein levels in mice, and then they suggested that is possible that the high circulating resistin level could suppress resistin gene expression via a negative feedback mechanism. Moreover, it is important taking into mind that the PBMC from patients was obtained at morning after 12 hours fasting. Rajala et al.<sup>38</sup> (2004) and Kim et al.<sup>24</sup> (2001) found in mice that the diurnal resistin level was lower than the nocturnal levels, and resistin mRNA and protein levels were both suppressed after food deprivation and increased by refeeding. The resistin gene expression and protein concentration in fasted mice were both increased by insulin and potentiated by glucose.

In regard to correlation analysis between adipokines expression and periodontal clinical parameters, followed we discuss the main findings. There were negative correlation between *ADIPOR1* with visible plaque and  $CAL \geq 5$  mm; besides positive correlation with  $PPD \leq 3$  mm and strong correlation with  $CAL \leq 2$  mm. We believe that the anti-inflammatory effects of adiponectin are contributing to the establishment of these correlations, in agreement to other studies<sup>32, 35</sup>. Surprisingly, in spite of the pro-inflammatory properties of the *LEP* and *RETN* adipokines, in our correlation analysis they were associated with periodontal health status, mainly by the positive correlations of the *LEP* expression with both  $PPD \leq 3$  mm and  $CAL \leq 2$  mm, and also the negative correlation of *LEP* with percentage of sites with PPD of 4-5mm, in addition to the negative correlation of *RETN* with visible plaque. Johnson et al.<sup>21</sup> (2001) also found inverse linear correlation between the concentration of leptin and PPD. They found that leptin concentrations were highest in healthy gingiva and progressively declined with increased sulcular depth.

Leptin has a direct effect on the proliferation and differentiation of osteoblasts, and prolong the life of primary osteoblasts by inhibition of apoptosis<sup>48</sup>. Thus, a high concentration of leptin protects the host of infections and inflammatory processes,

thereby maintaining the bone level<sup>19</sup>. Karthikeyan et al.<sup>23</sup> (2006) found high leptin concentrations in crevicular fluid, having a strong negative correlation between the concentration of leptin and the progression of periodontal disease. Their hypothesis is that leptin was trapped in the gingival microcirculation, since the gingival fluid is considered to be a serum exudate. Then they suggested that clinically healthy tissue is "armed" with pro-inflammatory components of the host that help maintain the free periodontal infections<sup>22, 23</sup>, and again leptin levels are elevated in the blood during infectious processes as a result of the stimulating action of lipopolysaccharide and cytokines<sup>5, 22</sup>. Johnson et al.<sup>21</sup> (2001) suggests that high gingival leptin concentrations can act as a possible protective factor for periodontal disease, through mechanisms still unclear

The present study has some limitations, including the lack of longitudinal data-tracking of diseases, and no quantification of protein levels of adipokines. In addition, we investigated the systemic expression of genes in patients, since the literature showed a hyperinflammatory state in patients with T2D and dyslipidemia. Therefore, we did not separate cells of the PBMCs, but we think that the gene expression findings were not influenced by a specific cell type because we assessed the counts of lymphocytes, neutrophils, eosinophils and monocytes in each patient, and they were statistically similar between groups. Moreover, the expression pattern in blood cells may reflect the gene expression profile in key tissues involved in energy metabolism such as the liver or adipose tissue<sup>39</sup>. Despite the mentioned limitations, they did not affect the confidence of the found results. Finally, the present findings might be investigated in larger and ethnically different populations, as well as further in vitro and animal models studies should investigate whether there negative feedback of *RETN* gene expression in the presence of T2D, dyslipidemia and CP.

In conclusion, although the *ADIPOR1* gene was similarly expressed among the investigated groups, in general, the systemic expression of the pro-inflammatory adipokines *LEP* and *RETN* were related with the concomitant presence of T2D, dyslipidemia and CP in comparison with controls. In addition, there were significant correlations of adipokines mRNA levels with glycemic, lipid and periodontal parameters.

## DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

## FUNDING

This study was supported by the Foundation for Research Support of State of São Paulo – FAPESP, Grants 2007/08362-8, 2009/16233-9 and 2010/10882-2, and the Coordination of Improvement of Higher Education Students of the Brazilian Ministry of Education (CAPES).

## REFERENCES

1. Abdo J, Cirano F, Casati M, Ribeiro F. Influence of Dyslipidemia and Diabetes Mellitus on Chronic Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2013; 84(10): 1401-8.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37(1): 81-90.
3. Andriankaja OM, Galicia J, Dong G, Xiao W, Alawi F, Graves DT. Gene expression dynamics during diabetic periodontitis. *J Dent Res*. 2012; 91(12): 1160-5.
4. Apostolopoulos V, de Courten MP, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(1): 43-57.
5. Arnalich F, Lopez J, Codoceo R, Jimenez M, Madero R, Montiel C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survival in sepsis and septic shock. *J Infect Dis*. 1999; 180(3): 908-11.
6. Bahia L, Aguiar L, Villela N. Relationship between adipokines, inflammation and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *CLINICS*. 2006; 61(5): 433-40.
7. Bastos AS, Graves DT, Loureiro AP, Rossa Junior C, Abdalla DS, Faulin Tdo E, et al. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(8): E1353-62.

8. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005; 76(3): 418-25.
9. Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, et al. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004; 47(5): 816-20.
10. Cleeman JI, Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, et al. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2001; 285(19): 2486-97.
11. Corbi SC, Anovazzi G, Finoti LS, Kim YJ, Capela MV, Secolin R, et al. Haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis in the Interleukin 8 gene do not influence protein level in the gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(10): 1355-61.
12. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res*. 2004; 83(2): 156-60.
13. Eminler AT, Aygun C, Konduk T, Kocaman O, Senturk O, Celebi A, et al. The relationship between resistin and ghrelin levels with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Res Med Sci*. 2014; 19(11): 1058-61.
14. Feingold KR, Siperstein MD. Diabetic vascular disease. *Adv Intern Med*. 1986; 31: 309-40.
15. Fentoglu O, Oz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykac Y, Bozkurt FY. Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol*. 2009; 80(2): 267-73.
16. Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol*. 1997; 68(2): 136-40.
17. Fonseca-Alaniz MH. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab Clin North*. 2006; 50(2): 216-29.
18. Goncalves TE, Zimmermann GS, Figueiredo LC, Souza Mde C, da Cruz DF, Bastos MF, et al. Local and serum levels of adipokines in patients with obesity

- after periodontal therapy: one-year follow-up. *J Clin Periodontol.* 2015; 42(5): 431-9.
19. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem.* 2002; 85(4): 825-36.
  20. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol.* 2001; 6(1): 138-45.
  21. Johnson RB, FG S. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2001; 72(9): 1254-57.
  22. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(6): 467-72.
  23. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Leptin levels in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodontal Res.* 2007; 42(4): 300-4.
  24. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2001; 276(14): 11252-6.
  25. Koromantzos PA, Makrilakis K, Dereka X, Katsilambros N, Vrotsos IA, Madianos PN. A randomized, controlled trial on the effect of non-surgical periodontal therapy in patients with type 2 diabetes. Part I: effect on periodontal status and glycaemic control. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(2): 142-7.
  26. Kristensen JK, Stoevring H. A follow-up study of the occurrence and consequences of HbA1c measurements in an unselected cohort of non-pharmacologically treated patients with Type 2 diabetes. *Scand J Prim Health Care.* 2008; 26(1): 57-62.
  27. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 71.
  28. Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, et al. Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(2): 564-7.

29. Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(15): 1201-10.
30. Mohamed HG, Idris SB, Ahmed MF, Boe OE, Mustafa K, Ibrahim SO, et al. Association between oral health status and type 2 diabetes mellitus among Sudanese adults: a matched case-control study. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82158.
31. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009; 5(3): 150-9.
32. N. Y. Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2010; 45: 296–300.
33. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, A. ToHBCi. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25): 3143-421.
34. Negrato CA, Tarzia O, Jovanovic L, Chinellato LE. Periodontal disease and diabetes mellitus. *J Appl Oral Sci*. 2013; 21(1): 1-12.
35. Nokhbehsaim M, Keser S, Nogueira AV, Cirelli JA, Jepsen S, Jager A, et al. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 1-11.
36. Nokhbehsaim M, Keser S, Nogueira AV, Jager A, Jepsen S, Cirelli JA, et al. Leptin effects on the regenerative capacity of human periodontal cells. *Int J Endocrinol*. 2014; 2014: 1-13.
37. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA, et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol*. 2008; 79(5): 774-83.
38. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*. 2004; 53(7): 1671-9.
39. Sanchez J, Priego T, Pico C, Ahrens W, De Henauw S, Fraterman A, et al. Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(4): E648-52.

40. 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.
41. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin / Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Action in Humans. *DIABETES Care*. 2001; 50(10): 2199-202.
42. Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296(3): R493-500.
43. Silveira MR. Correlation between obesity, adipokines and the immune system. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2009; 11(4): 466-72.
44. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409(6818): 307-12.
45. Susanto H, Nesse W, Dijkstra PU, Agustina D, Vissink A, Abbas F. Periodontitis prevalence and severity in Indonesians with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2011; 82(4): 550-7.
46. Taskinen M-R. Diabetic dyslipidemia. *Atherosclerosis Supplements*. 2002; 3: 47-51.
47. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 2008; 14(3): 191-203.
48. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999; 140(4): 1630-8.
49. Vinagre I, Sanchez-Quesada JL, Sanchez-Hernandez J, Santos D, Ordonez-Llanos J, De Leiva A, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2014; 13: 34.
50. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*. 2001; 276(28): 25651-3.
51. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310(3): 927-35.

## TABLES

**Table.1** Laboratory Evaluation. Mean ( $\pm$  Standard-deviation)

|                                  | <b>G1</b><br><b>n=30</b>       | <b>G2</b><br><b>n=30</b>     | <b>G3</b><br><b>n=30</b>   | <b>G4</b><br><b>n=30</b> | <b>G5</b><br><b>n=30</b> |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Fasting Glucose (mg/dL)</b>   | 226.6 ( $\pm$ 74.2)<br>a,b,c,d | 137.5 ( $\pm$ 41.4)<br>b,c,d | 90.0 ( $\pm$ 6.4)          | 90.8 ( $\pm$ 7.3)        | 85.9 ( $\pm$ 6.5)        |
| <b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>      | 10.4 ( $\pm$ 1.9)<br>a,b,c,d   | 6.6 ( $\pm$ 0.9)<br>b,c,d    | 5.4 ( $\pm$ 0.6)           | 5.1 ( $\pm$ 0.6)         | 5.4 ( $\pm$ 0.21)        |
| <b>Total Cholesterol (mg/dL)</b> | 242.7 ( $\pm$ 37.8)<br>c,d     | 243.4 ( $\pm$ 42.9)<br>c,d   | 246.1 ( $\pm$ 42.3)<br>c,d | 171.6 ( $\pm$ 18.5)      | 180.3 ( $\pm$ 21.5)      |
| <b>HDL-Cholesterol (mg/dL)</b>   | 44.8 ( $\pm$ 9.5)              | 46.1 ( $\pm$ 10.5)           | 50.7 ( $\pm$ 11.1)         | 48.4 ( $\pm$ 12.6)       | 49.3 ( $\pm$ 10.1)       |
| <b>LDL-Cholesterol (mg/dL)</b>   | 153.4 ( $\pm$ 37.0)<br>c,d     | 147.3 ( $\pm$ 44.3)<br>c,d   | 156.4 ( $\pm$ 44.1)<br>c,d | 103.8 ( $\pm$ 17.4)      | 113.5 ( $\pm$ 18.1)      |
| <b>Triglycerides (mg/dL)</b>     | 216.9 ( $\pm$ 94.6)<br>c,d     | 249.8( $\pm$ 104.1)<br>c,d   | 194.1 ( $\pm$ 80.6)<br>c,d | 93.9 ( $\pm$ 35.9)       | 87.4 ( $\pm$ 27.6)       |
| <b>Insulin (U/L)</b>             | 19.7 ( $\pm$ 20.9)<br>c,d      | 21.1 ( $\pm$ 21.5)<br>c,d    | 12.6 ( $\pm$ 8.5)          | 11.1 ( $\pm$ 12.7)       | 7.1 ( $\pm$ 4.3)         |
| <b>C-Reactive protein</b>        | 0.5 ( $\pm$ 0.5)               | 0.7 ( $\pm$ 0.6)<br>b,c,d    | 0.4 ( $\pm$ 0.4)           | 0.4 ( $\pm$ 0.6)         | 0.3 ( $\pm$ 0.5)         |

a  $p < 0.05$  in relation to the group G2; b  $p < 0.05$  in relation to the group G3; c  $p < 0.05$  in relation to the group G4; d  $p < 0.05$  in relation to the group G5 (Kruskal-Wallis test,  $\alpha = 5\%$ ).

Source: Self elaboration.

**Table 2** - Correlation adjusted (age and sex) between gene expression and clinical periodontal parameters.

| Laboratory Parameters |                  |                   |                  |                  |         |  |
|-----------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|---------|--|
| GENES                 | Fasting glycemia | Total Cholesterol | LDL- Cholesterol | HDL- Cholesterol | Insulin |  |
| ADIPOR1               | ---              | ---               | ---              | -0,218           | 0,563   |  |
| LEP                   | 0,475            | ---               | ---              | ---              | ---     |  |
| RETN                  | ---              | 0,729             | 0,783            | ---              | ---     |  |

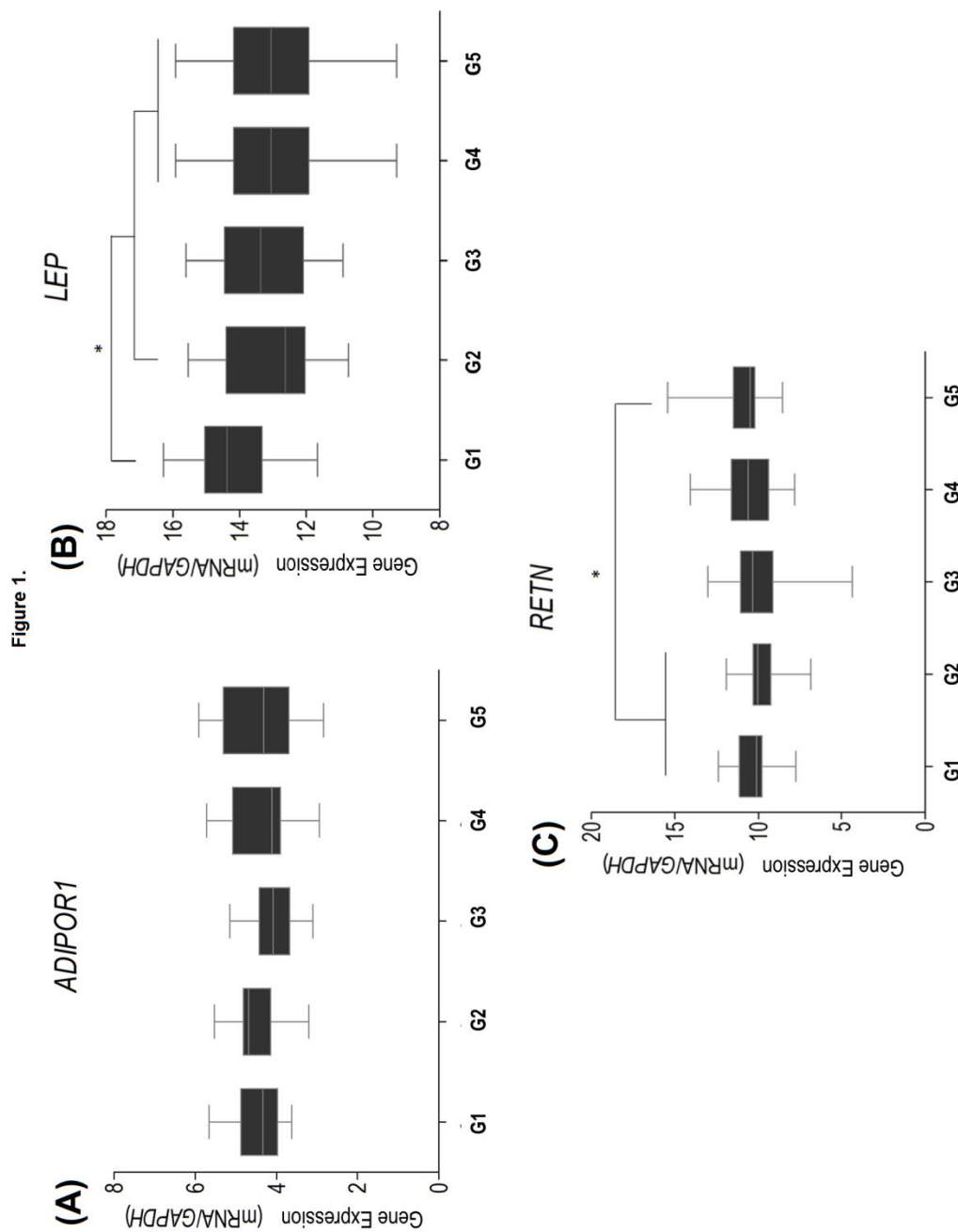
| Periodontal Parameters |             |             |          |           |              |                     |                     |                     |                     |                     |
|------------------------|-------------|-------------|----------|-----------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| GENES                  | VP (%sites) | MB (%sites) | PB Media | CAL Media | BOP (%sites) | PB ≤ 3 mm (% sites) | PB 4-5 mm (% sites) | CAL≤ 2 mm (% sites) | CAL3-4 mm (% sites) | CAL≥ 5 mm (% sites) |
| ADIPOR1                | -0,520      | -0,473      | -0,628   | -0,552    | -0,577       | 0,563               | -0,469              | 0,705               | -0,211              | -0,501              |
| LEP                    | ---         | ---         | -0,256   | -0,228    | ---          | 0,274               | -0,218              | 0,219               | ---                 | ---                 |
| RETN                   | -0,508      | -0,204      | ---      | ---       | ---          | ---                 | ---                 | ---                 | ---                 | ---                 |

VP: Visible Plaque; MB: Marginal bleeding; BOP: Bleeding on probing; PD: Probing depth; CAL: Clinical attachment lost.

■ Positive correlation p<0,05; ■ Negative correlation p<0,05; (r: coefficient of Pearson or Spearman; q=5%).

Source: Self elaboration.

## FIGURES



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary table.1** Periodontal Evaluation. Mean ( $\pm$  Standard-Deviation)

|                                           | <b>G1</b><br><b>n=30</b>                 | <b>G2</b><br><b>n=30</b>               | <b>G3</b><br><b>n=30</b>             | <b>G4</b><br><b>n=30</b>             | <b>G5</b><br><b>n=30</b> |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| <b>Number of teeth *</b>                  | 22.3 ( $\pm$ 4.2) <sup>d</sup>           | 21.6 ( $\pm$ 4.5) <sup>d</sup>         | 23.2 ( $\pm$ 3.8) <sup>d</sup>       | 24.3 ( $\pm$ 3.1) <sup>d</sup>       | 27.1 ( $\pm$ 1.8)        |
| <b>VP (% sites)</b>                       | 76.5 ( $\pm$ 17.4)<br><sub>c,d</sub>     | 69.8 ( $\pm$ 13.0) <sup>d</sup>        | 70.1 ( $\pm$ 15.7) <sup>d</sup>      | 60.8 ( $\pm$ 17.4) <sup>d</sup>      | 14.8 ( $\pm$ 6.2)        |
| <b>MB (% sites)</b>                       | 60.9 ( $\pm$ 15.2)<br><sub>a,b,c,d</sub> | 46.9 ( $\pm$ 15.9) <sup>d</sup>        | 40.4 ( $\pm$ 14.8) <sup>d</sup>      | 41.3 ( $\pm$ 12.9) <sup>d</sup>      | 8.7 ( $\pm$ 4.8)         |
| <b>BOP (% sites)</b>                      | 69.3 ( $\pm$ 12.8)<br><sub>a,b,c,d</sub> | 53.9 ( $\pm$ 13.8) <sup>d</sup>        | 53.0 ( $\pm$ 13.7) <sup>d</sup>      | 51.4 ( $\pm$ 13.2) <sup>d</sup>      | 12.7 ( $\pm$ 5.6)        |
| <b>PB (mm)</b>                            | 4.1 ( $\pm$ 0.5)<br><sub>a,b,c,d</sub>   | 3.7 ( $\pm$ 0.6) <sup>d</sup>          | 3.4 ( $\pm$ 0.5) <sup>d</sup>        | 3.7 ( $\pm$ 0.4) <sup>d</sup>        | 2.1 ( $\pm$ 0.2)         |
| <b>PB <math>\leq</math> 3mm (% sites)</b> | 43.3 ( $\pm$ 14.8)<br><sub>a,b,c,d</sub> | 57.0 ( $\pm$ 15.0) <sup>d</sup>        | 61.9 ( $\pm$ 14.0) <sup>d</sup>      | 53.3 ( $\pm$ 12.5) <sup>d</sup>      | 98.8 ( $\pm$ 1.5)        |
| <b>PB 4-5mm (%sites)</b>                  | 31.9 ( $\pm$ 11.6)<br><sub>c,d</sub>     | 31.0 ( $\pm$ 11.0)<br><sub>c,d</sub>   | 31.0 ( $\pm$ 10.6)<br><sub>c,d</sub> | 41.0 ( $\pm$ 10.0) <sup>d</sup>      | 1.2 ( $\pm$ 1.5)         |
| <b>PB <math>\geq</math> 6mm (%sites)</b>  | 24.8 ( $\pm$ 15.9)<br><sub>a,b,c,d</sub> | 12.0 ( $\pm$ 10.8)<br><sub>b,c,d</sub> | 7.0 ( $\pm$ 10.6) <sup>d</sup>       | 5.7 ( $\pm$ 5.9) <sup>d</sup>        | 0.0 ( $\pm$ 0.0)         |
| <b>CAL (mm)</b>                           | 4.4 ( $\pm$ 0.7)<br><sub>a,b,c,d</sub>   | 3.9 ( $\pm$ 0.7) <sup>d</sup>          | 3.6 ( $\pm$ 0.5) <sup>d</sup>        | 3.8 ( $\pm$ 0.4) <sup>d</sup>        | 2.2 ( $\pm$ 0.2)         |
| <b>CAL <math>\leq</math> 2mm (%sites)</b> | 13.1 ( $\pm$ 8.8) <sup>b,d</sup>         | 16.5 ( $\pm$ 15.1) <sup>d</sup>        | 24.8 ( $\pm$ 16.2)<br><sub>c,d</sub> | 10.3 ( $\pm$ 10.0) <sup>d</sup>      | 64.5 ( $\pm$ 13.9)       |
| <b>CAL 3-4mm (%sites)</b>                 | 39.8 ( $\pm$ 15.3)<br><sub>b,c</sub>     | 48.8 ( $\pm$ 14.2)<br><sub>c,d</sub>   | 51.6 ( $\pm$ 10.7) <sup>d</sup>      | 61.3 ( $\pm$ 10.0)<br><sub>b,d</sub> | 35.5 ( $\pm$ 13.9)       |
| <b>CAL <math>\geq</math> 5mm (%sites)</b> | 47.1 ( $\pm$ 16.2)<br><sub>a,b,c,d</sub> | 34.7 ( $\pm$ 17.6)<br><sub>b,d</sub>   | 23.8 ( $\pm$ 14.0) <sup>d</sup>      | 28.4 ( $\pm$ 10.5) <sup>d</sup>      | 0.0 ( $\pm$ 0.0)         |
| <b>Suppuration<br/>(n° sites)</b>         | 6.8 ( $\pm$ 7.0)<br><sub>a,b,c,d</sub>   | 4.0 ( $\pm$ 3.3) <sup>d</sup>          | 2.0 ( $\pm$ 3.0)                     | 2.0 ( $\pm$ 3.7)                     | 0.0 ( $\pm$ 0.0)         |

VP: Visible plaque; MB: Marginal bleeding; BOP: Bleeding on probing; PB: probing depth; CAL: Clinical attachment lost. \*ns - no significative (Kruskal Wallis test;  $\alpha = 5\%$ ); SD = Standard-Deviation; <sup>a</sup>  $p < 0.05$  in relation to the group G2; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  in relation to the group G3; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  in relation to the group G4; <sup>d</sup>  $p < 0.01$  in relation to the group G5. Source: Self elaboration.

#### 4 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e dentro das limitações deste trabalho, foram obtidas as seguintes conclusões:

- Não houve expressão do *ADIPOQ* nos leucócitos circulantes do pacientes, enquanto que a expressão do gene *ADIPOR1* foi semelhante entre os diferentes grupos investigados.
- Houve maior expressão do gene *LEP* nos pacientes com DM2(descompensado), Dislipidemia e DP em comparação aos pacientes com apenas DP e pacientes sem nenhuma das patologias.
- O nível de descompensação metabólica não influenciou o gene *RETN*, pois os pacientes com DM2 apresentaram menor expressão para este.
- Houve correlação entre a expressão dos genes *ADIPOR1*, *LEP* e *RETN* com parâmetros clínicos periodontais, indicando o envolvimento desses genes no processo inflamatório da DP.

## REFERÊNCIAS\*

1. Abdo J, Cirano FR, Casati MZ, Ribeiro FV, Giampaoli V. Influence of dyslipidemia and diabetes mellitus on chronic periodontal disease. *J Periodontol*. 2013; 84(10): 1401-8.
2. Adams D. The American Academy of Periodontology. *J Periodontol*. 1996; 67(2): 177-9.
3. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67(1): 3-21.
4. Ahmed N. Glycation and diabetic complications. *J Pak Med Assoc*. 1991; 41(7): 171-4.
5. Allen EM, Matthews JB, O'Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000. 2011; 38(10): 894-901.
6. Alokail MS, Al-Daghri NM, Mohammed AK, Vanhoutte P, Alenad A. Increased TNF alpha, IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from breast cancer patients. *Med Oncol*. 2014; 31(8): 38.
7. Amaral D, Oliveira L, Dantas P. Parâmetros antropométricos e síndrome metabólica. *Fitness Performance*. 2007; 6(5): 302-8.
8. Ammons W, Schectman L, Page R. Host tissue response in chronic periodontal disease. 1. The normal periodontium and clinical manifestations of dental and periodontal disease in the marmoset. . *J Periodontol* 1972; 7(2): 131-43.
9. Andriankaja OM, Sreenivasa S, Dunford R, DeNardin E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Aust Dent J*. 2010; 55(3): 252-9.
10. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-6.
11. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37(Suppl 1): S81-90.

---

\* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/manualfoar.pdf>

12. American Diabetes Association. Standards of medical cares in diabetes - 2013. *Diabetes Care*. 2013; 36 Suppl 1: S11-66.
13. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004; 32(4): 239-49.
14. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13(2): 84-9.
15. Bertoldi A. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. *Global Health*. 2013; 9: 62.
16. Bohlender J, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(4): F645-59.
17. Chen L, Magliano D, Zimmet P. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8(4): 228-36.
18. Chu X, Newman J, Park B, Nares S, Ordonez G, Iacopino A. In vitro alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids. *ell Tissue Res*. 1999; 296(2): 331-7.
19. Cleeman JI, Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, et al. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285(19): 2486-97.
20. Cox A, Agarwal S, M Herrington D, Carr J, Freedman B, Bowden D. C-reactive protein concentration predicts mortality in type 2 diabetes: the Diabetes Heart study. *Diabet Med*. 2012; 29(6): 767-70.
21. Cutler C, Machen R, Jotwani R, Iacopino A, Russell C. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol* 2000. 1999; 70(11): 1313-21.
22. DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ*. 1993; 306(6879): 688-91.
23. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(5): 911-9.
24. Fiaschi T. Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 71(10): 1917-25.

25. Franssen R, Monajemi H. Obesity and dyslipidemia. *Med Clin North Am.* 2011; 95(5): 893-902.
26. Furukawa T, Wakai K. Associations of periodontal damage and tooth loss with atherogenic factors among patients with type 2 diabetes mellitus. *Intern Med.* 2007; 46(17): 1359-64.
27. Gjermo P, Rosing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000.* 2002; 29: 70-8.
28. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996; 37(4): 693-707.
29. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2563-8.
30. Golub LM, Nicoll GA, Iacono VJ, Ramamurthy NS. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun.* 1982; 37(3): 1013-20.
31. Goncalves TE, Zimmermann GS, Figueiredo LC, Souza Mde C, da Cruz DF, Bastos MF, et al. Local and serum levels of adipokines in patients with obesity after periodontal therapy: one-year follow-up. *J Clin Periodontol.* 2015; 42(5): 431-9.
32. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(3): 196-205.
33. Hernández J. Leptina, péptido pleiotrópico. Características generales y su relación con la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. *Acta Odontol Venez.* 2012; 51(2).
34. Horton JD. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002; 109(9): 1125–31.
35. Hu F. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care.* 2011; 43(6): 1249-57.
36. Johnson R, Serio F. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2001; 72(9): 1254-57.
37. Julio C, Sánchez N. Adipokines and metabolic syndrome: multiple aspects of a complex pathophysiological process. *Rev Colom Cardiol.* 2010; 17(4): 167-76.
38. Kanai A, Kawamura T, Umemura T, Nagashima M, Nakamura N, Nakayama M. Association between future events of brain infarction and soluble levels of

- intercellular adhesion molecule-1 and C-reactive protein in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 82(2): 157-64.
39. Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(6): 467-72.
  40. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez F, Caudle R, Heft M. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(1): 40-4.
  41. Kaul N, Ali S. Genes, genetics, and environment in type 2 diabetes: Implication in personalized medicine. *DNA Cell Biol.* 2015; 35(1): 1-12.
  42. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients.* 2013; 5(4): 1218-40.
  43. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53.
  44. Kral JG. Diabetes: palliating, curing or preventing the dysmetabolic diathesis. *Maturitas.* 2014; 77(3): 243-8.
  45. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(5): 371-9.
  46. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 159-79.
  47. Losche W, Karapetow F, Pohl A, Pohl C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2000. 2000; 27(8): 537-41.
  48. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995; 1(11): 1155-61.
  49. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond).* 2012; 9(1): 88.

50. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
51. Mehra R. Global public health problem of sudden cardiac death. *J Electrocardiol.* 2007; 40(6 Suppl): S118-22.
52. Morrison H, Ellison L, Taylor G. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. *J Cardiovasc Risk.* 1999; 6(1): 7-11.
53. Nath SG, Raveendran R. "What is there in a name?": A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15(4): 318-22.
54. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, A. ToHBCi. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106(25): 3143-421.
55. Nelson R. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care.* 2013; 40(1): 195-211.
56. Nokhbehsaim M, Keser S, Nogueira AV, Cirelli JA, Jepsen S, Jager A, et al. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 1-11.
57. Nokhbehsaim M, Keser S, Nogueira AV, Jager A, Jepsen S, Cirelli JA, et al. Leptin effects on the regenerative capacity of human periodontal cells. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014: 1-12.
58. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 1996; 67(10 Suppl): 1103-13.
59. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 1-36.
60. Peer N, Kengne A-P, Motala AA, Mbanya JC. Diabetes in the Africa region: an update for the IDF diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 103(2): 197-205.
61. Pietropaoli D, Tatone C, D'Alessandro A, Monaco A. Possible involvement of advanced glycation end products in periodontal diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(3): 683-91.

62. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012; 55(1): 21-31.
63. Regini M. Correlation between obesity, adipokines and the immune system. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2009; 11(4): 466-72.
64. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. VIGITEL Brasil 2011: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. (Série G. Estatística e informação em saúde). [Acesso em 2015 01 15]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2011\\_fatores\\_risco\\_doencas\\_cronicas.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011_fatores_risco_doencas_cronicas.pdf).
65. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 72-86.
66. Sima C, Glogauer M. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Curr Diab*. 2013; 13(3): 445-52.
67. Soory M. Inflammatory mechanisms and redox status in periodontal and cardiometabolic diseases: effects of adjunctive nutritional antioxidants and statins. *Infect Disord Drug Targets*. 2012; 12(4): 301-15.
68. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 138-53.
69. Stadler TAC. Association of dyslipidemia levels among classes of obesity I, II and III . *Arq Catarinense Med*. 2011; 40(3): 21-4.
70. Stuart Gray R. Relation of LDL size to the insulin resistance syndrome and coronary heart disease in american indians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(11): 2713-20.
71. Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman AM, Baan C, Forouhi NG, et al. Diabetes in Europe: an update. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103(2): 206-17.
72. Taskinen M-R. Diabetic dyslipidemia. *Atherosclerosis Suppl*. 2002; 3: 47-51.
73. Wabitsch M, Funcke JB, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin KM, et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med*. 2015; 372(1): 48-54.

## **APÊNDICE A**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Seleção dos Pacientes**

Cada paciente incluído neste estudo foi envolvido em outros previamente realizados pelo presente grupo de pesquisa (Processos FAPESP 2007/08362-8 e 2010/10882-2). Após esclarecimento da natureza e objetivos da pesquisa, os pacientes confirmaram sua aceitação para participar do estudo mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (Protocolo nº 50/06)

Os pacientes foram selecionados dentre os que buscaram atendimento na Faculdade de Odontologia de Araraquara e os que foram encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde do município e região. Os participantes desta pesquisa receberam orientação sobre a doença periodontal e, após as coletas de material, foram submetidos a tratamento periodontal. Os pacientes portadores de diabetes e dislipidemia, quando necessário, foram encaminhados ao endocrinologista responsável para acompanhamento e eventual tratamento da condição metabólica. Após as coletas, os participantes foram encaminhados para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes ou para Clínica de Periodontia desta Faculdade para tratamento periodontal.

#### **Anamnese**

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese completa e os grupos de pacientes portadores de diabetes foram avaliados quanto à história pregressa da doença por meio de ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes da FOAr, sob coordenação da Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico. O grupo de pacientes apenas com dislipidemia (DisDP) e os grupos de pacientes sistemicamente saudáveis (cDP e Controle) foram avaliados quanto ao histórico de saúde geral e bucal.

#### **Exame Físico**

Os pacientes foram submetidos a um exame físico no qual foram avaliados: circunferência abdominal (cm), proporção cintura/quadril e peso (kg) e altura (m) para obtenção do índice de massa corporal (IMC), em  $\text{m/kg}^2$  de cada indivíduo.

### **Análise bioquímica do controle metabólico e perfil lipídico.**

Os pacientes foram encaminhados a um Laboratório de Análises Clínicas para coleta do sangue por punção venosa. Foi utilizado o equipamento COBAS MIRA plus para realização dos exames: Hemograma (ABX Micros 60), Insulina (método quimioluminescência), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), HbA<sub>1c</sub> (método de imunoensaio de inibição turbidimétrica) (Kit Roche), Proteína C-reativa ultrasensível (método nefelometria), Triglicérides (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest), Colesterol Total (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest) e HDL-colesterol (método enzimático) (Kit Labtest).

Foram incluídos pacientes com DM2 diagnosticados por um médico endocrinologista em acompanhamento do controle glicêmico, os quais a partir da avaliação laboratorial da HbA<sub>1c</sub>, foram divididos em metabolicamente descompensados (Grupo 1, com HbA<sub>1c</sub>  $\geq 8\%$ ) ou metabolicamente compensados (Grupo 2, HbA<sub>1c</sub>  $\leq 7,5\%$ ). O ponto de corte  $\geq 8\%$  para definição de pacientes descompensados foi selecionado para evitar a inclusão de pacientes com descompensação metabólica transitória e foi baseado em estudos prospectivos e randomizados<sup>57</sup> que definem o limite de 7% da HbA<sub>1c</sub> como controle metabólico aceitável. Assim, a inclusão de pacientes com 1% acima do limite superior busca eliminar a interferência de possíveis alterações metabólicas transitórias. Foram considerados como não diabéticos (normoglicêmicos) pacientes que apresentaram glicemia de jejum  $< 100$  mg/dl e HbA<sub>1c</sub>  $< 6,5\%$ .

Para os resultados do perfil lipídico, foram considerados como dislipidêmicos os pacientes que apresentassem alterados em pelo menos um dos seguintes parâmetros clínicos, de acordo com o National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III)<sup>54</sup>:

- Colesterol Total (CT): Considerado alto para valores  $\geq 240$  mg/dl.
- LDL (Low density lipoprotein): Considerado alto para valores  $\geq 160$  mg/dl.
- HDL (High density lipoprotein): Considerado baixo para valores  $\leq 40$  mg/dl.
- Triglicérides (TG): Considerado alto para valores  $\geq 200$  mg/dl.

As frações do VLDL e LDL-colesterol foram calculadas segundo a equação de Friedewald (válida se Triglicérides  $< 400$  mg/dl)<sup>52</sup>:

- *Colesterol VLDL = triglicérides / 5*

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

### **Exame Clínico Intrabucal e Radiográfico**

Todos os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado ( $\kappa=0,89$ ), utilizando sonda periodontal milimetrada tipo Williams, sonda exploradora nº 5, espelho plano e pinça clínica, após secagem com jato de ar.

A avaliação periodontal foi composta de índice de placa visível (IPV), índice de sangramento marginal (ISM), sangramento à sondagem (SS), mensuração da profundidade de sondagem, posição da margem gengival e nível clínico de inserção (NI).

Foi considerado nesse estudo:

- Índice de placa visível: presença ou não de placa bacteriana visível a olho nu, após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes;
- Índice de sangramento marginal: presença ou ausência de sangramento marginal após percorrer o espaço do sulco de uma proximal a outra, com a sonda periodontal milimetrada inclinada em 60 graus em relação ao dente;
- Posição da margem gengival: distância da margem gengival à junção cimento-esmalte;
- Mensuração da profundidade de sondagem: distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, medida com sonda periodontal milimetrada em seis sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e disto-lingual;
- Sangramento à sondagem: presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem;
- Avaliação do nível clínico de inserção: corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio de cada elemento dentário;

### **Grupos**

A amostra investigada neste estudo foi composta por 150 indivíduos, divididos em cinco grupos:

- GRUPO 1 – G1 (n=30) - Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 descompensado, com dislipidemia e com periodontite crônica (AAP, 1999).
- GRUPO 2 – G2 (n=30) - Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 compensado, com dislipidemia e com periodontite crônica (AAP, 1999).
- GRUPO 3 – G3 (n=30) - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2, com dislipidemia e com periodontite crônica (AAP, 1999).
- GRUPO 4 – G4 (n=30) - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2, sem dislipidemia e com periodontite crônica (AAP, 1999).
- GRUPO 5 – G5 (n=30) - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2, sem dislipidemia e sem periodontite crônica (AAP, 1999).

### **Critérios de Inclusão**

- Ambos os sexos.
- Idade de 35 a 60 anos.
- Presença de, no mínimo, 15 dentes.
- Pacientes para serem considerados com DP, apresentar pelo menos quatro sítios com PS  $\geq$  5mm, NI  $\geq$  4mm e sangramento à sondagem, em dentes não-adjacentes.

### **Critérios de Exclusão**

- Antibioticoterapia nos seis meses e de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos três meses antecessores ao estudo.
- Gestação e lactação.
- Uso de anticoncepcional ou qualquer outra forma de hormônio.
- Tabagismo.
- Presença de anemia.
- Tratamento periodontal nos últimos seis meses.
- Uso de drogas hipolipemiantes: vastatinas, estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, resinas de troca, fibratos, ácido nicotínico, ômega-3, ácido acetilsalicílico (AAS), inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e betabloqueadores (BB).
- Uso de drogas que interferem no metabolismo lipídico: anti-hipertensivos, imunossupressores, esteróides, anticonvulsivantes, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, amiodarona, alopurinol, glitazonas.

- História de doenças que interferem no metabolismo lipídico: hipotireoidismo, hipopituitarismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, atresia biliar congênita, doenças de armazenamento, lúpus eritematoso sistêmico.

### **Separação de leucócitos e extração de RNA para análise da expressão gênica**

Em um primeiro momento foi coletado 20 ml de sangue para as análises de expressão gênica, realizada em tubos que foram mantidos em gelo. Os leucócitos do sangue foram separados imediatamente por meio de centrifugações com *Ficoll Paque Plus* (Fabricante) e consecutivas lavagens com Salina (NaCl 0,9%). Uma vez obtido o *pellet* de leucócitos, fez-se a ressuspensão dos mesmos em *TRIZol®* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e armazenagem a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do RNA.

Posteriormente, a extração do RNA total de todas as amostras foi realizada pelo método *TRIZol®* (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A purificação das amostras foi feita pelo kit *RNeasy Protection Mini Kit* (Qiagen). A concentração do RNA extraído de cada amostra, bem como sua pureza, foi estimada por densidade óptica por espectroscopia (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences, Oslo, Noruega). As amostras de RNA somente foram utilizadas quando as razões  $\lambda(260/280)$  e  $\lambda(260/230)$  foram entre 1,8 a 2,2. Estas etapas foram realizadas por um único pesquisador calibrado e todas as amostras processadas no mesmo laboratório.

## **ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA**

### **Confecção do cDNA**

Foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) de todas as sequências gênicas expressas por meio do RT-PCR utilizando o Oligo dT com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em um microtubo de 0,2mL o volume de RNA correspondente à concentração de 460ng foi acrescido de 1 $\mu\text{L}$  de Oligo dT, 1 $\mu\text{L}$  de *Annealing Buffer* e água-DEPC até o volume final de 8 $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 1 minuto, onde foi acrescentado 10 $\mu\text{L}$  do mix da reação *First-Strand* e 2 $\mu\text{L}$  do mix das enzimas SuperScript III/ RNaseOUT. A reação foi incubada a  $50^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos, seguido por  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Assim foi obtido um volume

final de 20µL de cDNA que foi armazenado em freezer -80°C até sua utilização para as reações de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real.

### **Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)**

A expressão quantitativa dos genes foi analisada por meio de reações de PCR em Tempo Real. Foi investigada a expressão dos genes Adiponectina (*ADIPOQ*), Receptor 1 de adiponectina (*ADIPOR1*), Leptina (*LEP*) e Resistina (*RETN*). Essas reações foram realizadas pelo sistema *TaqMan*<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foi utilizado o gene *GAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como controle endógeno da reação para normalizar a expressão dos genes de interesse nas diferentes amostras. Os ensaios *TaqMan*<sup>TM</sup> adquiridos para cada gene foram: *ADIPOQ* (Hs00605917\_m1), *ADIPOR1* (Hs01114951), *LEP* (Hs00174877\_m1), *RETN* (Hs00220767\_m1) e *GAPDH* (Hs02758991\_g1). Foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controle endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de PCR em tempo real realizaram-se em duplicata a partir de: 6,25µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (50ng), sendo adicionado no controle negativo 4,0 µL de água ao invés do cDNA. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos de todas as placas pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems®, Foster City) e Expression Suite (Applied Biosystems®, Foster City). Os softwares utilizam o método comparativo  $C_t$  ( $\Delta\Delta C_t$ ), o qual possibilitou quantificar com precisão a expressão gênica relativa dos genes analisados. Após normalização pela expressão do gene controle endógeno, foram obtidos os valores de expressão para cada gene alvo ( $\Delta C_t$ ).

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos foram tabulados e a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., USA). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste D'Agostino-Pearson e, então, aplicados os testes paramétricos (Comparação múltipla com o teste One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey) ou não paramétricos (Comparação múltipla através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn) para analisar diferenças entre as características dos

grupos. Para a análise da expressão gênica foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Para investigar as correlações entre os diversos parâmetros clínicos, bioquímicos e de expressão gênica utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (dados paramétricos), ou de Spearman (dados não paramétricos). As correlações foram ajustadas para idade e sexo. A análise de correlação foi realizada no programa SPSS® IBM versão 19. O nível de significância estabelecido foi de 5%, ou seja, a hipótese de nulidade foi rejeitada se  $p \leq 0,05$ .

## ANEXO A

Certificado de aprovação deste estudo pelo CEP



**Não autorizo a reprodução deste trabalho**

**(Direitos de publicação reservado ao Autor)**

**Araraquara, 22 de Março de 2016.**

**ROMERITO LINS DA SILVA**