



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RAFAEL NEPOMUCENO OLIVEIRA

*PARÂMETROS CLÍNICOS
PERIODONTAIS E EXPRESSÃO
GENÉTICA EM INDIVÍDUOS COM
DIABETES MELLITUS, DISLIPIDEMIA
E DOENÇA PERIODONTAL*

ARARAQUARA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Rafael Nepomuceno Oliveira

**PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E EXPRESSÃO GENÉTICA EM
INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS, 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”, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

ARARAQUARA
2014

Oliveira, Rafael Nepomuceno.

Parâmetros clínicos periodontais e expressão genética em indivíduos com diabetes mellitus, dislipidemia e doença periodontal/ Rafael Nepomuceno Oliveira - Araraquara: [s.n.], 2014.

109 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

1. Periodontia 2. Diabetes Mellitus 3. Dislipidemias 4. Interleucina-10. 5. Interferons. 6. Genética. I. Título

RAFAEL NEPOMUCENO OLIVEIRA

**PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E EXPRESSÃO GENÉTICA EM
INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS, DISLIPIDEMIA E DOENÇA
PERIODONTAL**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 21 de março de 2014

DADOS CURRICULARES

Rafael Nepomuceno Oliveira

NASCIMENTO: 17/11/1988 - Fortaleza/CE

FILIAÇÃO: José Alberto de Oliveira Filho
Sueli Nepomuceno Oliveira

2000-2011 Curso de Graduação
Universidade Federal do Ceará - UFC

2012-2014 Mestrado em Odontologia - Área de Concentração Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

“

*Os filhos não precisam de pais gigantes, mas
de seres humanos que falem a sua linguagem e sejam
capazes de penetrar-se o coração.”*

(Augusto Cury)

Com muito amor e carinho, dedico este trabalho...

*Aos meus pais **Beto** e **Sueli** que fizeram dos meus sonhos, seus sonhos.*

Minhas fontes de inspiração, honestidade, força e perseverança.

A vocês que estiveram sempre ao meu lado: chegamos juntos a mais uma conquista!

Agradeço Especialmente...

A **Deus**, presente em todos os momentos da minha vida. Luz que me iluminou nos momentos mais difíceis em que achei que poderia fraquejar, dando-me força e atendendo minhas preces. Minha vida segue entregue a ti.

Ao meus maiores incentivadores e mentores: meus pais **Beto** e **Sueli**. Obrigado pelo apoio e amor incondicional, por estarem ao meu lado em todas as decisões e por entenderem minha ausência. Obrigada por sempre terem investido em minha educação e em meus sonhos. **AMO VOCÊS**.

Ao meu irmão **Tiago**, que pelo seu exemplo de dedicação aos estudos, sempre me incentivou a batalhar pelos meus objetivos. Irmão, esta conquista é nossa!

À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Scarel Caminaga** por ter me aceitado e acolhido em um momento tão decisivo da minha vida. Pelas palavras de sinceridade e por me ensinar a ser mais objetivo. Muito obrigado por entender minhas ansiedades, por acreditar em mim e por toda competência e paciência com que me orientou durante a realização desta dissertação. Mais do que isso, agradeço pela “família genética” que você me proporcionou conviver e pelo ambiente de trabalho movido a paz, companheirismo e amizade. Meu exemplo de dedicação e entusiasmo ao ensino e à pesquisa.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico** pelo apoio e confiança durante todo o mestrado, tanto na realização deste trabalho como, nas atividades do estágio docência na clínica de Periodontia.

À **Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote** meu agradecimento especial pelo carinho e acolhimento em todos os momentos, pela amizade e ensinamentos profissionais e de vida que compartilhamos durante estes anos, e principalmente, por sempre reforçar a fé em suas doces palavras. Me sinto privilegiada por conhecer e compartilhar meu dia-a-dia com uma pessoa tão pura.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório **Sâmia Corbi, Livia Finoti, Suzane Pigossi, Bárbara Villela, Giovana Anovazzi e Sâmara Tfaile**. Sem vocês a realização deste trabalho não teria sido possível. Obrigado por terem acolhido o “nordéstino” tão bem no laboratório. Algumas palavras que definem nosso laboratório são: amizade, companheirismo e honestidade. Deus me colocou no caminho de pessoas que a cada dia me ensinam a ser uma pessoa melhor e um profissional mais dedicado.

Às minhas amigas fies e verdadeiras **Livia Finoti** e **Suzane Pigossi**. Por estarem comigo nos momentos mais difíceis. Quando o cansaço e a dúvida apareciam, sempre tínhamos uns aos outros para nos apoiar. Sei que sempre poderei contar com vocês!

"Costumamos dizer que amigos de verdade são os que estão ao seu lado em momentos difíceis...Mas não!

Amigos verdadeiros são os que suportam a tua felicidade!

Porque em um momento difícil qualquer um se aproxima de você.

Mas o seu inimigo jamais suportaria a sua felicidade!!"

(Padre Fábio de Mello)

À minha ex e eterna orientadora, amiga e "mãe-odontológica" **Profa. Dra. Maria Mônica Studart Mendes Moreira**. Agradeço a amizade e a confiança depositada em mim durante todos estes anos. Se hoje estou concluindo o mestrado, muito disso tem sua contribuição. Agradeço ainda o exemplo de competência profissional. Sempre lembrarei da promessa que fiz a você: "Espero um dia poder fazer por alguém tudo aquilo que fez e faz por mim".

"Uns são homens;

Alguns são professores;

Poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se;

Aos segundos, respeita-se;

Aos últimos, segue-se.

Se hoje enxergo longe, é porque fui colocado em ombros de gigantes!"

Aos meus grandes amigos de longas datas **André, Isadora, Isabela, Juan e Raquel** por todos estes anos de companheirismo. Já se foram, no mínimo, 13 anos de amizade. Passei metade da minha vida com vocês. Hoje, parte de cada um de nós tem um pouco de "sexteto". Sorrimos juntos, sofremos juntos, dividimos muitos sonhos... obrigado por poder contar com vocês sempre! Nossa amizade transcende o tempo e a distância.

"As pessoas realmente ligadas não precisam de ligação física. Quando se reencontram, mesmo depois de muitos anos afastados, sua amizade é tão forte quanto sempre."

(Deng Ming-Dao)

À minha “irmã” **Suzanny** por sempre estar ao meu lado. São 2707km de distância, mas mesmo longe levo você comigo. **Suzanny Teixeira Guimarães**: um dos meus maiores exemplos de ser humano em toda sua plenitude. Tenho certeza da sua importância na minha vida. À distância às vezes me obriga a estar ausente em momentos importantes... mas não tenha dúvidas que sempre trago você em meus pensamentos.

*“Enfim, depois de tanto erro passado
Tantas retaliações, tanto perigo
Eis que ressurge noutro o velho amigo
Nunca perdido, sempre reencontrado.
É bom senti-lo novamente ao lado
Com olhos que contêm o olhar antigo
Sempre comigo um pouco atribulado
E como sempre singular comigo.
Um bicho igual a mim, simples e humano
Sabendo se mover e comover
E a disfarçar com o meu próprio engano.
O amigo: um ser que a vida não explica
Que só se vai ao ver outro nascer
É o espelho de minha alma multiplica...”
(Vinícius de Moraes)*

Aos amigos de Fortaleza **Kênia, Erick, Mario, Sara, Yuri e Allan** pelos bons momentos de convivência e verdadeira amizade. Obrigado pelo carinho e incentivo.

Aos grandes amigos que Araraquara me deu de presente: **Stephania, Rodrigo, Carol e Bruno**, pela grande amizade. Foram vocês que nos momentos difíceis, quando a saudade de casa bateu, estiveram ao meu lado, me deram força, me ajudaram, foram confidentes e me colocaram dentro de suas casas como se fosse a minha.

À meu maior presente piracicabano, **Flávia Cera**, por ser tão companheira e fazer parte de minha vida, por tentar entender minha rotina, por me dar forças e por tornar tudo mais leve e prazeroso. Obrigado pela família “**Nepomucera**” e por todos amigos que você me deu. Você é o verdadeiro significado de amizade!

Aos meus **avós, tios e primos** que sempre estiveram próximos, me ajudaram, aconselharam, apoiaram e animaram minha vida. Agradeço especialmente aos meus padrinhos vovô **José Alberto** e vovó **Terezinha**.

À **Ia**, minha eterna babá, que até hoje acha que tenho 10 anos e continua me “**paparicando**”. Obrigado por todo carinho. Saudades...

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.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, **Prof. Dr. Élcio Marcantonio Junior**, **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici 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.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Adriana**, **Cassio**, **Elton**, **Fabiana**, **Fernanda**, **Haline**, **Jackeline**, **Lelis**, **Lígia**, **Patrícia**, **Paula**, **Sâmara**, **Suzane Vinícius P.** e **Vinícius I.** pelo companheirismo.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **D. Maria do Rosário**, **Maria José (Zezé)**, **Priscila**, **Regina Lúcia**, **Claudinha**, **Ester**, **Leandro**, e especialmente a **Isa**, cujo trabalho e dedicação possibilitou a realização dessa dissertação.

À todos os funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente **Margarete** e **Marcelo**, pela atenção e disponibilidade que sempre me atenderam.

Ao **Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli**; aos alunos de pós-graduação **Kadu**, **Paulo**, **Danuza**, **Tatiana**, **Ana Paula** e **Natália**; e aos Assistentes de suporte acadêmico **Mariana** e **Victor**, por sempre me receberem tão bem e me ajudarem em tudo que precisei no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da FCFar - UNESP.

Aos amigas da especialização em Periodontia **Amanda**, **Cássia**, **Fabiana**, **Jéssica**, **Mayara**, **Naiara**, **Paula**, **Pedro**, **Suzane** e **Vinícius** pelo incentivo, companheirismo na clínica e pelos encontros culinários sempre agradáveis!

Aos amigos conquistados no curso de **Odontologia**, turma 2011.2 da **UFC** pelos tempos de convívio agradáveis e enriquecedores.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara** e **Alexandre**, 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!

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

Muito Obrigado!

“

Quando alcançamos nossos objetivos pelo esforço, dedicação e compromisso, sentimos uma alegria ímpar no coração e, a certeza de que Deus abençoa ao filho que trilha sua vida com humildade e fé.”

(José Alberto de Oliveira Filho, **MEU PAI**)

Oliveira RN. Parâmetros clínicos periodontais e expressão genética em indivíduos com diabetes mellitus, dislipidemia e doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

RESUMO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e a Dislipidemia são doenças sistêmicas envolvidas na patogênese da doença periodontal (DP), podendo alterar a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da DP, DM2 (compensado e descompensado) e Dislipidemia na expressão sistêmica de genes da resposta imuno-inflamatória; e a correlação destes genes com os perfis clínico periodontal, glicêmico e lipídico. Foram investigados cinco grupos de pacientes (com 30 indivíduos cada): DMdDisDP (diabetes descompensado, dislipidemia e doença periodontal), DMcDisDP (diabetes compensado, dislipidemia e doença periodontal), DisDP (apenas dislipidemia e doença periodontal), cDP (apenas doença periodontal) e Controle (sem nenhuma das três doenças). Todos os pacientes foram submetidos a exame periodontal, exame físico e avaliação bioquímica dos perfis glicêmico e lipídico. De cada paciente foi coletado sangue, sendo extraído o RNA. O cDNA foi confeccionado para investigação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização de IL-10, IFN- α e IFN- γ por meio de PCR em Tempo Real (qPCR). Nos pacientes com Dislipidemia, a expressão de genes anti-inflamatórios foi menor, enquanto foi maior a expressão de genes pró-inflamatórios. Enquanto genes anti-inflamatórios correlacionaram-se negativamente com parâmetros de perfil glicêmico e lipídico, os genes pró-inflamatórios correlacionaram-se positivamente com estes parâmetros. Não foram observadas diferenças entre os pacientes com DM2 compensados e descompensados. A DP pareceu não influenciar a expressão sistêmica dos genes investigados. Conclui-se que a Dislipidemia foi a principal doença responsável pela diferença de expressão gênica entre os grupos.

Palavras-Chave: Periodontia, Diabetes Mellitus, Dislipidemias, interleucina-10, Interferons, Genética.

Oliveira RN. Periodontal clinical parameters and gene expression in subjects with diabetes mellitus, dyslipidemia and periodontal disease [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 and dyslipidemia are systemic diseases are involved in the pathogenesis of periodontal disease and may alter the immune-inflammatory response of the host. The aim of this study was to investigate the influence of DP, DM2 (compensated and decompensated) and dyslipidemia in systemic gene expression of immune- inflammatory response; and the correlation of these genes with periodontal clinical, glycemic and lipid profiles. Five groups of patients (with 30 individuals each) were investigated: DMdDisDP (decompensated diabetes, dyslipidemia and periodontal disease), DMcDisDP (compensated diabetes, dyslipidemia and periodontal disease), DisDP (only dyslipidemia and periodontal disease), cDP (periodontal disease only) and Control (without any of the three diseases). All patients underwent periodontal examination, physical examination and biochemical evaluation of lipid and glycemic profiles. From each patient, blood was collected and the RNA extracted. The cDNA was made to investigate the expression of genes involved in signaling pathways of IL-10, IFN- α and IFN- γ by Real Time PCR (qPCR). In patients with dyslipidemia, the expression of anti-inflammatory genes was lower, meanwhile there was greater expression of proinflammatory genes. While anti-inflammatory genes correlated negatively with parameters of glucose and lipid profile, pro-inflammatory genes were positively correlated with these parameters. No differences were observed between patients with compensated and decompensated DM2. The DP did not appear to influence systemic expression of the investigated genes. We concluded that the dyslipidemia was the primary disease responsible for the difference in gene expression between groups.

Keywords: Periodontics, Diabetes Mellitus, Dyslipidemias, Interleukin-10, Interferons, Genetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP: Academia Americana de Periodontologia

AGE: Produtos finais de glicosilação avançada

APC: Células Apresentadoras de Antígeno

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar

Ct: *Threshold cycle*

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Doença Periodontal

GAPDH: Gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HbA1c: Hemoglobina glicada

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HF: Hipercolesterolemia Familiar

ICAM-1: Proteína da Molécula de Adesão Intercelular 1

ICAM1: Gene Molécula de Adesão Intercelular 1

IFN- α : Proteína Interferon alfa

IFN- β : Proteína Interferon beta

IFN- γ : Proteína Interferon gama

IFN: Proteína Interferon

IFNA: Gene Interferon alfa

IFNAR-1: Proteína Interferon alfa receptor 1

IFNAR-2: Proteína Interferon alfa receptor 2

IFNAR1: Gene Interferon alfa receptor 1

IFNAR2: Gene Interferon alfa receptor 2

IFNG: Gene Interferon gama

IFNGR-1: Proteína Interferon gama receptor 1

IFNGR-2: Proteína Interferon gama receptor 2

IFNGR1: Gene Interferon gama receptor 1

IFNGR2: Gene Interferon gama receptor 2

IL-10: Proteína Interleucina 10

IL-10RA: Proteína Interleucina 10 receptor alfa

IL-10RB: Proteína Interleucina 10 receptor beta

IL-15: Proteína Interleucina 15

IL-1 α : Proteína Interleucina 1 alfa

IL-1 β : Proteína Interleucina 1 beta

IL-6: Proteína Interleucina 6

IL-8: Proteína Interleucina 8

IL10: Gene Interleucina 10

IL10: Gene Interleucina 10 receptor

IL10RA: Gene Interleucina 10 receptor alfa

IL10RB: Gene Interleucina 10 receptor beta

IL6: Gene Interleucina 6

IMC: índice de massa corporal

IP-10* ou *CXCL-10: Proteína 10 Induzível por Interferon Gama

IP10* ou *CXCL10: Gene da Proteína 10 Induzível por Interferon Gama

IPV: Índice de placa visível

IRF-1: Proteína fator regulador 1 de Interferon

IRF1: Gene fator regulador 1 de Interferon

ISM: Índice de sangramento marginal

JAK-1: Proteína Janus-quinase 1

JAK-1: Proteína Janus-quinase 1

JAK-2: Proteína Janus-quinase 2

JAK: Proteína Janus-quinase

JAK1: Gene Janus-quinase 1

JAK2: Gene Janus-quinase 2

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

NI: Nível de inserção

OPG: Osteoprotegerina

PCR: Proteína C-Reativa

PGE2: Prostaglandina E2

PS: Profundidade de sondagem

RAGE: Receptor dos produtos finais de glicosilação avançada

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa beta

RNA: Acido Ribonucleico

RNA_m ou mRNA: Acido Ribonucleico mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SOCS-3: Proteína Supressor de Sinalização da Citocina 3

SOCS3: Gene Supressor de Sinalização da Citocina 3

SS: Sangramento à sondagem

STAT-3: Proteína Transdutora de Sinal e Ativador da Transcrição 3

STAT1: Gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1

STAT1: Proteína Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição

STAT3: Gene Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3

Th1: Linfócito T auxiliar 1

Th2: Linfócito T auxiliar 2

T_m: Temperatura de melting

TNF- α : Proteína Fator de Necrose Tumoral alfa

TYK-2: Proteína Tirosina-quinase 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
3	PROPOSIÇÃO	34
4	MATERIAL E MÉTODO	35
4.1	Etapas previamente realizadas	35
4.1.1	<i>Seleção dos pacientes</i>	35
4.1.2	<i>Grupos.....</i>	35
4.1.3	<i>Procedimentos clínicos</i>	37
4.1.3.1	<i>Anamnese</i>	37
4.1.3.2	<i>Exame físico</i>	37
4.1.3.3	<i>Exame clínico intrabucal e radiográfico.....</i>	37
4.1.4	<i>Procedimentos laboratoriais</i>	39
4.1.4.1	<i>Análise bioquímica do controle metabólico e perfil lipídico</i>	39
4.1.4.2	<i>Separação de leucócitos para análise da expressão gênica</i>	40
4.2	Etapas realizadas no presente estudo	40
4.2.1	<i>Análise da Expressão Gênica</i>	40
4.2.1.1	<i>Extração RNA</i>	40
4.2.1.2	<i>Confecção do cDNA</i>	40
4.2.1.3	<i>Expressão Gênica por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)</i>	41
4.2.2	<i>Análise Estatística.....</i>	45
5	RESULTADO	46
5.1	Análise da população estudada	46
5.2	Análise da expressão gênica	51
5.3	Análise da correlação ajustada	55
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO	109

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma desordem imuno-inflamatória em resposta a microrganismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*^{17, 102, 138}. A Periodontite é diagnosticada quando ocorre destruição das estruturas que compõem o periodonto de sustentação, ocorrendo perda de inserção periodontal^{2, 12}. Seu diagnóstico é feito quando há perda de inserção periodontal clinicamente detectada e a reabsorção do osso alveolar torna-se evidente radiograficamente²⁰⁸. De acordo com o *workshop* internacional para a classificação de doenças e condições periodontais da Academia Americana de Periodontologia em 1999, dentre as doenças periodontais destrutivas, a periodontite crônica é conhecida por ser a forma mais prevalente, ocorrendo de forma lentamente progressiva. A prevalência e gravidade da periodontite crônica geralmente aumenta conforme a idade^{18, 154}.

O início e progressão da DP ocorre na presença de periodontopatógenos, que apesar de essenciais, são insuficientes para que a doença ocorra. Tabagismo, doenças sistêmicas e herança genética são fatores relacionados ao hospedeiro que participam para o início e progressão da DP^{140, 171}. A influência genética pode explicar, em parte, porque a DP pode se manifestar de diferentes formas clínicas na população²²¹. O Diabetes Mellitus (DM) e a Dislipidemia são doenças sistêmicas que estão envolvidas na patogênese da DP^{75, 231}. Evidências científicas demonstram que o DM é um fator de risco para DP independente do biofilme bacteriano^{12, 167, 208}.

Estudos demonstram uma associação bidirecional entre DP e DM^{24, 94}, sendo a DP considerada a sexta manifestação clínica do DM¹³³. O pobre controle glicêmico está diretamente associado à maior prevalência, severidade e progressão da DP, quando comparado a pacientes com diabetes compensados ou sistemicamente saudáveis^{41, 49, 140, 219}. O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos periodontopatogênicos^{36, 37, 109}, modificar a resposta imune celular e humoral^{62, 188, 200} e também interferir na expressão de genes de citocinas associadas à inflamação periodontal^{62-64, 89, 96, 170}. Por outro lado, a DP, se

não tratada, pode gerar um estado inflamatório crônico sistêmico devido ao aumento na produção de mediadores inflamatórios^{48, 51, 131, 160, 181, 196}. Os altos níveis destes, acompanhados da DP, podem levar à resistência à insulina e, portanto, à falta de controle glicêmico em DM2^{56, 159, 220, 234}. A Periodontite também pode causar uma carga infecciosa por bactérias periodontopatogênicas e seus produtos (como lipopolissacarídeos) que entram na circulação sistêmica^{140, 220}.

Já foi observado que indivíduos com DP podem ter níveis séricos maiores de colesterol total, de lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDL-colesterol) e de triglicérides (TRG), comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis¹³⁵. Por outro lado, acredita-se que este aumento de lipoproteínas no sangue possa influenciar também na saúde periodontal, havendo um aumento na severidade da doença nos pacientes com dislipidemia^{74, 75, 231}. Existem evidências científicas de que há um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, e consequentemente maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) em pacientes hiperlipidêmicos^{43, 60, 74, 125}.

Há anos vem sendo investigada a expressão gênica na DP^{161, 165}. Cada molécula que compõe o sistema imune é regulada por uma complexa rede de sinalização entre citocinas, por isto, podem ocorrer diferentes padrões de ativação e inibição de citocinas e enzimas durante a evolução da doença⁸⁵.

Até o momento não foi encontrado na literatura nenhum estudo investigando concomitantemente a expressão dos genes *IL10*, *IFNG* e *IFNA*, seus receptores e outros genes de sinalização intracelular pertencente as vias destes genes, em indivíduos que apresentassem tanto DM2, Dislipidemia como DP. Acredita-se que conhecer os padrões de expressão desses genes contribuirá para melhor compreender a participação destes no quadro patológico das citadas doenças, inclusive na ocorrência concomitante de duas ou mais delas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

DOENÇA PERIODONTAL

A DP é uma desordem imuno-inflamatória que ocorre em resposta ao biofilme bacteriano que adere a superfícies dos dentes ¹³⁸. Assim, o fator etiológico primário da DP são microrganismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ^{17, 101}. A DP não destrutiva é caracterizada pela gengivite, cujo aspecto clínico principal é inflamação do tecido gengival ². A progressão da doença leva à destruição do tecido gengival e das estruturas que compõem o periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), ocorrendo perda de inserção periodontal, diagnosticando-se assim, a Periodontite ^{2, 12}. Epidemiologicamente, a gengivite é a forma mais comum de DP ². Do ponto de vista do prognóstico, na ausência de tratamento, a gengivite pode progredir para periodontite, apesar disso não ocorrer sempre ^{15, 138}. Os estudos indicam que a Periodontite é sempre precedida por gengivite, embora a gengivite possa ser prevenida por meio de higiene oral regular que inclui escovação e uso de fio dental ^{172, 197}. Seu diagnóstico é feito quando há perda de inserção periodontal clinicamente detectada e a reabsorção do osso alveolar torna-se evidente radiograficamente ²⁰⁸.

De acordo com o workshop internacional para a classificação de doenças e condições periodontais da Academia Americana de Periodontologia em 1999, as doenças periodontais destrutivas (Periodontites) são classificadas em três formas principais - Periodontite Crônica, Periodontite Agressiva e Periodontite como manifestação de doenças sistêmicas. Periodontite Agressiva compreende um grupo de manifestação rara ($\approx 1\%$ da população), com progressão rápida, caracterizada pela destruição severa do tecido periodontal de sustentação, muitas vezes, em uma idade precoce e não condizente com a quantidade de placa bacteriana acumulada e o grau de inflamação. Já a Periodontite Crônica é conhecida por ser a forma mais prevalente, ocorrendo de forma lentamente progressiva. A periodontite Crônica pode ocorrer em qualquer idade, com prevalência e gravidade aumentando com a idade ^{18, 154}.

Como a periodontite Crônica é a forma mais prevalente de DP destrutiva, a

seguir continuaremos a nos referir à esta doença como DP. A DP é a maior causa de perdas dentárias, acometendo aproximadamente 10-15% da população mundial ²⁰. Estudos realizados no Brasil comprovam que 60% da população que frequenta o serviço público de saúde bucal necessitam de algum tratamento periodontal ⁴⁵. Os indivíduos que procuram atendimento público de saúde são geralmente de classe socioeconômica baixa e, portanto, recebem uma educação insuficiente em saúde bucal, não têm os recursos econômicos para visitar um profissional, e muitas vezes não conseguem adquirir produtos básicos de higiene oral ^{45, 93}. Ainda assim, há poucas informações sobre as condições periodontais da população brasileira devido a um problema inerente em epidemiologia periodontal, que é a falta de critérios claros para definição de saúde / doença, que por sua vez é devido à dificuldade no diagnóstico da Periodontite. Os métodos atuais são, na melhor das hipóteses, capazes de avaliar o estado da doença como uma condição causada por um processo histórico ^{92, 93, 173}. O problema é avaliado por meio de várias características que tanto refletem o grau de inflamação (sangramento à sondagem) e experiência acumulada da doença (perda clínica de inserção, perda óssea radiográfica)⁹³.

Como já mencionado, de acordo com Page, Kornman ¹⁷¹ (1997), a DP é iniciada e perpetuada por um grupo bacteriano específico. Apesar de essenciais, as bactérias sozinhas são insuficientes para que a doença ocorra. Atualmente é bem estabelecido que o dano tecidual gerado na DP é atribuído principalmente pela resposta do hospedeiro, e não pela ação bacteriana direta e de seus produtos ^{19, 102, 171}. Diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como fatores ambientais (tabagismo), doenças sistêmicas e herança genética passaram a ser estudados para compreender como participam para o início e progressão da DP ^{140, 171}. A influência genética pode explicar, em parte, porque a DP pode se manifestar de diferentes formas clínicas na população ²²¹.

O DM e a Dislipidemia são doenças sistêmicas que estão envolvidas na patogênese da DP, alterando a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, podendo provocar alteração no metabolismo dos tecidos ósseo e conjuntivo ^{75, 231}. Evidências científicas demonstram que o DM é um fator de risco para DP independente do biofilme bacteriano ^{12, 167, 208}.

DIABETES MELLITUS

O DM é uma doença metabólica, que envolve primariamente uma alteração na homeostasia do metabolismo de carboidratos, seguido de proteínas e lipídios, resultando em hiperglicemia; advinda de alterações na secreção de insulina, de sua ação, ou ambas ^{5, 13, 138}. Existem dois tipos principais de Diabetes: DM1 e DM2. Ambos os tipos, se não forem controlados, são fatores de risco para Periodontite ^{11, 24, 46, 76, 219}. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2006, o atual critério para diagnóstico de Diabetes deve ser a glicemia de jejum $\geq 126\text{mg/dL}$ ²³⁷. 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 paciente diabéticos é o teste de hemoglobina glicada (HbA1c), considerando-se descompensado os indivíduos com níveis de HbA1c $\geq 6,5\%$ ¹³. O DM tornou-se um desafio para a saúde pública global, pois afeta cada vez mais indivíduos pobres e gera ameaças graves para as economias de todos os países ¹¹³. O DM alcançou proporções epidêmicas, afetando mais de 300 milhões de pessoas no mundo, dos quais 90% dos casos são de DM2. Em 2001, na América do Sul, 11 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos eram portadoras de DM ²¹⁴. Em 2012, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) estimou que a prevalência de DM no Brasil foi 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 por DM ^{25, 31}.

O DM1 atinge principalmente indivíduos jovens, estabelecendo-se a partir da infância. O DM1 resulta da destruição de células beta pancreáticas das ilhotas de Langerhans, responsáveis pela produção de insulina. Isso pode ocorrer quando indivíduos geneticamente suscetíveis são expostos à uma infecção viral e desenvolvem uma reação auto-imune que destroem essas células do pâncreas, gerando uma deficiência absoluta na secreção de insulina, e conseqüentemente a glicose tende a acumular-se nos tecidos e no sangue ¹³. O DM2, como dito, a mais prevalente, é uma desordem crônica e multifatorial caracterizada pela resistência insulínica, além de disfunção de células beta pancreáticas, que progressivamente reduzem os níveis de produção de insulina, resultando em um quadro de hiperglicemia, apresentando-se geralmente após os 40 anos de idade ^{13, 16, 76, 208}.

Impulsionada pela rápida globalização e urbanização, com alterações subsequentes na dieta e com a adoção de vida sedentária, ou seja, com pouca atividade física, a epidemia do DM se expandiu em conformidade com o aumento mundial do sobrepeso e obesidade, consequentemente, com aumento percentual de gordura corporal, principalmente na região abdominal ^{5, 42, 144}. Outros fatores que vem contribuindo para a epidemia do DM e que são modificáveis pelo indivíduo são o consumo excessivo de álcool e o estresse psicossocial ^{42, 113, 144}. O sobrepeso e a obesidade têm sido fundamentais para a expansão da epidemia do DM ¹⁷⁵. O DM2 ocorre geralmente em indivíduos obesos após os 40 anos. Estudiosos consideram que a obesidade é o principal fator de risco para o início do DM2, sendo que 60% a 70% dos pacientes diagnosticados com DM2 são obesos ¹⁷⁵.

Com o aumento da prevalência global de DM, aumenta-se também o número de pessoas com complicações decorrentes da doença. Como essas complicações são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade associada ao DM, há necessidade urgente de compreendê-las e obter informações epidemiológicas ²²². Algumas das mais importantes complicações do DM são retinopatia e nefropatia. retinopatia diabética é uma complicação microvascular muito frequente, atingindo 20%-40% dos pacientes com DM ^{13, 192}. De acordo com o Ministério da Saúde, a retinopatia diabética é a principal causa de cegueira irreversível no Brasil. Assintomática em seus estágios iniciais, a retinopatia evolui ao longo do tempo, afetando a maioria dos pacientes que viveram com Diabetes há mais de 20 anos ¹³⁶. A nefropatia diabética é uma complicação comum e devastadora em pacientes com Diabetes, e à semelhança de outros países, a doença renal crônica tem sido um importante problema de saúde pública no Brasil ²⁵. Estudos afirmam que os pacientes com DM e Periodontite mostram um maior risco de cetoacidose, retinopatia e neuropatia, do que pacientes diabéticos sem DP. Além disso, pacientes diabéticos com complicações neurológicas têm um quadro de gengivite mais severa comparados com indivíduos diabéticos sem esta complicação ^{119, 138}.

Nos pacientes com DM2, o excesso de glicose no sangue interage de forma não-enzimática com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocorrendo a formação de produtos finais da glicação avançada (AGE - *advanced glycation end-products*) ⁶. AGEs

são fisiologicamente produzidos pelo organismo, mas em condições de hiperglicemia ou de stress oxidativo aumentado a sua produção também é aumentada ¹⁸⁰. Macrófagos, monócitos e células endoteliais possuem receptores específicos para AGE, chamados RAGE, que quando interagem entre si geram tipos celulares hiper-responsivos, havendo maior secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas interleucina 1 β (IL-1 β) interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) ^{124, 240}. Consequentemente, ocorre a secreção hepática de proteínas de fase aguda, tais como Proteína C-Reativa (PCR), fibrinogênio e plasminogênio ativador/ inibidor; correlacionados dentre outros, com a DP e doenças cardiovasculares ²⁷. A PCR é um marcador extremamente sensível da inflamação sistêmica, produzida principalmente pelo fígado sob a estimulação de citocinas pró-inflamatórias derivado de adipócitos ¹⁷⁶. PCR também surgiu como um poderoso preditor de doenças cardiovasculares ²⁴². Altos níveis de PCR estão correlacionados tanto com DM2, como com o aumento dos níveis de HbA1c em pacientes com DM2 ^{47, 97, 123, 183, 191, 215}. O aumento dos níveis de PCR também têm sido associado a um risco aumentado de doença cardiovascular em pacientes com DM2, a principal complicação responsável pelo aumento da mortalidade nestes pacientes ^{82, 179}.

Como já mencionado, o DM é caracterizado não só por existirem alterações no metabolismo de carboidratos, mas também de lipídios, definida na literatura como dislipidemia diabética. Sendo assim, é importante ressaltar-se o fato do DM2 poder existir de forma concomitante e/ou sinérgica a outras doenças sistêmicas, como por exemplo a própria dislipidemia ^{11 110, 120}.

INTER-RELAÇÃO DP e DM

Uma associação bidirecional entre DP e DM vem sendo reportada desde a década de 1960 ^{24, 94}, sendo a DP considerada a sexta manifestação clínica do DM ¹³³. O impacto do DM na DP é amplamente discutido em estudos longitudinais e transversais. Estes estudos tem comprovado que o pobre controle glicêmico (DM descompensado) está diretamente associado à maior prevalência (2-3 vezes maior o risco), severidade e progressão da DP, quando comparado a pacientes com diabetes compensado ou sistemicamente saudáveis; mesmo excluindo-se fatores de

confundimento^{41, 49, 140, 219}.

Os mecanismos pelos quais o DM2 atua na etiopatogênese da DP vem sendo extensivamente estudados. Acredita-se que o DM2, devido à hiperglicemia, possa alterar o ambiente oral, havendo maior disponibilidade de carboidratos na área subgengival, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos periodontopatogênicos^{36, 37, 109}, além de modificar a resposta imune celular e humoral^{62, 188, 200}; e também interferir na expressão de genes relacionados ao processo de destruição periodontal, como genes osteo-reguladores^{62-64, 89, 96, 170}.

Evidências mostram que no DM2 os neutrófilos apresentam-se com deficiência de aderência, quimiotaxia e fagocitose^{95, 182, 230}. Devido à ação de AGEs, os macrófagos, monócitos e neutrófilos podem expressar um fenótipo com caráter destrutivo, por meio de um aumento na produção de ROS; aumento na síntese de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, TNF- α e Prostaglandina E2 (PGE2); além de uma inibição da liberação de citocinas anti-inflamatórias associadas ao reparo tecidual^{6, 10, 115, 195}.

Tem sido sugerido que no DM, os AGEs inibem a proliferação, diferenciação e síntese de colágeno, além de aumentar a sua degradação, provocando uma diminuição da quantidade de colágeno nos tecidos gengivais^{26, 98, 204}. Estas alterações dificultam o processo de cicatrização e contribuem para o extenso dano tecidual observado em sítios com Periodontite de pacientes diabéticos¹³². Em se tratando de tecido ósseo, a hiperglicemia pode provocar um desequilíbrio nas taxas de Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa- β (*RANKL - Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa β*) e Osteoprotegerina (OPG) nos tecidos periodontais, havendo uma redução na expressão de OPG; além de aumentar a apoptose de osteoblastos, prejudicando o processo de neoformação óssea^{63, 107, 198}.

Por outro lado, vários mecanismos podem explicar o impacto da infecção periodontal no controle glicêmico. a DP, se não tratada, pode gerar um estado inflamatório crônico sistêmico através do aumento na produção de mediadores na circulação sanguínea, como PCR, IL-6 e fibrinogênio^{48, 51, 131, 160, 181, 196}. Os altos níveis destes acompanhados da DP, podem levar à resistência à insulina e, portanto, à falta

de controle da glicemia em DM2, resultando em aumento dos níveis de HbA1c^{56, 159, 220, 234}. A Periodontite também podem causar uma carga infecciosa por bactérias periodontopatogênicas e seus produtos (como lipopolissacarídeos) que entram na corrente sanguínea^{141, 220}.

TNF- α , que é produzido em abundância por adipócitos, aumenta a resistência insulínica por autofosforilação dos receptores de insulina. A IL-6 é importante por estimular TNF- α . A Infecção periodontal pode induzir elevação sérica de IL-6 e consequentemente, TNF- α , podendo induzir ou agravar a resistência à insulina¹⁴¹.

Um estudo recente sugere uma relação concreta entre Periodontite e estresse oxidativo sistêmico, com uma redução nas defesas antioxidantes sistêmicas. Além disso, parece que, após o tratamento periodontal, uma resposta inflamatória aguda transitória ocorre com um aumento concomitante de marcadores de oxidação sistêmica⁵⁰. Esses pacientes também mostram atividade reduzida de células- β pancreáticas^{71, 124, 138}. Vários estudos têm mostrado como o tratamento periodontal químico e mecânico podem melhorar o controle glicêmico. Parece que a terapia periodontal leva a uma redução da taxa plasmática da HbA1c, como também melhora o perfil lipídico^{23, 51, 157, 217}.

DISLIPIDEMIA

A Dislipidemia é uma disfunção metabólica caracterizada por mudanças qualitativas e quantitativas das lipoproteínas no sangue, além de transtornos no metabolismo de lipídios, levando a um aumento na concentração de colesterol total. Os lipídios não são solúveis no plasma, em vez disso são transportados em partículas conhecidas como lipoproteínas¹⁵⁸. Esta doença pode surgir e ser agravada devido a descompensação metabólica gerada pelo quadro de DM e/ou devido a uma dieta rica em gorduras. Uma das principais características da Dislipidemia é o aumento na concentração de LDL e triglicérides, além da redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue^{11, 40, 110}. De acordo com National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III), os seguintes pontos de corte foram usados para definir dislipidemia: (i) Hipercolesterolemia: nível de colesterol total ≥ 200

mg/dL; (ii) Hipertrigliceridemia: níveis de triglicérides ≥ 150 mg/dL; (iii) Baixos níveis de HDL: níveis de HDL <40 mg/dL e (iv) Altos níveis de LDL: níveis de LDL ≥ 130 mg/dL ¹⁵⁶.

As causas da Dislipidemia podem ser genética, ambiental, ou ambos. Dentre as causas genéticas, incluem, Hipercolesterolemia familiar, apolipoproteína B100 defeituosa, hiperlipidemia combinada (familiar), entre outras. Entre as causas secundárias (ambientais), incluem a dieta, uso de algumas drogas, além de doenças e desordens metabólicas, como obesidade e DM2 ¹⁵⁸.

Mais de um milhão de pessoas são afetadas por esta doença metabólica; e em associação com o DM são as principais causas da morbidade e mortalidade devido ao elevado índice de doenças cardiovasculares severas decorrentes ^{14, 142}. 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 ^{57, 149}.

INTER-RELAÇÃO DP e DISLIPIDEMIA

Já foi observado que indivíduos com DP têm níveis séricos de colesterol total, LDL e de triglicérides maiores, quando comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis ¹³⁵. Estes resultados levaram os pesquisadores a considerar a inter-relação entre DP e Dislipidemia como um exemplo de uma doença sistêmica predispondo à infecção por via oral, e uma vez estabelecida a infecção oral, ela agrava a doença sistêmica (assim como ocorre com o DM).

Pela via contrária, acredita-se que este aumento de lipoproteínas no sangue possa influenciar também na saúde periodontal, havendo um aumento na severidade da doença nos pacientes com Hiperlipidemia ^{74, 75, 231}. Estudos in vitro fornecem as bases biológicas para esta associação. Existem evidências científicas de que há um aumento na expressão de citocinas pro-inflamatórias (principalmente IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em macrófagos e hiperatividade de leucócitos, aumentando-se a produção de ROS em pacientes hiperlipidêmicos ^{43, 60, 74, 125}. Porém existem estudos que indicam que a Dislipidemia não está associada com a perda de nível clínico de inserção periodontal, mas que DM2, sim, seja um fator mais importante para determinar a porcentagem de sítios com destruição periodontal ²⁴¹.

É importante ressaltar que DM e Dislipidemia geralmente ocorrem como comorbidades, expondo o indivíduo a um efeito sinérgico de maior risco à DP. Acredita-se que o DM seja um preditor mais forte para a DP do que a Dislipidemia ¹¹. Contrapondo-se a isso, foi demonstrado que a maior produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ocorra em decorrência da hiperlipidemia, e não da hiperglicemia ^{43, 49}.

EXPRESSÃO DE IMPORTANTES GENES NA DP E DM2

Há mais de uma década tem sido investigada a expressão gênica na DP pela técnica de RT-qPCR ^{161, 165}. Em análises da expressão de várias citocinas e enzimas, utilizando biópsia de tecido gengival (cl clinicamente saudável e/ou inflamado) de pacientes com Periodontite Crônica, foi observado que os níveis de mRNA de algumas citocinas, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, TNF- α e Interferon (IFN) foram maiores em tecido gengival inflamado do que em tecido não inflamado ¹⁶⁴.

Cada molécula que compõe o sistema imune é regulada por uma complexa rede de sinalização entre citocinas⁸⁵. Apesar de existirem estudos pregressos investigando níveis de expressão de citocinas em tecidos periodontais, controvérsias podem ser encontradas.

Os estudos dos níveis de IL-10 no sangue, fluido gengival e biópsia de tecido gengival em pacientes com DP são inconclusivos. Existem relatos na literatura de que a expressão de IL-10 em pacientes com Periodontite Crônica é menor do que em pacientes periodontalmente saudáveis ^{30, 64, 174}, porém existem estudos contraditórios a estes resultados ^{87, 90, 99}.

A IL-6 está associada a um estado pró-inflamatório, podendo estimular a reabsorção óssea, seja pelo aumento de RANKL ou por induzir a formação de osteoclastos por um mecanismo independente ^{126, 128, 129}. A IL-10 parece ser um potente inibidor de expressão de IL-6 por fibroblastos, e consequentemente, um importante modulador da reabsorção óssea na DP ²³³. Em estudos que analisaram a expressão do gene *IL10*, foi observada maior expressão em pacientes com DP quando comparado a pacientes sem a doença. Entretanto, nos pacientes com DP, a expressão de *IL10* no tecido gengival foi inferior nos sítios doentes de pacientes com DM2 do que em

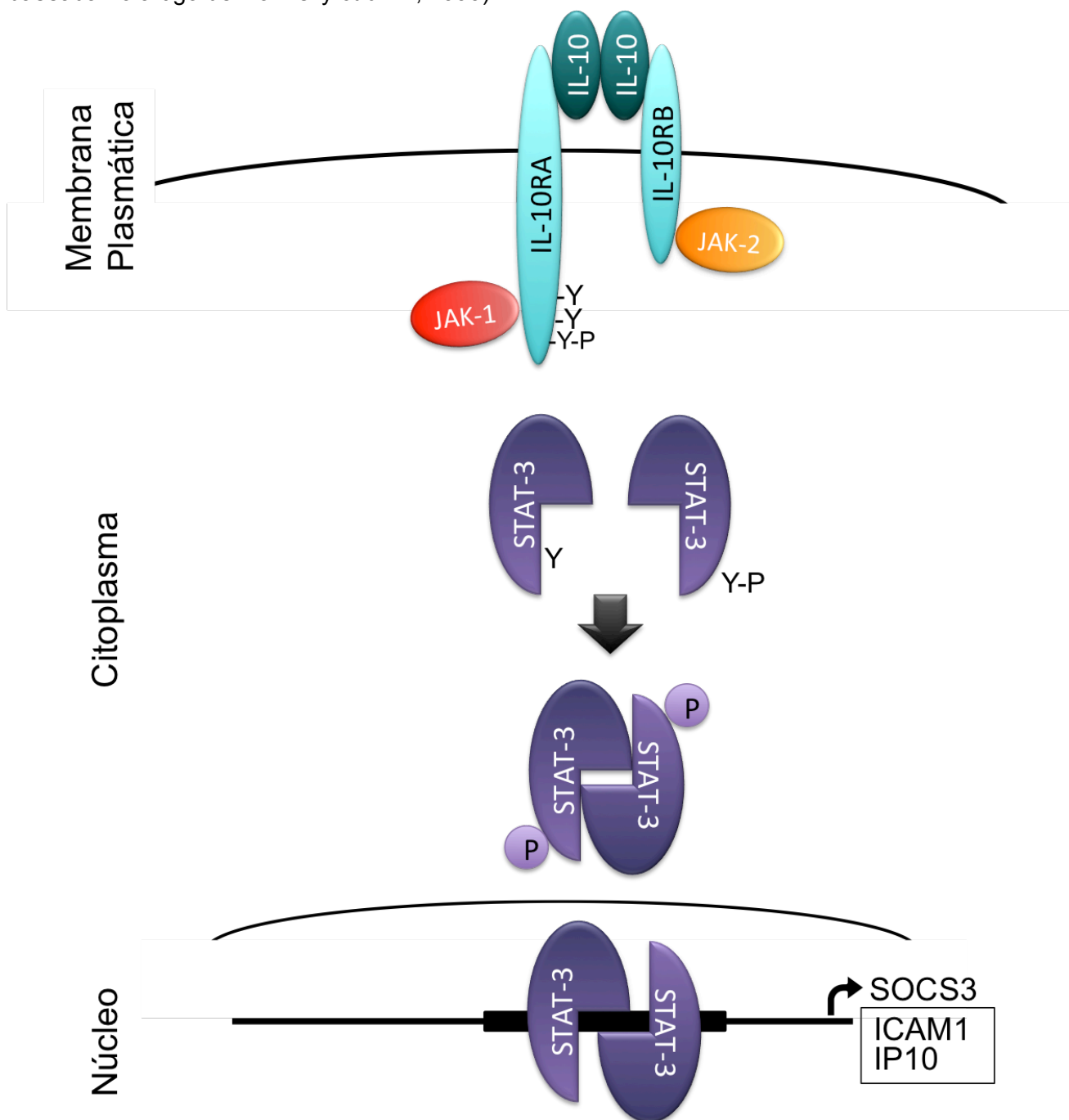
pacientes sem diabetes ⁶³. Além disso, foi encontrado um aumento na relação *IL6:IL10* em sítios doentes de pacientes diabéticos do que em pacientes não-diabéticos ⁶³. Estes resultados indicam que o DM favorece um ambiente pró-inflamatório e pró-reabsortivo, através da redução da expressão de IL10 e aumento de IL6. Entretanto, estes resultados são contraditórios, existindo estudos in vitro mostrando um aumento na expressão de *IL10* em um ambiente rico em glicose ⁸⁹. Provavelmente outros fatores relacionados ao Diabetes estejam envolvidos, reduzindo a expressão de *IL10* in vivo.

VIA DE SINALIZAÇÃO DO GENE *IL10*

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, produzida por diferentes tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos e linfócitos (principalmente células Th2). A IL-10 atua tanto na inibição da expressão de moléculas de superfície, como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC - Major Histocompatibility Complex) de Células Apresentadoras de Antígeno (APC - Antigen-presenting Cell), como na inibição de macrófagos ativos, sendo assim um excelente regulador de feedback negativo ^{1, 22, 59, 147}. Os macrófagos secretam citocinas como TNF- α que aumentam a ativação de células Th1. Como a IL-10 inibe a função dos macrófagos ativados e inibe a expressão de MHC por APCs, ela colabora para o retorno do sistema imune ao estado de repouso à medida que a infecção bacteriana vai sendo debelada. Isso ocorre através da supressão tanto da ativação de linfócitos Th1, como da produção de citocinas derivadas destas células, exemplo o IFN- γ ^{1, 59}. A IL-10 também atua na diferenciação de células Th2, assim como na ativação de linfócitos B, estimulando tanto a sua proliferação quanto a diferenciação ^{78, 85, 239}.

A resposta imune é regulada através da ligação das citocinas aos seus receptores na superfície das células, por este motivo é importante investigar também a expressão dos receptores da IL-10. O gene *IL10* possui dois receptores: IL10-RA (IL-10R1) e IL10-RB (IL-10RB) ¹⁸⁶ (Figura 1). Ao se ligar a estes receptores, forma-se um complexo entre IL-10 e os dois receptores levando à transdução do sinal que ativa respostas específicas nas células-alvo. Esta transdução é mediada pela via JAK-STAT, ou seja, envolve as enzimas Janus-quinase 1 (JAK-1) e o Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT-3) ¹.

Figura 1 - Sinalização da citocina IL-10 pela via JAK/STAT. A citocina IL-10 se liga ao receptor IL10RA dando início à cascata de eventos de transdução de sinal que inclui a fosforilação de JAK-1 e consequente fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor IL10RA que servem como sítios de ancoragem para o STAT-3 que torna-se ativada e se dissocia do receptor ligando-se a outra molécula STAT-3. Os dímeros STAT-3 migram para o núcleo da célula e se ligam às sequências de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, e ativam a transcrição desse gene; que neste exemplo é o *SOCS3*. *ICAM1* e *IP10* são genes possivelmente responsivos à IL10. (figura baseada no artigo de Donnelly *et al.* ⁵⁹, 1999)



Após a formação do complexo, ocorre então a fosforilação do JAK-1 e consequentemente a fosforilação de resíduos específicos de tirosina (Y) no domínio intracelular do receptor IL-10RA que servirão como sítios de ancoragem para o STAT-3. Este processo ativa a proteína STAT-3 a qual se dissocia do receptor IL10-RA e liga-se a outra STAT-3. Esse dímero migra para o núcleo celular e se liga ao DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, ativando a transcrição dos mesmos (Figura 1). Um exemplo de gene responsivo à IL-10 é o SOCS3, o qual produz a proteína SOCS-3 que inibe a sinalização dependente de JAK/STAT, por inibir a fosforilação do STAT⁵⁹. A habilidade da IL-10 em rapidamente induzir a expressão de SOCS-3 pode explicar, ao menos em parte, como esta interleucina inibe a expressão de muitos genes de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α , em monócitos e macrófagos^{1, 59, 236}.

Dois genes cuja expressão são inibidas pela IL-10 são os genes das proteínas Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1) e Proteína 10 Induzida por Interferon γ (IP-10 ou CXCL-10), pois estes genes, induzidos pelos interferons α e γ , utilizam a STAT-1 como molécula transdutora de sinal ao núcleo. Como a IL-10 atua na supressão da fosforilação da STAT-1 e esta fosforilação seria necessária para ativar a indução desses genes, podemos então dizer que a IL-10 inibe a expressão destes genes^{108, 118}. IP-10 e ICAM-1 são proteínas cuja expressão é aumentada em resposta à citocinas pró-inflamatórias^{1, 209}. IP-10 é induzida por IFN- γ , e tem como função promover o recrutamento de células Th1. ICAM-1 é um antígeno do MHC de Classe II em monócitos. A inibição de sua expressão afeta significativamente a capacidade de ativação das células T por APCs¹⁴⁷.

VIAS DE SINALIZAÇÃO DOS GENES *IFNA* e *IFNG*

É crescente o número de publicações científicas que investigam o envolvimento imunogenético dos IFNs na DP^{61-63, 96, 188, 199, 226}. Pesquisas revelaram diversos mecanismos de ação dos IFNs, incluindo atividade antiviral e potencializadora do sistema imune, promovendo ativação de macrófagos e remodelação óssea. Estas citocinas são classificados em três categorias baseadas em suas especificidades antigênicas: IFN leucocitário (IFN- α), fibroblástico (IFN- β) e imune (IFN- γ)^{121, 225}.

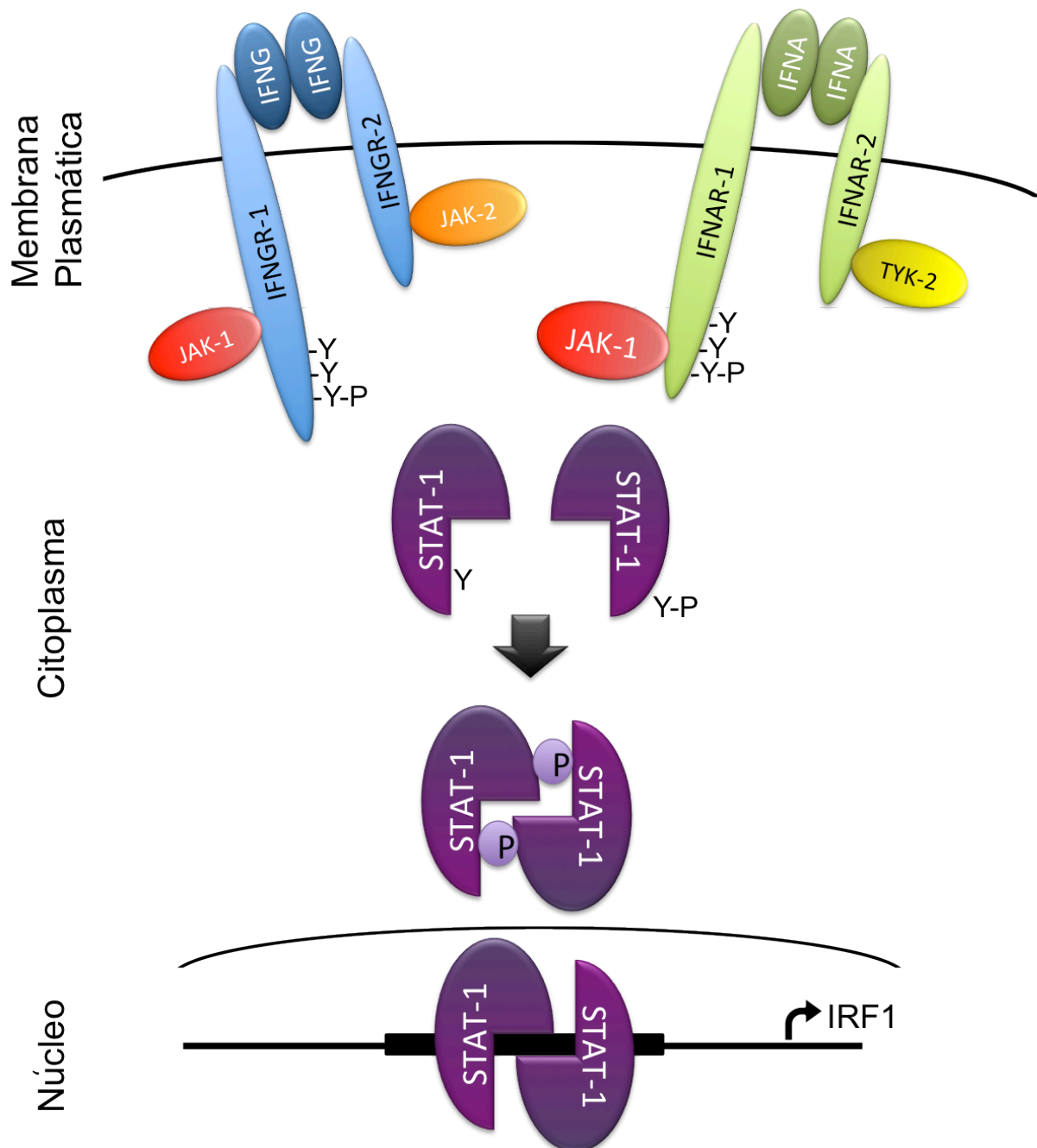
A proteína IFN- α é produzida principalmente por leucócitos. Sua expressão aumenta normalmente após exposição à vírus, polipeptídeos e citocinas. A produção do IFN- γ é tipicamente realizada prioritariamente por células T e células matadoras naturais (*Natural Killer*). Sua indução é realizada após infecção e estímulos por antígenos específicos de células T ^{58, 121}. O IFN- α induz atividade antiproliferativa e antitumoral enquanto que o IFN- γ , apesar de ter atividade antiviral mais fraca, possui propriedade imunomodulatória mais potente ²²⁸.

Os IFNs são divididos em dois grandes subgrupos dependendo da sua habilidade de ligação com os receptores ^{3, 106, 121}. Foram denominados IFNs do tipo I aqueles que se ligam aos receptores do IFN do tipo I, dentre eles o IFN- α . O IFN- γ é o único IFN do tipo II, e sua ligação é somente com os receptores do tipo II ^{121, 178}.

Assim como a IL-10, os IFNs (IFN- α e IFN- γ) também possuem uma complexa rede de sinalização celular. O IFN- γ tem dois receptores (heterodiméricos), o IFNGR-1 e o IFNGR-2, enquanto que o IFN- α possui os receptores IFNAR-1 e IFNAR-2 ¹⁸⁶ (*Figura 2*). Os mecanismos pelos quais decorre a transdução de sinais após ligação dos IFNs aos seus receptores são mediados principalmente por fosforilação de enzimas JAK associadas aos receptores e por fatores de transcrição STAT, configurando a via de sinalização JAK/STAT. O STAT-1 é o principal fator de transcrição que regula genes responsivos a IFN- α e IFN- γ ¹.

Os IFNs ligam-se aos seus respectivos receptores formando um complexo e promovem, por meio de uma série de interações proteicas, a fosforilação de tirosina nas subunidades desses receptores por meio de JAK-1 e JAK-2 para IFN- γ ; e JAK-2 e TYK-2 para IFN- α . Uma vez fosforilados, esses resíduos de tirosina servem como sítios de ancoragem para STAT-1, que torna-se ativo e se dissocia dos receptores de IFN, ligando-se a outra molécula STAT-1. O dímero segue para o núcleo da célula onde se liga a sequências de DNA, em regiões promotoras de genes responsivos a IFN- α e IFN- γ (*Figura 2*) ^{54, 103}.

Figura 2 - Sinalização das citocinas IFN- α e INF- γ pela via JAK/STAT. Os sinais de IFN- γ interagem por meio de receptores diméricos IFNGR-1 e IFNGR-2, enquanto IFN- α liga-se a seus receptores IFNAR-1 e IFNAR-2. Para ambos IFN- α e INF- γ há transdução do sinal por meio da JAK-1 que media a fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor IFNGR-1 ou IFNAR-1, os quais servem como sítios de ancoragem para a STAT-1 que se torna ativada, se dissocia do receptor e forma dímeros. Os dímeros STAT-1 migram para o núcleo da célula e se ligam às sequências de DNA nas regiões promotoras. Dessa forma é ativada a transcrição de genes responsivos à IFNs; que neste exemplo é o *IRF1*. (figura baseada no artigo de Darnell *et al.* ⁵⁴, 1994)



O *Fator Regulador de Interferon (IRF)* faz parte de uma família de genes que codificam fatores de transcrição, os quais atuam como mediadores dos efeitos de *IFNs*. A indução da expressão do IRF-1 é realizada tanto pelo IFN- α quanto pelo IFN- γ que são mediados pelo fator de transcrição STAT-1. Por se ligar a elementos ativadores no promotor dos genes *IFNA* e *IFNG*, o IRF-1 desempenha um papel importante na diferenciação de linfócitos Th1¹³⁴.

Como já relatado anteriormente, a IL-10 pode inibir a expressão de genes induzidos por IFNs por meio da inibição do complexo de transcrição¹¹⁷. Em altas doses de IFNs, a ação inibitória de IL-10 é reduzida, no entanto ocorre a estimulação da expressão do gene *IRF1*¹¹⁸.

Em estudos realizados com amostras de tecido gengival de pacientes com DP e DM2 foi observado que o aumento da expressão de IFN- γ está associado a DP mas não ao DM2^{61, 63}. Além disso, estudos clínicos recentes sugerem que o elevado nível de expressão de IFN- γ nas amostras de saliva de pacientes pode ser associado com a severidade da DP^{64, 90, 96, 200}. Outros estudos já mostram que o DM provoca uma redução tanto dos níveis de citocina IFN- γ no sangue de pacientes como uma redução da expressão do gene *IFNG* em tecido periodontal de animais^{170, 188}. Entre pacientes com DM2 compensados e descompensados, a expressão de IFN- γ é inferior nos pacientes descompensados¹⁹⁸. Entretanto, existem estudos que não mostram associação da expressão gênica de *IFNG* nem na DP nem no DM2⁶².

Em vista da literatura consultada surgiu a hipótese de que indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (compensados e descompensados), Dislipidemia e Doença Periodontal expressem de maneira alterada genes das vias do *IL10*, *IFNA* e *IFNG*. Além disso, essa possível expressão diferencial poderia estar relacionada com o perfil periodontal, físico e bioquímico dos pacientes.

3 PROPOSIÇÃO

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram:

(I) Avaliar pela técnica de RT-*qPCR* a expressão de genes envolvidos na via de sinalização do gene *IL10* (*IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *ICAM1* e *IP10*) e genes envolvidos na via de sinalização dos genes *IFNG* e *IFNA* (*IFNG*, *IFNA*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *JAK1*, *STAT1* e *IRF1*), em indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (compensados e descompensados), Dislipidemia e Doença Periodontal;

(II) Investigar a correlação para verificar a possível inter-relação da expressão dos genes investigados com os dados clínicos (físicos e periodontais) e bioquímicos (perfil glicêmico e lipídico) dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Etapas previamente realizadas

4.1.1 *Seleção dos Pacientes*

Cada paciente incluído neste estudo foi envolvido em outros previamente desenvolvidos pelo presente grupo de pesquisa (Processos FAPESP 2007/08362-8 e 2010/10882-2), que contaram com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr-UNESP (nº 50/06) (Anexo).

Após esclarecimento da natureza e objetivos da pesquisa, os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nos estudos anteriores foi realizado o exame clínico periodontal e as coletas de sangue para as devidas análises.

Os pacientes foram selecionados dentre os que buscaram atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) e os que foram encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde. Os participantes desta pesquisa receberam orientação sobre a Doença Periodontal e foram tratados periodontalmente. Os pacientes portadores de Diabetes e Dislipidemia, quando necessário, foram encaminhados a um endocrinologista 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.

4.1.2 *Grupos*

Foi realizado um cálculo amostral para definição do número de pacientes em cada grupo. Como a avaliação da concentração de citocinas era importante nos estudos iniciais realizados por este grupo de pesquisa, foi verificado por cálculo amostral que com 30 pacientes em cada grupo seria possível obter 80% de poder do estudo com 5% de significância para as análises. Para o presente estudo em que se foca a avaliação da expressão gênica, o tamanho amostral de cada grupo já formado é compatível, ou até supera o observado na literatura^{62, 63, 89, 96, 162}.

Para realização deste presente estudo, a amostra foi composta de 150 pacientes, divididos em cinco grupos:

- GRUPO DMdDisDP (n=30) - Indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 descompensado, com Dislipidemia e com Periodontite Crônica (AAP, 1999);
- GRUPO DMcDisDP (n=30) - Indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 compensado, com Dislipidemia e com Periodontite Crônica (AAP, 1999);
- GRUPO DisDP (n=30) - Indivíduos sem Diabetes Mellitus tipo 2, com Dislipidemia e com Periodontite Crônica (AAP, 1999);
- GRUPO cDP (n=30) - Indivíduos sem Diabetes Mellitus tipo 2, sem Dislipidemia e com Periodontite Crônica (AAP, 1999);
- GRUPO Controle (n=30) - Indivíduos sem Diabetes Mellitus tipo 2, sem Dislipidemia e sem Periodontite Crônica (AAP, 1999).

Foram definidos como critérios de inclusão e exclusão da amostra:

Critérios de inclusão na amostra:

- Ambos os sexos;
- Idade entre 35 e 60 anos;
- Presença de, no mínimo, 15 dentes;
- Apresentar pelo menos, 4 sítios com PS $\geq$ 5mm, NI $\geq$ 4mm e sangramento à sondagem, em dentes não-adjacentes, nos grupos de pacientes com Doença Periodontal (DMdDisDP, DMcDisDP, DisDP e cDP).

Critérios de exclusão da amostra:

- Antibioticoterapia nos seis meses e de anti-inflamatórios esteróides ou não-esteróides nos três meses antecessores ao estudo;
- Gestação e lactação;
- Uso de anticoncepcional ou qualquer outra forma de hormônio;
- Tabagismo: fumantes e ex-fumantes a menos de 5 anos;
- Presença de anemia;
- Tratamento periodontal nos últimos 6 meses;

- Uso de drogas hipolipemiantes: vastatinas, estatinas, inibidores da HMG-CoA redutase, resinas de troca, fibratos, ácido nicotínico, ômega-3, ácido acetilsalicílico, inibidores da enzima de conversão, betabloqueadores;
- Uso de drogas que interferem no metabolismo lipídico: 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.

4.1.3 Procedimentos Clínicos

4.1.3.1 Anamnese

Os grupos de pacientes portadores de Diabetes com Dislipidemia (Grupos DMdDisDP e DMcDisDP) foram avaliados quanto à história pregressa da doença e histórico de saúde geral e bucal por meio de ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes - FOAr, sob coordenação da Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, enquanto 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.

4.1.3.2 Exame físico

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

4.1.3.3 Exame clínico intrabucal e radiográfico

Todos os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado, utilizando sonda periodontal milimetrada tipo Williams, sonda exploradora nº 5, espelho plano e pinça clínica, e prévia secagem com jato de ar.

A avaliação periodontal consta de índice de placa visível (IPV), índice de sangramento marginal (ISM), sangramento à sondagem (SS), mensuração da profundidade de sondagem (PS), posição da margem gengival (NG) e nível de inserção (NI). A seguir, explicam-se as características que determinam cada índice periodontal mencionado:

- Índice de placa visível (IPV): 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 (ISM): presença ou ausência de sangramento marginal após percorrer o espaço do sulco, em contato com o tecido gengival, de uma proximal à outra, com a sonda periodontal milimetrada inclinada em 60 graus em relação ao dente.
- Posição da margem gengival (NG): distância da margem gengival à junção cimento-esmalte.
- Sangramento à sondagem (SS): presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem.
- Mensuração da profundidade de sondagem (PS): distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, medida com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e disto-lingual.
- Nível clínico de inserção: corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio de cada elemento dentário.

Após o exame periodontal foi realizado exame radiográfico periapical de boca toda para avaliação da perda óssea periodontal. O exame radiográfico intra-oral de cada paciente constou de incidências periapicais realizadas com auxílio de posicionadores autoclaváveis da marca RINN; filme periapical kodak e um aparelho de raio-X odontológico convencional. Posteriormente, os filmes radiográficos foram processados na processadora automática Dent-X 9000 utilizando soluções químicas Kodak e montados em cartelas apropriadas para interpretação das imagens em negatoscópio.

4.1.4 Procedimentos laboratoriais

4.1.4.1 Análise bioquímica do controle metabólico e perfil lipídico

Os pacientes foram encaminhados a um Laboratório de Análises Clínicas com experiência na realização dos exames solicitados, onde sangue foi coletado por meio de punção venosa. Os seguintes exames foram realizados no aparelho COBAS MIRA plus: Hemograma (ABX Micros 60), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), HbA1c (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) .

Para os resultados de perfil glicêmico, foram considerados os seguintes valores de referência:

- Glicemia de jejum: foram considerados normoglicêmicos os pacientes com resultado de glicemia de jejum inferior a 100mg/dl. Pacientes com glicemia de jejum $\geq 100\text{mg/dl}$ foram considerados pacientes com DM.
- Hemoglobina Glicada (HbA1c): foram considerados descompensados os pacientes com DM e HbA1c $\geq 8,0\%$. foram considerados compensados os pacientes com DM e HbA1c $< 8,0\%$.

As frações do VLDL e LDL-colesterol foram calculadas segundo a equação de Friedewald (válida se Triglicérides $< 400\text{mg/dl}$) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001):

- Colesterol VLDL = triglicérides/5
- Colesterol LDL= Colesterol Total – (HDL+VLDL)

Para os resultados do perfil lipídico, foram considerados os seguintes valores de referência, de acordo com o *National Cholesterol Educational Program* (NCEP) *Adult Treatment III* (ATP III):

- Colesterol Total (CT): Foram considerados altos os valores $\geq 240\text{ mg/dl}$.
- LDL (Low density lipoprotein): Foram considerados altos os valores $\geq 160\text{ mg/dl}$.
- HDL (High density lipoprotein): Foram considerados baixos os valores $\leq 40\text{ mg/dl}$.

- Triglicérides (TG): Foram considerados altos os valores ≥ 200 mg/dl.

4.1.4.2 Separação de leucócitos para análise da expressão gênica

A coleta de sangue para as análises de expressão gênica, foi realizada em tubos mantidos em gelo e os leucócitos do sangue foram separados imediatamente por meio de centrifugações com *Ficoll Paque Plus* 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°C até o momento da extração do RNA.

4.2 Etapas realizadas no presente estudo

4.2.1 Análise da Expressão Gênica

4.2.1.1 Extração RNA

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.

4.2.1.2 Confeção 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 μL de Oligo dT, 1 μL de *Annealing Buffer* e água-DEPC até o volume final de 8 μL . A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 1 minuto, onde foi acrescentado 10 μL do mix da reação *First-Strand* e 2 μL do mix das enzimas SuperScript III/ RNaseOUT. A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido por 85°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.

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

A expressão quantitativa dos genes foi analisada por meio de reações de RT-qPCR, utilizando-se o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City). Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras através da fluorescência do SYBR Green que é emitida quando este está ligado à fita dupla do DNA. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com o SYBR Green Mix, como determinado pelo fabricante. Para controle endógeno da reação foi escolhido o gene *GAPDH* para normalizar a expressão dos genes de interesse nas diferentes amostras. Os genes de interesse analisados neste estudo foram: *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT1*, *STAT3*, *SOCS3*, *ICAM1*, *IP10*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IRF1* (Tabelas 1 e 2). Foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controlado endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. (Figura 3).

Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata a partir de: 12,5µL de SYBR® Green Universal PCR Master Mix 2x, 5,0µL da solução do par de primers (500nM cada), 2,5µL de água Milli-Q e 5µL de cDNA (3ng). As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Um ciclo final com temperatura crescente de 60 a 95°C (2°C/min), sendo a fluorescência medida a cada 15 segundos, foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação (Figura 4). 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 ($\Delta\Delta C_t$) e 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 (ΔC_t).

Tabela 1 - Primers específicos para cada gene (Via de sinalização do gene *IL10*).

Gene	Número de Acesso	Primer		Produto
		Tipo	Sequência	Comprimento do Amplicon
<i>GAPDH</i>	NM_001256799.2	F	5' CAAGGCTGTGGGCAAGGT 3'	88
		R	5' CAGGTCAGGTCCACCACTGA 3'	
<i>IL10</i>	NM_000572	F	5' GCCAGGGCACCCAGTCT 3'	74
		R	5' TCGGAGA TCTCGA AGCA TGTT 3'	
<i>IL10RA</i>	NM_001558	F	5' CGCTCCTGAGGTATGGAATAGAG 3'	115
		R	5' GCCCGGT AGCCA TTGCT 3'	
<i>IL10RB</i>	NM_000628	F	5' AA TGGAGTGAGCCTGTCTGTGA 3'	90
		R	5' TGAAGACCGAGGCCA TGAG 3'	
<i>JAK1</i>	NM_002227	F	5' GTCACAACCTCTTTGCCCTGTAT 3'	91
		R	5' CGGAGGGACA TCTTGTCA TCA 3'	
<i>STAT3</i>	NM_139276	F	5' TGCTGAAATCATCATGGGCTATA 3'	90
		R	5' TCCTTGGAATGTCAGGATAGAG 3'	
<i>SOCS3</i>	NM_003955	F	5' TCCCCCAGAAGAGCCTATT 3'	90
		R	5' GTCTTCCGACAGAGA TGCTGAA 3'	
<i>IP10</i>	NM_001504	F	5' ACTGCCCTTCTCA TTTGGAAAC	100
		R	5' CCTGGGCTGTGGCTTCA T 3'	
<i>ICAM1</i>	NM_000201	F	5' GAAAA TTCCAGCAGACTCCAA 3'	94
		R	5' CGA TGGGCAGTGGGAAAGT 3'	

F = Primer forward; R = Primer reverse

Tabela 2 - Primers específicos para cada gene (Vias de sinalização dos genes *IFNA* e *IFNG*).

Gene	Número de Acesso	Primer		Produto
		Tipo	Sequência	Comprimento do Amplicon
<i>GAPDH</i>	NM_001256799.2	F	5' CAAGGCTGTGGGCAAGGT 3'	88
		R	5' CAGGTCAGGTCCACCACTGA 3'	
<i>IFNG</i>	NM_000619	F	5' GAAACGAGATGACTTCGAAAAGC 3'	113
		R	5' GCTGCTGGCGACAGTTCA 3'	
<i>IFNGR1</i>	NM_000416	F	5' GGTCTGTGAAGAGCCGTTGTC 3'	142
		R	5' CGGGACCACGTCAGGAATAT 3'	
<i>IFNGR2</i>	NM_005534	F	5' GGAAAAGGAGCAAGAAGATGTTCT 3'	93
		R	5' AGCTCCGATGGCTTGATCTC 3'	
<i>IFNA</i>	NM_002169	F	5' GAAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCC 3'	110
		R	5' ATGGAGGACAGAGATGGCTTG 3'	
<i>IFNAR1</i>	NM_000629	F	5' CACTTCTTCATGGTATGAGGTTGACT 3'	96
		R	5' ATTGCCTTATCTTCAGCTTCTAAATGT 3'	
<i>IFNAR2</i>	NM_207584	F	5' TCATATGATTCGCCTGATTACACA 3'	108
		R	5' TGGTACAATGGAGTGGTTTTTTAATT 3'	
<i>JAK1</i>	NM_002227	F	5' GTCACAACCTCTTTGCCCTGTAT 3'	91
		R	5' CGGAGGGACATCTTGTCATCA 3'	
<i>STAT1</i>	NM_139266	F	5' GTGTTATGGGACCGCACCTT 3'	107
		R	5' AAGACCAGCGGCCTCTGA 3'	
<i>IRF1</i>	NM_002198	F	5' GCATGGCTGGGACATCAAC 3'	97
		R	5' CTTGGGATCTGGCTCCTTTTC 3'	

F = Primer forward; R = Primer reverse

Figura 3 - Curva padrão para verificação da eficiência de amplificação do gene *GAPDH* por PCR em Tempo Real. A eficiência de amplificação é determinada pela função: $E_{\text{fic}} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

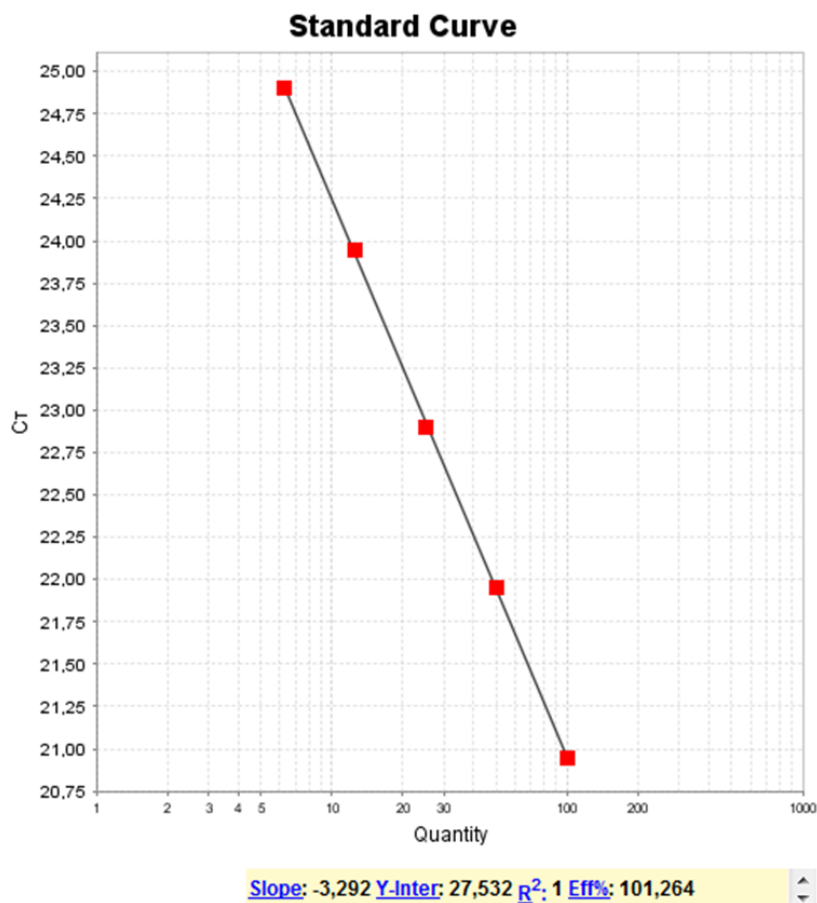
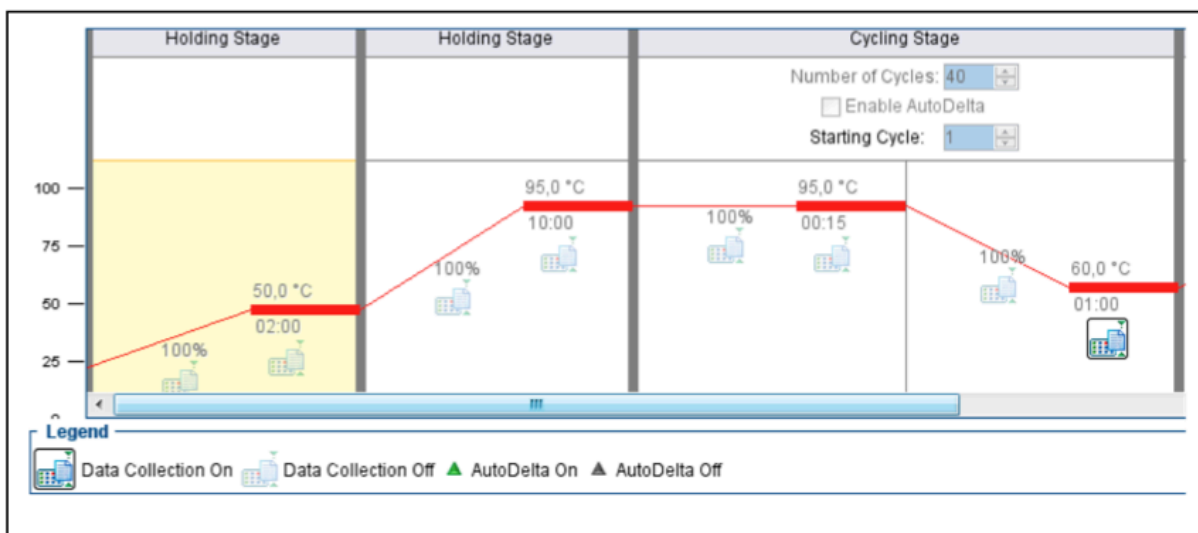


Figura 4 - Ciclo térmico da reação de RT-qPCR à qual as amostras foram submetidas



4.2.2 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 pelo teste de Dunn). O nível de significância estabelecido foi de 5%, ou seja, a hipótese de nulidade foi rejeitada se $p \leq 0,05$. O coeficiente de correlação parcial de Pearson foi utilizado para dados paramétricos, ou coeficiente de correlação parcial de Spearman para dados não paramétricos, para investigar as correlações entre os diversos parâmetros ajustados para idade e sexo. A análise de correlação foi realizada no programa SPSS® IBM versão 19. O nível de significância estabelecido foi de 5%. A hipótese de nulidade foi rejeitada se $p \leq 0,05$.

RMS181

5 RESULTADO

5.1 Análise da população estudada

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos da análise conjunta dos dados do projeto sob responsabilidade da Profa. Dra. Silvana R. Perez Orrico (Processo FAPESP 2007/08362-8) e do presente projeto, pois os pacientes são os mesmos e os estudos estão interligados.

a) Características demográficas e dados relacionados ao Diabetes Mellitus

Foram triados um total de 1788 pacientes, e destes, 150 pacientes (30 pacientes por grupo) obedeciam aos critérios de inclusão da pesquisa.

As características demográficas da amostra estão descritas na Tabela 3. Foi constatado que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao gênero.

Tabela 3 - Características demográficas da população estudada

	DMdDisDP	DMcDisDP	DisDP	cDP	Controle
	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30
Gênero (F / M)	18 / 12*	20 / 10*	17 / 13*	19 / 11*	18 / 12*
Idade (Média ± DP)	48.0 (±7.6) ^a	50.3 (±6.7) ^a	49.0 (±7.5) ^a	45.9 (±5.9) ^a	39.3 (±3.6)
Etnia					
(branca/parda/negra)	13 / 10 / 7	15 / 11 / 4	20 / 8 / 2	14 / 11 / 5	23 / 3 / 4

diferença não significativa (Teste Kruskal-Wallis; $\alpha=5\%$); ^a $p<0.05$ em relação ao grupo Controle; DP = desvio-padrão.

Na avaliação dos dados relativos ao Diabetes Mellitus, não foi observada diferença entre os grupos quanto ao tempo de diagnóstico e ao número de internações pela doença (Tabela 4). No entanto, o grupo DMdDisDP apresentou maior número de complicações relacionadas ao diabetes em relação ao grupo DMcDisDP, diferenciando-se pelo fato dos pacientes descompensados terem apresentado mais de uma complicação associada ao DM; sendo a retinopatia a mais prevalente, seguida pela nefropatia. Em ambos os grupos, os hipoglicemiantes foram os medicamentos mais utilizados para controle do diabetes.

Tabela 4 - Dados relativos ao Diabetes Mellitus

	DMdDisDP	DMcDisDP
	n=30	n=30
Tempo de diagnóstico (anos) (Média±DP)	6.2 (±4.2)	5.2 (±6.6)
Presença de Complicação associada ao DM	19*	12
Presença de uma complicação	09	09
Presença de mais de uma complicação	10	03
Número de internações	6	4
Medicamentos para controle:		
Hipoglicemiante	20	15
Insulina	1	1
Hipoglicemiante + Insulina	8	5
Nenhum	1	9

* p< 0,01 (Teste Mann Whitney; α=5%); DP = desvio-padrão.

b) Características físicas e laboratoriais

Quanto aos dados do exame físico, tanto para o parâmetro Índice de Massa Corporal (IMC), como para Proporção Cintura/Quadril verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos com DM (DMdDisDP e DMcDisDP) e o grupo cDP, e entre o grupo Controle e os demais grupos (Tabela 5). O parâmetro Circunferência Abdominal apresentou diferença significativa entre o grupo DMcDisDP e os grupos cDP, DisDP e Controle. Também foi observada diferença entre os grupos DMdDisDP, DisDP e cDP com o grupo Controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Média ($\pm$ Desvio-Padrão) dos dados relativos ao exame físico

	DMdDisDP	DMcDisDP	DisDP	cDP	Controle
	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30
Peso (kg)	79.8 ($\pm$ 16.2)	83.2 ($\pm$ 12.3)	76.1 ($\pm$ 14.2)	76.2 ($\pm$ 22.1)	70.13 ($\pm$ 13.8)
Altura (m)	1.6 ($\pm$ 0.1)	1.6 ($\pm$ 0.1)	1.6 ($\pm$ 0.1)	1.7 ($\pm$ 0.1)	1.68 ($\pm$ 0.1)
IMC (m/kg²)	30.5 ($\pm$ 5.2) ^{a,c}	31.4 ($\pm$ 4.1) ^{a,c}	28.4 ($\pm$ 3.8) ^c	27.3 ($\pm$ 6.4) ^c	24.5 ($\pm$ 3.5)
Proporção Cintura/Quadril (cm)	1.0 ($\pm$ 0.1) ^{a,c}	1.0 ($\pm$ 0.1) ^{a,c}	0.9 ($\pm$ 0.1) ^c	0.9 ($\pm$ 0.1) ^c	0.8 ($\pm$ 0.07)
Circunferência Abdominal (cm)	104.3 ($\pm$ 14.6) ^c	109.3 ($\pm$ 10.8) ^{a,b,c}	98.1 ($\pm$ 9.9) ^c	98.2 ($\pm$ 16.9) ^c	87.5 ($\pm$ 10.6)

^a p<0.05 em relação ao grupo cDP; ^b p<0.01 em relação ao grupo DisDP; ^c p<0.05 em relação ao grupo Controle (Teste Kruskal-Wallis; α =5%).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos são descritos na Tabela 6. Em relação à glicemia de jejum e HbA_{1c}, foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o grupo DMdDisDP e demais grupos, e entre grupo DMcDisDP e os grupos sem DM (DisDP, cDP e Controle). A avaliação do Colesterol Total, LDL-colesterol e Triglicérides demonstrou resultados significativamente elevados nos grupos com Dislipidemia (DMdDisDP, DMcDisDP e DisDP) comparativamente aos grupos sem dislipidemia (cDP e Controle). Quanto aos níveis de insulina, os valores foram estatisticamente maiores nos grupos com DM2 (DMdDisDP e DMcDisDP) comparado aos pacientes cDP e Controle. A avaliação da Proteína C-reativa Ultra Sensível demonstrou resultados significativamente maiores para o grupo DMcDisDP quando comparado aos grupos de pacientes sem DM2.

Tabela 6 - Média ($\pm$ Desvio-Padrão) para parâmetros laboratoriais

	DMdDisDP	DMcDisDP	DisDP	cDP	Controle
	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30
Glicemia de Jejum	226.6 ($\pm$ 74.2) ^{a,b,c,d}	137.5 ($\pm$ 41.4) ^{b,c,d}	90.0 ($\pm$ 6.4)	90.8 ($\pm$ 7.3)	85.9 ($\pm$ 6.5)
HbA_{1c}	10.4 ($\pm$ 1.9) ^{a,b,c,d}	6.6 ($\pm$ 0.9) ^{b,c,d}	5.4 ($\pm$ 0.6)	5.1 ($\pm$ 0.6)	5.4 ($\pm$ 0.21)
Colesterol Total	242.7 ($\pm$ 37.8) ^{c,d}	243.4 ($\pm$ 42.9) ^{c,d}	246.1 ($\pm$ 42.3) ^{c,d}	171.6 ($\pm$ 18.5)	180.3 ($\pm$ 21.5)
HDL-colesterol	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)
LDL-colesterol	153.4 ($\pm$ 37.0) ^{c,d}	147.3 ($\pm$ 44.3) ^{c,d}	156.4 ($\pm$ 44.1) ^{c,d}	103.8 ($\pm$ 17.4)	113.5 ($\pm$ 18.1)
Triglicérides	216.9 ($\pm$ 94.6) ^{c,d}	249.8($\pm$ 104.1) ^{c,d}	194.1 ($\pm$ 80.6) ^{c,d}	93.9 ($\pm$ 35.9)	87.4 ($\pm$ 27.6)
Insulina	19.7 ($\pm$ 20.9) ^{c,d}	21.1 ($\pm$ 21.5) ^{c,d}	12.6 ($\pm$ 8.5)	11.1 ($\pm$ 12.7)	7.1 ($\pm$ 4.3)
Proteína C-Reativa	0.5 ($\pm$ 0.5)	0.7 ($\pm$ 0.6) ^{b,c,d}	0.4 ($\pm$ 0.4)	0.4 ($\pm$ 0.6)	0.3 ($\pm$ 0.5)

^a p<0.01 em relação ao grupo DMcDisDP; ^b p<0.01 em relação ao grupo DisDP; ^c p<0.05 em relação ao grupo cDP; ^d p< 0.01 em relação ao grupo Controle (Teste de Kruskal-Wallis; α =5%).

c) Avaliação periodontal

Em relação aos parâmetros periodontais, dentre todos os grupos, foi observado que o grupo DMdDisDP apresentou maior índice de sangramento marginal, maior profundidade de sondagem, maior perda de nível de inserção e maior número de sítios com supuração. Já o grupo DMcDisDP apresentou diferença significativa em relação à presença de sítios mais profundos ($\geq 6\text{mm}$) quando comparado aos grupos sem DM (DisDP, cDP e Controle). Todos os grupos com DP apresentaram diferença significativa entre todos os parâmetros clínicos periodontais, excetuando-se supuração, em comparação ao grupo Controle (Tabela 7).

Tabela 7 - Média ($\pm$ Desvio-Padrão) dos parâmetros clínicos periodontais

	DMdDisDP n=30	DMcDisDP n=30	DisDP n=30	cDP n=30	Controle n=30
Número de dentes *	22.3 ($\pm$ 4.2) ^d	21.6 ($\pm$ 4.5) ^d	23.2 ($\pm$ 3.8) ^d	24.3 ($\pm$ 3.1) ^d	27.1 ($\pm$ 1.8)
IPV (% sítios)	76.5 ($\pm$ 17.4) ^{c,d}	69.8 ($\pm$ 13.0) ^d	70.1 ($\pm$ 15.7) ^d	60.8 ($\pm$ 17.4) ^d	14.8 ($\pm$ 6.2)
ISM (% sítios)	60.9 ($\pm$ 15.2) ^{a,b,c,d}	46.9 ($\pm$ 15.9) ^d	40.4 ($\pm$ 14.8) ^d	41.3 ($\pm$ 12.9) ^d	8.7 ($\pm$ 4.8)
SS (% sítios)	69.3 ($\pm$ 12.8) ^{a,b,c,d}	53.9 ($\pm$ 13.8) ^d	53.0 ($\pm$ 13.7) ^d	51.4 ($\pm$ 13.2) ^d	12.7 ($\pm$ 5.6)
PS (mm)	4.1 ($\pm$ 0.5) ^{a,b,c,d}	3.7 ($\pm$ 0.6) ^d	3.4 ($\pm$ 0.5) ^d	3.7 ($\pm$ 0.4) ^d	2.1 ($\pm$ 0.2)
PS $\leq$ 3mm (% sítios)	43.3 ($\pm$ 14.8) ^{a,b,c,d}	57.0 ($\pm$ 15.0) ^d	61.9 ($\pm$ 14.0) ^d	53.3 ($\pm$ 12.5) ^d	98.8 ($\pm$ 1.5)
PS 4-5mm (% sítios)	31.9 ($\pm$ 11.6) ^{c,d}	31.0 ($\pm$ 11.0) ^{c,d}	31.0 ($\pm$ 10.6) ^{c,d}	41.0 ($\pm$ 10.0) ^d	1.2 ($\pm$ 1.5)
PS $\geq$ 6mm (% sítios)	24.8 ($\pm$ 15.9) ^{a,b,c,d}	12.0 ($\pm$ 10.8) ^{b,c,d}	7.0 ($\pm$ 10.6) ^d	5.7 ($\pm$ 5.9) ^d	0.0 ($\pm$ 0.0)
NI (mm)	4.4 ($\pm$ 0.7) ^{a,b,c,d}	3.9 ($\pm$ 0.7) ^d	3.6 ($\pm$ 0.5) ^d	3.8 ($\pm$ 0.4) ^d	2.2 ($\pm$ 0.2)
NI $\leq$ 2mm (% sítios)	13.1 ($\pm$ 8.8) ^{b,d}	16.5 ($\pm$ 15.1) ^d	24.8 ($\pm$ 16.2) ^{c,d}	10.3 ($\pm$ 10.0) ^d	64.5 ($\pm$ 13.9)
NI 3-4mm (% sítios)	39.8 ($\pm$ 15.3) ^{b,c}	48.8 ($\pm$ 14.2) ^{c,d}	51.6 ($\pm$ 10.7) ^d	61.3 ($\pm$ 10.0) ^{b,d}	35.5 ($\pm$ 13.9)
NI $\geq$ 5mm (% sítios)	47.1 ($\pm$ 16.2) ^{a,b,c,d}	34.7 ($\pm$ 17.6) ^{b,d}	23.8 ($\pm$ 14.0) ^d	28.4 ($\pm$ 10.5) ^d	0.0 ($\pm$ 0.0)
Supuração (nº sítios)	6.8 ($\pm$ 7.0) ^{a,b,c,d}	4.0 ($\pm$ 3.3) ^d	2.0 ($\pm$ 3.0)	2.0 ($\pm$ 3.7)	0.0 ($\pm$ 0.0)

IPV: índice de placa visível; ISM: índice de sangramento marginal; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção. *ns-diferença não significativa (Teste Kruskal Wallis; $\alpha=5\%$); DP = desvio-padrão; ^a $p<0.05$ em relação ao grupo DMcDisDP; ^b $p<0.05$ em relação ao grupo DisDP; ^c $p<0.05$ em relação ao grupo cDP; ^d $p<0.01$ em relação ao grupo Controle.

5.2 Análise da expressão gênica

Pode-se observar por meio das Figuras 5 e 6, que mostra um único pico na curva de dissociação, que todos os primers empregados neste estudo promoveram a amplificação específica do gene alvo. Após a análise estatística da expressão gênica dos genes de interesse normalizados para o gene *GAPDH*, os resultados foram organizados nos gráficos de coluna.

Figura 5 - Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente à Temperatura de *Melting* do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade de cada par de primers (via de sinalização do gene *IL10*).

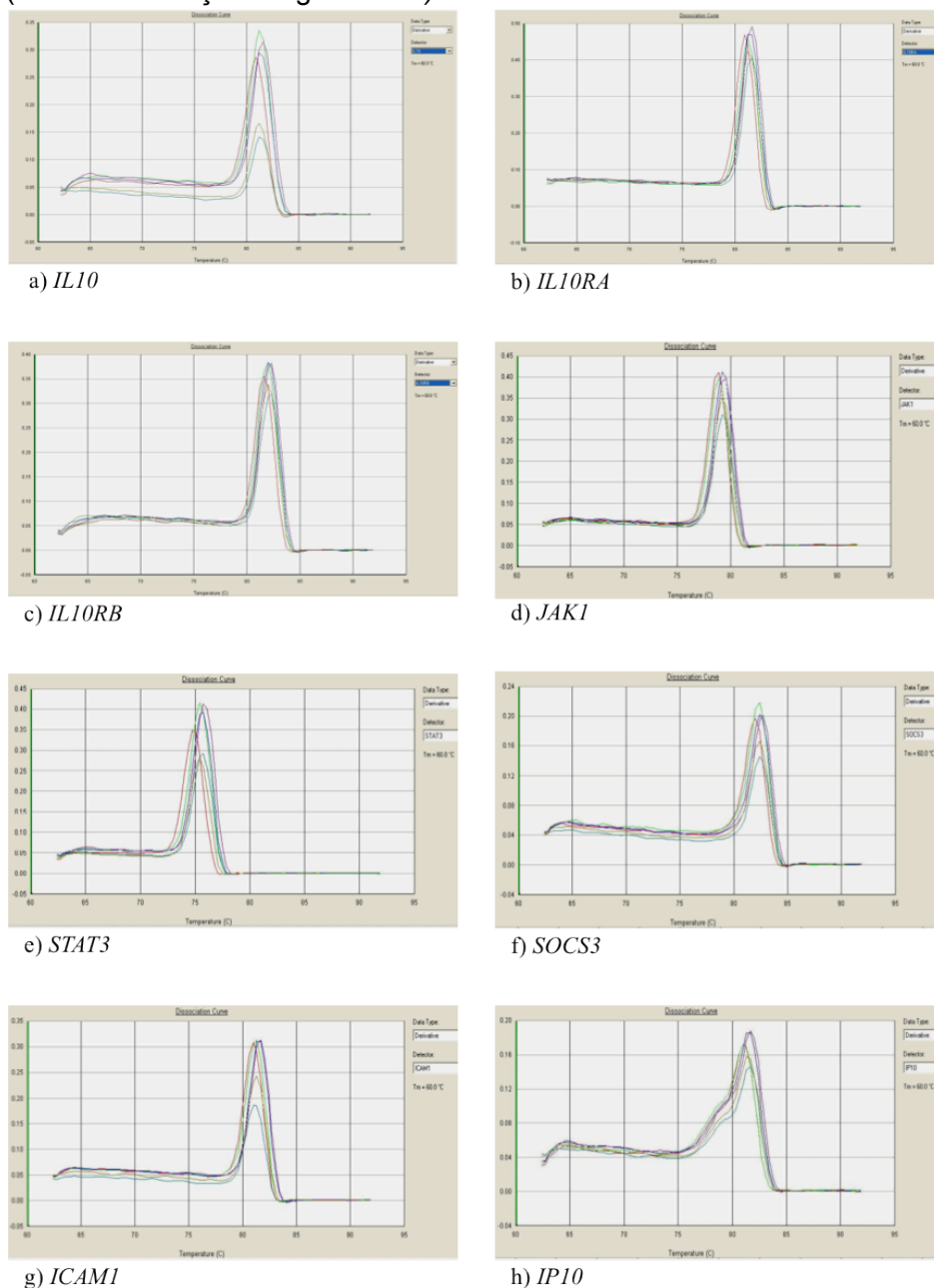
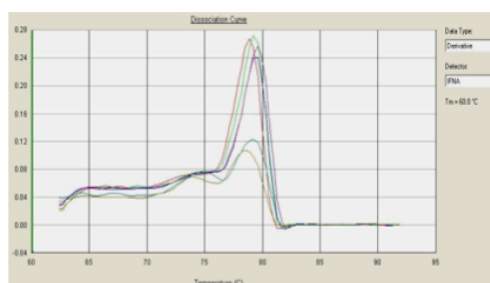
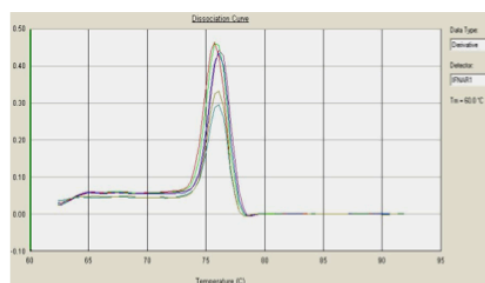


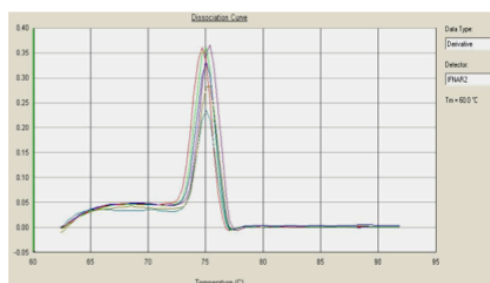
Figura 6 - Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente à Temperatura de *Melting* do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade de cada par de primers (vias de sinalização dos genes *IFNA* e *IFNG*).



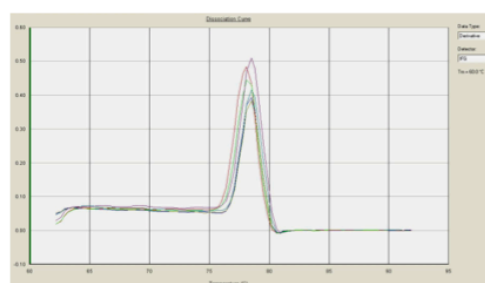
a) *IFNA*



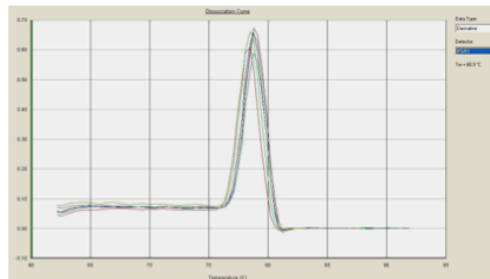
b) *IFNAR1*



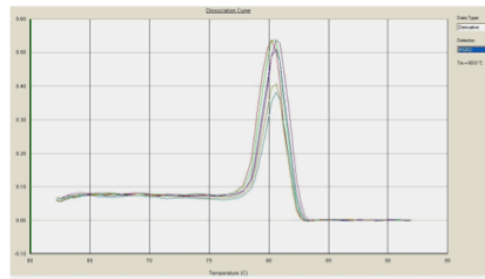
c) *IFNAR2*



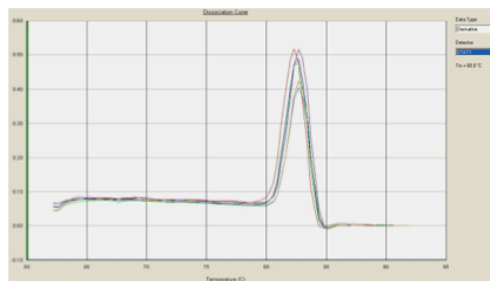
d) *IFNG*



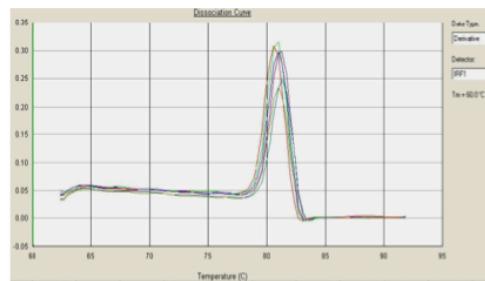
e) *IFNGR1*



f) *IFNGR2*



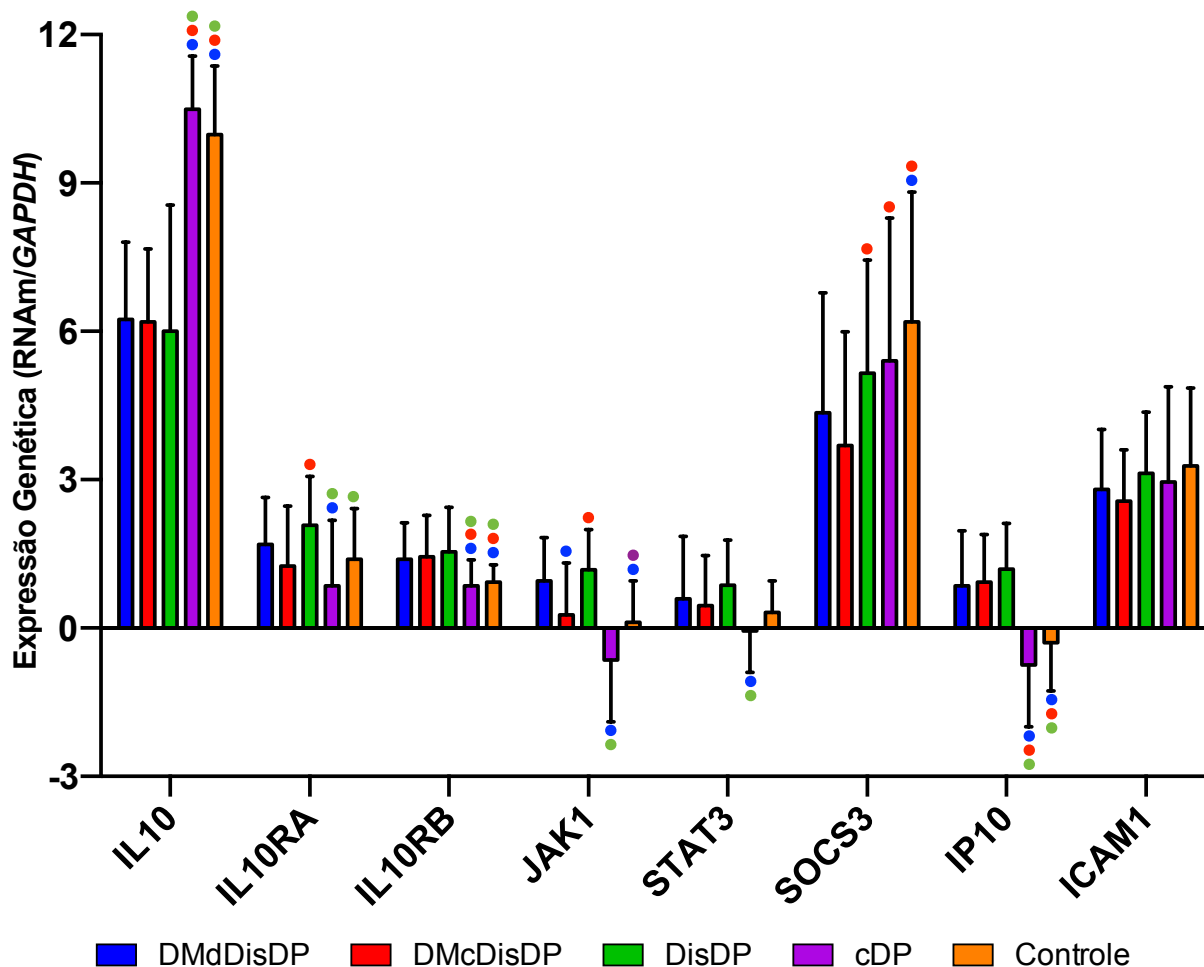
g) *STAT1*



h) *IRF1*

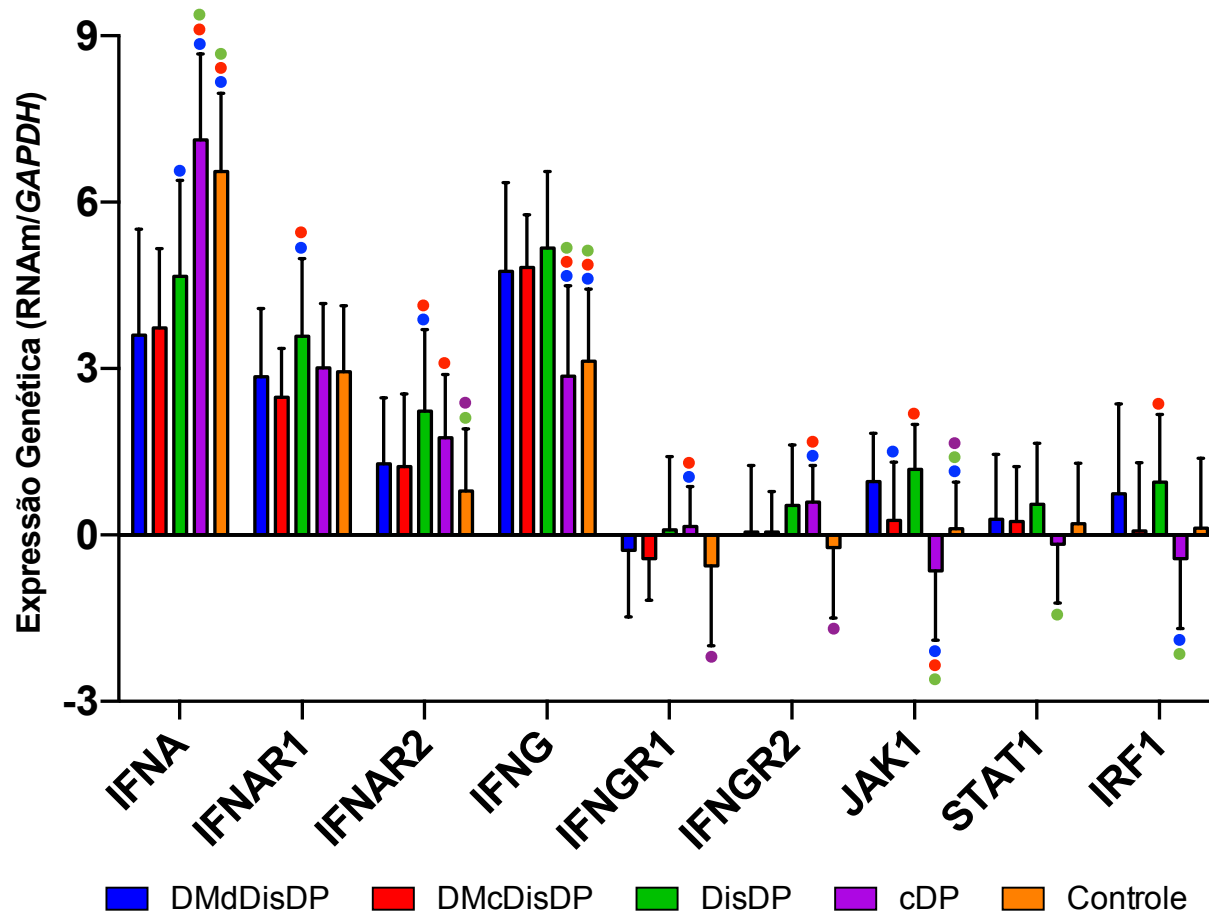
Foi observado que o gene *IL10* foi significativamente mais expresso em pacientes sem Dislipidemia (grupos cDP e Controle). O oposto ocorreu com os genes *IL10RB* e *IP10*, que foram significativamente menos expressos nos grupos sem Dislipidemia. *IL10RA* foi mais expresso no grupo DisDP. Os genes *JAK1* e *STAT3* expressaram-se de forma concordante, tendo sido mais expressos no grupo DisDP, seguido pelos grupos DMdDisDP, DMcDisDP, Controle e cDP. Além disso, foi observada uma expressão estatisticamente maior de *SOCS3* em pacientes sem Dislipidemia (cDP e Controle) quando comparado a pacientes com DM2 compensados (DMcDisDP); também o grupo Controle expressou mais em comparação ao grupo com DM2 descompensados (DMdDisDP). Nenhuma diferença de expressão entre os grupos foi observada para o gene *ICAM1* (Figura 7).

Figura 7 - Via de sinalização gene *IL10*. Expressão dos genes *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* nos Grupos DMdDisDP, DMcDisDP, DisDP, cDP e Controle. Todos os valores foram normalizados para *GAPDH*. Dados representam a média±DP. • $p<0,05$ em relação ao grupo DMdDisDP; • $p<0,05$ em relação ao grupo DMcDisDP; • $p<0,05$ em relação ao grupo DisDP; • $p<0,05$ em relação ao grupo cDP.



Na via de sinalização dos genes *IFNA* e *IFNG*, foi observado que o gene *IFNG* expressou mais nos grupos de pacientes com Dislipidemia em comparação aos grupos cDP e Controle. O oposto ocorreu com o gene *IFNA*, que expressou estatisticamente mais nos grupos de pacientes sem Dislipidemia quando comparado aos grupos com tal doença; além disso, o grupo DisDP expressou mais *IFNA* que o grupo DMdDisDP. O padrão de expressão dos genes *IFNGR1* e *IFNGR2* foi parecido, no qual os grupos cDP e DisDP foram os mais expressos e o grupo Controle, o menos expresso. Os genes *JAK1* e *STAT1* expressaram-se também com um padrão concordante, com maior expressão no grupo DisDP, seguido pelos grupos DMdDisDP, DMcDisDP, Controle e cDP. O gene *IRF1* comportou-se de forma muito semelhante aos genes *JAK1* e *STAT1*, diferenciando-se apenas pelo fato do grupo Controle ter expresso mais que o DMcDisDP (Figura 8).

Figura 8 - Via de sinalização genes *IFNA* e *IFNG*. Expressão dos genes *IFNA*, *IFNAR1*, *IFNAR2*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *JAK1*, *STAT1* e *IRF1* nos Grupos DMdDisDP, DMcDisDP, DisDP, cDP e Controle. Todos os valores foram normalizados para *GAPDH*. Dados representam a média $\pm$ DP. • $p < 0,05$ em relação ao grupo DM dDisDP; • $p < 0,05$ em relação ao grupo DMcDisDP; • $p < 0,05$ em relação ao grupo DisDP; • $p < 0,05$ em relação ao grupo cDP.



5.3 Análise de correlação ajustada

As correlações entre exames físicos e parâmetros laboratoriais com os parâmetros clínicos periodontais foram avaliadas e os resultados são apresentados na Tabela 8. Foi possível verificar uma correlação positiva entre os diversos parâmetros físicos (peso, IMC, proporção cintura/quadril e circunferência abdominal), perfil glicêmico (glicemia de jejum e HbA1c) e perfil lipídico (colesterol total e LDL-colesterol) com parâmetros clínicos periodontais (IPV, ISM, SS). Houve ainda associação negativa dos parâmetros mencionados com a porcentagem de sítios com PS $\leq$ 3mm. Não houveram importantes dados de correlação entre Proteína C-reativa e parâmetros clínicos periodontais. LDL-colesterol, glicemia de jejum e principalmente HbA1c apresentaram correlação positiva com supuração, sendo esta associação com HbA1c a correlação mais forte observada ($r = 0,58$, $p < 0,05$). Mesmo que não possamos inferir relações causais por correlações, os resultados observados entre os marcadores de Diabetes e Dislipidemia parecem indicar que um pior perfil lipídico e glicêmico parecem contribuir para o agravamento da DP. As associações positivas entre marcadores de Diabetes e Dislipidemia e os parâmetros clínicos periodontais associados à severidade e progressão da DP sugerem um papel importante para a presença de DM2 descompensado metabolicamente e Dislipidemia no agravamento da DP.

Tabela 8 - Correlação ajustada (para sexo e idade) entre Exames Físicos e Parâmetros Laboratoriais e Parâmetros Clínicos Periodontais

Exames Físicos										
	IPV (% sítios)	ISM (% sítios)	SS (% sítios)	PS ≤ 3mm (% sítios)	PS 4-5mm (% sítios)	PS ≥ 6mm (% sítios)	NI ≤ 2mm (% sítios)	NI 3-4mm (% sítios)	NI ≥ 5mm (% sítios)	Supuração (nº sítios)
Peso (Kg)	0,19	0,19	0,20	-0,20	0,26	0,04	-0,26	0,21	0,12	-0,12
IMC (kg/m²)	0,29	0,28	0,30	-0,28	0,32	0,11	-0,32	0,18	0,21	-0,03
Proporção Cintura/ Quadril (cm)	0,42	0,39	0,40	-0,42	0,40	0,24	-0,43	0,18	0,35	0,12
Circunferência Abdominal (cm)	0,33	0,34	0,34	-0,32	0,37	0,11	-0,37	0,22	0,24	-0,02
Parâmetros Laboratoriais										
Glicemia de Jejum	0,33	0,50	0,48	-0,39	0,19	0,46	-0,32	-0,11	0,46	0,49
HbA1c	0,33	0,49	0,44	-0,40	0,10	0,56	-0,25	-0,26	0,50	0,58
Colesterol Total	0,40	0,33	0,30	-0,21	0,07	0,27	-0,18	-0,09	0,30	0,22
LDL-colesterol	0,33	0,28	0,19	-0,23	0,14	0,25	-0,15	-0,09	0,24	0,14
Proteína C-Reativa	0,14	0,09	0,13	-0,07	0,15	-0,03	-0,19	0,22	0,03	-0,01

IPV: índice de placa visível; ISM: índice de sangramento marginal; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção.
■ Correlação negativa p < 0,05; ■ Correlação positiva p < 0,05 (r: Coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman; α= 5%)

Tabela 9 - Correlação ajustada (para sexo e idade) entre Expressão Gênica e Exames Físicos e Parâmetros Laboratoriais

	Exames Físicos			Parâmetros Laboratoriais				
	IMC (kg/m²)	Proporção Cintura/ Quadril (cm)	Glicemia de Jejum	HbA1c	Colesterol Total	LDL- colesterol	Triglicérides	
IL10	-0,18	-0,21	-0,31	-0,31	-0,51	-0,41	-0,29	
IFNA	-0,27	-0,25	-0,36	-0,41	-0,37	-0,29	-0,36	
IFNG	0,07	0,19	0,34	0,19	0,39	0,27	0,31	
SOC33	-0,09	-0,22	-0,19	-0,14	-0,22	-0,20	-0,07	
IP10	0,11	0,23	0,23	0,23	0,50	0,41	0,38	
JAK1	0,13	0,13	0,24	0,21	0,36	0,27	0,30	
STAT1	0,09	0,06	0,03	0,03	0,15	0,12	0,22	
STAT3	0,08	0,06	0,06	0,10	0,22	0,17	0,26	

■ Correlação negativa p< 0,05; ■ Correlação positiva p< 0,05 (r: Coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman; α= 5%)

A expressão gênica foi correlacionada significativamente tanto com parâmetros do exame físico como parâmetros laboratoriais associados ao perfil glicêmico e lipídico (Tabela 9). Houve correlações negativas relevantes entre os genes *IL10* e *IFNA* com todos os parâmetros de exame físico e laboratoriais, principalmente colesterol total (para *IL10*, $r = -0,51$, $p < 0,05$). Por outro lado, os genes *IFNG* e *IP10* apresentaram uma correlação positiva independente com proporção cintura/quadril e todos os parâmetros laboratoriais, principalmente colesterol total (para *IP10*, $r = 0,50$, $p < 0,05$). O gene *SOCS3* correlacionou-se negativamente tanto com proporção cintura/quadril, como com glicemia de jejum, colesterol total e LDL-colesterol. *JAK1*, *STAT1* e *STAT3* não apresentaram correlação significativa com nenhum parâmetro físico, porém *JAK1* apresentou correlação positiva com todos parâmetros laboratoriais apresentados na tabela, *STAT1* com triglicérides e *STAT3* com colesterol total e triglicérides.

Foram realizadas também as correlações da expressão genética com os parâmetros clínicos periodontais (Tabela 10). Houve correlação negativa entre a expressão de *IL10* e *IFNA* com os parâmetros clínicos periodontais IPV, ISM, SS, PS ≥ 6 mm, NI ≥ 5 mm e supuração. Por outro lado, houve uma correlação positiva entre *IFNG* e IPV e SS, assim como entre *IP10* e IPV, ISM e NI ≥ 5 mm. Observando os resultados de correlação referente a PS ≤ 3 mm, PS 4-5mm e PS ≥ 6 mm, pode-se observar que conforme aumenta profundidade de sondagem diminui a expressão dos genes *IL10* e *IFNA*, apesar de alguns valores não se mostrarem significativos. O oposto foi observado em relação aos genes *IFNG* e *IP10*.

Tabela 10 - Correlação ajustada (para sexo e idade) entre Expressão Gênica e Parâmetros Clínicos Periodontais

	IPV (% sítios)		ISM (% sítios)		SS (% sítios)		PS ≤ 3mm (% sítios)		PS 4-5mm (% sítios)		PS ≥ 6mm (% sítios)		NI ≤ 2mm (% sítios)		NI 3-4mm (% sítios)		NI ≥ 5mm (% sítios)		Supuração (nº sítios)	
IL10	-0,40	-0,28	-0,30	0,19	-0,05	-0,27	0,15	0,09	-0,25	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23
IFNA	-0,27	-0,30	-0,27	0,15	0,04	-0,31	0,10	0,11	-0,21	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23	-0,23
IFNG	0,23	0,16	0,20	-0,18	0,13	0,17	-0,15	0,00	0,17	0,09	0,17	0,09	0,17	0,09	0,17	0,09	0,17	0,09	0,09	0,09
IP10	0,27	0,21	0,16	-0,08	-0,01	0,17	-0,06	-0,16	0,21	-0,04	-0,16	0,21	-0,04	-0,16	0,21	-0,04	-0,16	0,21	-0,04	-0,04

IPV: índice de placa visível; ISM: índice de sangramento marginal; SS: sangramento à sondagem; PS: profundidade de sondagem; NI: nível de inserção. ■ Correlação negativa $p < 0,05$; ■ Correlação positiva $p < 0,05$ (r: Coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman; $\alpha = 5\%$)

Tabela 11 - Correlação ajustada (para sexo e idade) entre as Expressões Gênicas

	IL10	IL10RA	IL10RB	JAK1	STAT1	STAT3	ICAM1	IRF1	SOC3	IP10	IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IFNA	IFNAR1	IFNAR2
IL10	1,00															
IL10RA	-0,05	1,00														
IL10RB	-0,22	0,47	1,00													
JAK1	-0,29	0,73	0,54	1,00												
STAT1	-0,05	0,59	0,68	0,54	1,00											
STAT3	-0,10	0,62	0,75	0,60	0,81	1,00										
ICAM1	0,15	0,41	0,45	0,16	0,65	0,72	1,00									
IRF1	-0,07	0,76	0,55	0,64	0,76	0,82	0,68	1,00								
SOC3	0,25	0,43	0,11	0,09	0,36	0,38	0,68	0,53	1,00							
IP10	-0,36	0,52	0,63	0,69	0,48	0,50	-0,04	0,46	-0,23	1,00						
IFNG	-0,33	0,27	0,25	0,44	0,15	0,08	-0,28	0,08	-0,34	0,56	1,00					
IFNGR1	0,15	0,08	0,02	0,03	-0,01	-0,04	0,00	-0,05	0,01	-0,03	0,44	1,00				
IFNGR2	0,18	0,06	0,00	0,04	0,02	-0,04	-0,07	-0,08	-0,02	-0,01	0,49	0,91	1,00			
IFNA	0,53	0,21	-0,13	-0,03	0,09	-0,01	0,14	0,04	0,30	-0,24	-0,01	0,50	0,50	1,00		
IFNAR1	0,09	0,34	0,03	0,30	0,16	0,11	0,12	0,20	0,17	0,05	0,44	0,80	0,74	0,60	1,00	
IFNAR2	0,05	0,31	0,06	0,24	0,18	0,14	0,18	0,24	0,21	0,04	0,39	0,79	0,75	0,55	0,87	1,00

■ Correlação negativa $p < 0,05$; ■ Correlação positiva $p < 0,05$ (r: Coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman; $\alpha = 5\%$)

Por último, os dados de expressão gênica foram correlacionados entre si (Tabela 11). Estranhamente, o gene *IL10* não apresentou correlação com seu receptor alfa (*IL10RA*) e apresentou correlação negativa com o receptor beta (*IL10RB*). O gene *IL10* correlacionou-se positivamente com *SOCS3* e negativamente com *IP10*, mas não com *ICAM1*. Ainda em relação ao gene *IL10*, ele apresentou correlação positiva com *IFNA* ($r = 0,53$, $p < 0,05$) e negativa com *IFNG* ($r = -0,33$, $p < 0,05$). Diferentemente do gene *IL10*, o gene *IFNA* mostrou correlação positiva com seus receptores (*IFNAR1* e *IFNAR2*). Além disso, *IFNA* evidenciou uma correlação positiva com *SOCS3* e negativa com *IP10*, assim como ocorreu com o gene *IL10*. O gene *IFNG* também demonstrou associação com seus dois receptores (*IFNGR1* e *IFNGR2*). Diferente de *IL10* e *IFNA* o gene *IFNG* correlacionou-se de maneira contrária com os genes *SOCS3* e *IP10*, com correlação negativa com o primeiro, e positiva com o segundo. *IFNG* também apresentou correlação negativa com *ICAM1*. Os dois receptores de cada gene se correlacionaram entre si: *IL10RA* e *IL10RB*; *IFNAR1* e *IFNAR2*; *IFNGR1* e *IFNGR2*. *JAK1*, *STAT1* e *STAT3* também mostraram correlação forte entre si. Curiosamente, *JAK1* correlacionou-se positivamente com *IFNG*, negativamente com *IL10* e não se correlacionou com *IFNA*.

6 DISCUSSÃO

Em vista da hipótese levantada neste estudo, investigamos a expressão dos genes das vias IL10, IFNA e IFNG em indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (compensados e descompensados), Dislipidemia e Doença Periodontal. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de expressão diferencial em função da presença das diferentes patologias. Além disso, tal expressão foi correlacionada com o perfil periodontal, físico e bioquímico dos pacientes.

As características demográficas desta pesquisa mostraram que pacientes pertencentes à raça/etnia branca tiveram melhor saúde periodontal do que os não-brancos (negros e pardos), como já observado na literatura ^{29, 66, 68}, incluindo a população brasileira ^{100, 177, 207, 221}. Pacientes não-brancos apresentaram maior prevalência e severidade de DP, destacando-se maior risco de perda de inserção periodontal $\geq 5\text{mm}$ ^{207, 221}. Acredita-se que este resultado pode estar associado a diferenças socioeconômicas da população ^{28, 29}.

A hiperglicemia e o DM contribuem de forma significativa para a morbidade e mortalidade prematura em todo o mundo ^{175, 222}. Entre os 60 pacientes diabéticos (compensados e descompensados) incluídos nesta pesquisa, mais de 50% destes apresentaram pelos menos uma complicação associada ao DM. De acordo com estudos epidemiológicos realizados no Brasil, estima-se que cerca de 7% dos pacientes com DM tenham uma ou mais das seguintes complicações: úlceras de pé diabético, amputação, doença renal e alterações de fundo de olho ²⁵. Assim como observado em nossa pesquisa, estudos epidemiológicos tem observado que o diabetes é responsável por uma quantidade considerável de morbidade,

principalmente atribuível a complicações microvasculares, destacando-se a retinopatia^{7, 13, 139, 175}. Uma revisão sistemática demonstrou que a prevalência de retinopatia diabética em estudos clínicos variam entre 7,0 e 62,4%³⁴. Devido ao atraso comum no diagnóstico de diabetes, a retinopatia está presente em 21-25% dos pacientes com DM2 no momento do diagnóstico inicial, podendo chegar a 40% ao analisarem-se o total de pacientes com DM2^{25, 139}. Neste estudo a segunda complicação mais decorrente foi a nefropatia, o que condiz com a literatura que afirma que a nefropatia é uma complicação comum com uma frequência um pouco menor do que a retinopatia²⁵. Apesar de nefropatia diabética aumentar o risco de mortalidade, as estimativas sobre a prevalência desta complicação é escassa²²². Estima-se que pelo menos um terço dos brasileiros com DM2 são afetados pela nefropatia¹⁵¹.

Nathan et al. (2005), relataram em estudo prospectivo longitudinal com 17 anos de acompanhamento, que pacientes diabéticos com bom controle glicêmico (compensados) aprestaram 57% menos complicação sistêmica¹⁵⁵. Em nosso estudo, observamos que pacientes diabéticos descompensados apresentaram mais de uma complicações sistêmica quando comparado aos pacientes compensados.

O tratamento atual do DM2, baseia-se na intervenção do estilo de vida e uso de medicamentos antidiabéticos¹⁴⁶. As recomendações para a alteração de estilo de vida por meio de dieta saudável e aumento da atividade física têm sido o alicerce para o tratamento de DM2, mas terapias adicionais podem ser necessárias⁸⁶. A grande maioria dos pacientes inclusos nesta pesquisa faziam uso de hipoglicemiantes, sendo estes os principais medicamentos para controle do DM2. Cuidados especiais devem ser

tomados para tratar pacientes com DM2 contra fatores de risco para complicações macrovasculares, principalmente hipertensão ¹⁴⁶.

De acordo com a classificação do grau de obesidade sugerido pela OMS ²³⁸, neste estudo os grupos com DM2 (Grupos DMdDisDP e DMcDisDP) são classificados em obesidade grau I (leve), os grupos sem DM2 porém com DP (DisDP e cDP) em sobrepeso e o grupo Controle em Saudável. Além do aumento da expectativa de vida e maior sobrevida dos pacientes com DM2, o sobrepeso e a obesidade têm sido fundamentais para a expansão acentuada da epidemia de diabetes. Segundo a OMS (2011), a prevalência de obesidade triplicou nas últimas duas décadas ²³⁸. Vários estudos relataram a associação independente do peso elevado com diabetes ^{139, 175, 222, 238}. Em estudos realizados na Europa (2013) a média do IMC aumentou de 26,6kg/m² para 28,6kg/m² e a média da circunferência abdominal de 87,2cm para 94,5cm ²⁰². Dentre os principais fatores de risco determinados pela ADA para teste de Diabetes em indivíduos adultos assintomáticos ¹⁴, destaca-se o IMC > 25kg/m², ou seja, todos os grupos desta pesquisa que apresentam DP são considerados pacientes de risco para DM. Já foi encontrada, em estudos anteriores, uma relação entre a redução do número de dentes e a obesidade, provocada dentre outros fatores, pela DP em pacientes obesos ^{83, 169}. Estudos têm descrito uma associação entre a DP e o aumento do IMC ^{39, 101, 194}, e também aumento da circunferência abdominal ¹⁸⁷. Em concordância, nós observamos no presente estudo correlação entre o aumento do peso, IMC, proporção cintura / quadril e circunferência abdominal com o aumento de IPV, ISM, SS, PS e maior perda dos NI. Ou seja, o aumento dos fatores relacionados à obesidade foram correlacionados ao aumento dos fatores relacionados à severidade da DP.

Os grupos DMdDisDP e DMcDisDP são de pacientes com DM2 e, segundo a classificação da OMS (2011) ²³⁸, são considerados como Obesos grau 1. A obesidade e o DM2 podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de complicações cardiovasculares ^{32, 88}. A Proteína C-reativa (PCR) é considerada um marcador extremamente sensível da inflamação sistêmica, e um poderoso preditor de doenças cardiovasculares ^{176, 242}. Os níveis elevados de PCR já foram descritos em indivíduos com DM2 ^{47, 123, 183, 215}. Em um estudo de Fronczyk et al. ⁸⁴ (2013), os resultados obtidos indicaram que o fator mais importante na determinação de um aumento da concentração de PCR é o elevado IMC e a presença de DM2, embora as complicações vasculares e o grau de controle glicêmico não mostrem nenhuma correlação significativa com este parâmetro inflamatório. Estes resultados corroboram com nosso estudo, já que os pacientes com DM2 também possuem elevado IMC, indicando que tais pacientes correm risco de desenvolver doença cardiovascular. Além disso, pacientes dos dois grupos com DM2 possuem maior taxa de PCR, em comparação aos grupos sem DM2. Porém, o valor de PCR só foi estatisticamente significativo na comparação entre o grupo DMcDisDP com grupos sem DM. Como já mencionado, o que influencia na taxa de PCR não é o controle glicêmico e sim a presença do DM2 e o IMC ⁸⁴, sendo assim, pode ser que o valor de PCR tenha sido significativo apenas para o grupo compensado pelo fato de possuir IMC maior que o grupo descompensado.

Muitos estudos indicam que a Periodontite possa causar uma carga inflamatória por meio da produção de mediadores inflamatórios locais que entram na circulação sistêmica. Nestes estudos, esta carga inflamatória é evidenciada pelo aumento de PCR

no sangue de pacientes que sofrem de Periodontite^{48, 51, 131, 160, 181, 196}. Entretanto, em nosso estudo, apesar do grupo Controle apresentar uma taxa de PCR ligeiramente inferior ao grupo cDP, esta diferença não foi significativa, mesmo o grupo cDP apresentando IMC estatisticamente superior ao grupo Controle, da mesma forma como já observado por outros estudos⁴⁶. Além disso, não houve correlação significativa do PCR com os parâmetros periodontais avaliados no nosso estudo.

A literatura científica revela fortes indícios de que o Diabetes é um fator de risco para Gengivite e Periodontite, e o nível de controle glicêmico parece ser um determinante importante nesta relação^{41, 49, 140, 219}. Uma meta-análise concluiu que a maioria dos estudos demonstrou uma condição periodontal mais grave em adultos diabéticos do que em adultos sem doença. Estes estudos incluíram mais de 3.500 adultos diabéticos e demonstrou claramente uma associação significativa entre Periodontite e Diabetes¹⁷³. Em nosso estudo, pacientes diabéticos descompensados apresentaram significante maior ISM, SS, PS e perda NI avançada ($\geq 6\text{mm}$), assim como maior número de sítios com supuração, quando comparado a todos os outros grupos. Assim como neste estudo, outros observaram correlação entre a descompensação e os níveis de HbA1c e glicemia de jejum com a prevalência e severidade da DP^{80, 229}. Contrariamente, outros estudos encontraram fraca ou nenhuma correlação entre controle glicêmico e saúde periodontal, mas a maioria deles incluíram populações mais jovens, que geralmente têm menor prevalência de DP^{33, 55, 201}.

Como já mencionado anteriormente, o grupo de pacientes com DM2 descompensados desta pesquisa apresentaram maior número de sítios com supuração, o que está correlacionado à maior presença de abscessos periodontais, quando

comparado aos demais grupos. Este resultado está em concordância com a literatura ^{8, 230}. Devemos destacar que em nossas análises de correlação, observamos que quanto maior a glicemia de jejum e HbA1c, maior o número de sítios com supuração.

Resultados conflitantes sobre a relação entre os níveis de IL-10 no sangue e a expressão de *IL10* com a obesidade têm sido relatados. No estudo de Esposito et al.⁷⁰ (2003), os níveis circulantes de IL-10 foram significativamente maior nas pacientes obesas do que nas pacientes não-obesas (mediana 2,45 vs. 1,2 pg/mL, $P= 0,04$). No tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos, a expressão de *IL10* foi aumentada quase o dobro, em comparação com indivíduos não-obesos ¹²². Além disso, já foi observado que não só os níveis de IL-10 encontram-se aumentados em indivíduos obesos, como também já foi observada uma associação positiva entre os níveis de IL-10 e peso, IMC e proporção cintura/quadril. Isso discorda do nosso presente estudo em que foi observado que o aumento da expressão de *IL10* estava correlacionado à redução do IMC e da proporção cintura/quadril ²². No entanto, em outro estudo, a concentração sanguínea de IL-10 foi significativamente reduzida em mulheres obesas (mediana 1,8 vs 4,1 pg/mL, $P < 0,0001$ em mulheres com obesidade vs. mulheres não-obesas) ¹³⁷. Em nosso estudo, os pacientes considerados obesos (Grupos DMdDisDP e DMcDisDP) expressaram estatisticamente menos *IL10* do que pacientes não-obesos (Grupo Controle). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos que encontram-se com sobrepeso (DisDP e cDP), no qual o grupo com Dislipidemia expressou menos *IL10* do que o grupo sem esta doença. Estes resultados conflitantes sugerem que outros fatores, como fatores genéticos, fatores ambientais,

além de outras condições sistêmicas, possam afetar a relação entre a expressão de *IL10* e a obesidade.

Excel et al.²³² (2002), verificaram que as concentrações séricas de colesterol total, LDL, triglicerídeos, glicose e HbA1c diminuíram gradualmente à medida que aumentou a produção de IL-10, enquanto que a concentração de HDL aumentou gradualmente ($p < 0,01$). A expressão do gene *IL10* em nossa pesquisa apresentou resultados similares. Com o aumento das concentrações séricas de colesterol total, LDL, triglicerídeos, glicemia de jejum e HbA1c, diminuiu-se a expressão de *IL10*, como observado pela correlação ajustada. Além disso, notou-se concordância dos nossos resultados que mostram menor expressão de *IL10* em pacientes com DM2.

Estudos recentes mostram que a IL-10 tem um forte impacto não só no DM2, mas também sobre o metabolismo do colesterol, estimulando a absorção de colesterol, reduzindo sua concentração sérica^{104, 105}. Em estudo de modelo animal, a inibição endógena da IL-10, aumentou a expressão das citocinas pró-inflamatórias, provocou significativo prejuízo na transdução do sinal da insulina, assim como estimulou a sinalização hepática de proteínas envolvidas na gliconeogênese e lipogênese⁴⁴. A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma desordem monogênica que é caracterizada pela concentração sérica significativamente elevada de colesterol a partir do nascimento, gerando um quadro de Dislipidemia¹⁶⁸. Em um estudo que analisou os níveis séricos de IL-10 em crianças com e sem HF por um período relativamente longo, descobriram que as crianças com HF tinham níveis significativamente mais baixos de IL-10 em comparação com crianças sem a doença¹⁵³. Outro estudo observou que o consumo de uva aumenta a concentração de IL-10 no plasma apenas em indivíduos

que não apresentam Dislipidemia ²¹. De acordo com os pesquisadores, a Dislipidemia afeta a capacidade normal do organismo de produzir IL-10, por isto nestes pacientes o consumo de uva não promoveu aumento dos níveis plasmáticos de IL-10.

Tem sido demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α) induzem à hiperlipidemia ⁷⁴. No presente estudo, a análise dos dados demonstrou que o estado dislipidêmico pode ser o fator que favorece a redução da expressão do gene *IL10*, contribuindo para manutenção de um ambiente pró-inflamatório. Acreditamos que a alta carga de citocinas pró-inflamatórias geradas pelas descompensação metabólica sistêmica oriunda da Dislipidemia esteja reduzindo a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como o *IL10*. Além disso, é possível que os indivíduos com Dislipidemia possam ter baixa capacidade de expressão inata de *IL10*, dificultando a regulação do estado pró-inflamatória crônico. Isso concorda com os resultados de correlação do presente estudo, que sugerem que, quando os pacientes apresentam Dislipidemia (aumento de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos), a expressão de *IL10* tende a diminuir. Portanto, é possível inferir que se os níveis de IL-10 fossem maiores, isso poderia contribuir para o não desenvolvimento de um quadro de hiperlipidemia, regulando os efeitos de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 ^{44, 148}.

Assim como em outros estudos, neste trabalho a DP não influenciou na expressão de *IL10* sistêmico ^{46, 99}. Duarte et al. ⁶³ (2003), observaram que a expressão de *IL10* foi maior em pacientes com DP quando comparado a pacientes sem a doença. Já em pacientes com DM1 e DP foi menor a expressão comparado a pacientes sem as duas doenças em biópsia de tecido gengival. Em nossa pesquisa, o RNAm foi obtido de leucócitos do sangue, porém os resultados foram, em parte, parecidos ao estudo de

Duarte et al.⁶³ (2003). Em nossos resultados, apesar da expressão de *IL10* ter sido também maior em pacientes do grupo cDP quando comparado a pacientes sem a doença (grupo Controle), esta diferença foi estatisticamente não significativa. Além disso no grupo de pacientes com DM2 e DP (DMdDisDP e DMcDisDP), a expressão de *IL10* foi também menor do que no grupo sem as duas doenças (Controle). Por outro lado, interessante, nossos estudos mostram menores níveis de expressão de *IL10* correlacionados ao aumento na porcentagem de sítios com sangramento marginal, SS, além de PS e perda dos NI severas.

A interação das citocinas com receptores específicos de superfície celular desencadeia vias de transdução de sinal citoplasmáticas, que transmitem o sinal a partir da superfície da célula para o núcleo, o que resulta em alterações da transcrição. Muitas das proteínas associadas à transmissão destes sinais para o núcleo, foram identificadas, tais como JAK / STAT. As proteínas SOCS (supressores de sinalização de citocinas), foram recentemente identificadas como reguladores negativos das vias de transdução de sinal de citocinas²¹¹.

SOCS3 é um exemplo de gene responsivo à IL-10, o qual produz a proteína SOCS-3 que inibe a sinalização dependente de JAK / STAT, por impedir a fosforilação do STAT, inibindo a expressão de muitos genes pró-inflamatórios⁵⁹. O *IL10* tem a habilidade de rapidamente induzir a expressão de SOCS3^{1, 59, 236}. Portanto, a IL-10 e SOCS-3 atuam de forma a contribuir para a resposta anti-inflamatória, auxiliando o sistema imunológico a restabelecer a normalidade. Neste estudo, corroborando com a literatura, observou-se uma correlação positiva de SOCS3 com gene *IL10* (anti-inflamatório), e negativa com gene *IFNG* (pró-inflamatório).

Nesta pesquisa, os grupos com Dislipidemia (DMdDisDP, DMcDisDP e DisDP) foram os que expressaram menos *IL10* e *SOCS3*. Como já dito anteriormente, *IL10* induz rapidamente a expressão de *SOCS3*; talvez por isso *SOCS3* tenha sido menos expresso nestes três grupos. Para o gene *SOCS3* foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o grupo DMdDisDP e o Controle; e também entre o grupo DMcDisDP com os grupos DisDP, cDP e Controle. Em outros estudos, os níveis de *SOCS-3* encontraram-se elevados no músculo esquelético de pacientes com DM2 e em tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos ¹⁸⁹. Isso mostra que a expressão de *SOCS-3* pode estar aumentada tanto em pacientes com DM2 como em obesos. Entretanto, também já foi observado que na expressão de *SOCS3* em células de músculo esquelético de ratos ⁶⁵ e em células de fígado humano ⁶⁷ não havia significância funcional com a resistência à insulina e com a obesidade, respectivamente. Nossa pesquisa, encontrou correlação negativa entre a expressão de *SOCS3* com fatores relacionados ao perfil glicêmico (glicemia de jejum) e perfil lipídico (colesterol total e LDL-colesterol); assim como encontrado para *IL10*, demonstrando a inter-relação entre *IL10* e *SOCS3*, como consagrado na literatura ^{59, 147}.

O nível basal de expressão de *SOCS3* nas células é geralmente muito baixo, porém citocinas pró-inflamatórias podem estimular a produção de *SOCS3*, que por sua vez participa de um ciclo de *feedback* negativo na modulação da ação de citocinas. Estudos mostram que *IL-1 β* aumenta a expressão da citocina *SOCS-3*, e que este seja o possível mecanismo pelo qual *IL-1 β* reduza a produção de insulina em células beta pancreáticas e aumente também a resistência insulínica ⁶⁹. Além disso, já foi observado que *IFN- γ* , da mesma forma que a *IL-10*, induz uma rápida expressão de *SOCS3* em

monócitos ⁵⁹. Em nossa pesquisa, o gene *IFNG* foi expresso de forma oposta ao gene *IL10*, ou seja, *IFNG* foi mais expresso nos grupos com Dislipidemia (DMdDisDP, DMcDisDP e DisDP). Talvez mesmo o IL-10 podendo ter influenciado mais na expressão de *SOCS3*, a influência do IFN- γ pode fazer com que os resultados estatísticos para *SOCS3* não tenham sido semelhantes aos do *IL10*. É praticamente certo que outros fatores, como a ação de outros genes, além da presença de doenças sistêmicas, estejam envolvidos nos resultados encontrados para expressão de *SOCS3*.

A Proteína 10 induzível por Interferon- γ (IP-10, também chamada de CXCL10) foi inicialmente identificada como uma citocina que é induzida por IFN- γ e produzida por vários tipos de células. IFN- γ , seu sinergismo com citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , induzem a expressão do gene *IP10* ^{35, 147}. Em nossas análises o gene *IP10* apresentou correlação positiva com o gene *IFNG*. IL-10 é capaz de inibir a expressão de *IP10*, o que concorda com nosso achado de correlação negativa entre *IP10* e *IL10*. Isso ocorre porque IL-10 e IFN- γ competem por mecanismos intracelulares, e IL-10 provoca inibição da ativação de STAT1, na via de sinalização de IFN- γ . IP-10 é funcionalmente classificada como uma citocina pro-inflamatória, regulando a resposta imune por ativar o recrutamento de leucócitos, contribuindo para os danos teciduais ⁴. Além disso, IP-10 suprime a neo-vascularização ²¹³.

A expressão de *IP10* é elevada em células beta pancreáticas de indivíduos com DM2 ²⁰³. Além disso, IP-10 circula em níveis mais elevados em pacientes com DM2 do que em indivíduos sem a doença ¹⁹³. IP-10 tem sido também associada com a espessura do tecido adiposo visceral, obesidade, inflamação e distúrbios metabólicos ^{72, 73}. Nesses estudos, houve uma clara relação entre a concentração de IP-10 e a

presença de síndrome metabólica. Em concordância com esses estudos, em nossa pesquisa o gene *IP10* apresentou correlação positiva com parâmetros relacionados ao DM2 (glicemia de jejum e HbA1c) e Dislipidemia (colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides). Também concordando com a literatura, em nosso estudo o gene *IP10* expressou-se mais nos grupos de pacientes que apresentavam doenças que compõem a síndrome metabólica, destacando-se a Dislipidemia (Grupos DMdDisDP, DMcDisDP e DisDP).

A Molécula de Adesão Intercelular (ICAM-1) que participa do processo de adesão de leucócitos, é um importante marcador inflamatório, estando associada à disfunção endotelial, formação de placas de ateroma e doenças cardiovasculares ²⁴³. Assim como ocorre com *IP10*, *ICAM1* tem sua expressão estimulada por IFN- γ , e IL-10 é capaz de inibir sua expressão, fazendo parte dos genes induzidos por IFN- γ que tem sua expressão inibida por IL-10 ^{59, 147}. A correlação deste gene com *IFNG* foi estatisticamente positiva e compatível com a literatura. Um Modelo de regressão linear múltipla demonstrou associação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre a síndrome metabólica e níveis de ICAM-1 no sangue, após o ajuste para idade, sexo, fumo, uso de aspirina e terapia de reposição hormonal ⁵³. ICAM-1 também foi associada com o aumento da circunferência da cintura, redução do HDL e elevada glicemia de jejum e resistência insulínica ^{112, 116}. Além de doenças sistêmicas, já foi observado que os níveis plasmáticos de ICAM-1 encontram-se aumentados significativamente em pacientes com DP ¹⁸⁵. Em nosso estudo a expressão de *ICAM1* foi muito semelhante entre todos os grupos, ou seja, nenhuma das três doenças, aparentemente, influenciou na expressão deste gene.

O IFN- α é muito utilizado na forma de fármaco no tratamento de diversas doenças, como neoplasias hematológicas e hepatite B ^{9, 77, 206}. Estudos mostram que quatro semanas após o início do tratamento com IFN- α , os níveis de triglicérides aumentam severamente, gerando um quadro de Hipertrigliceridemia ^{9, 77}. IFN- α pode causar distúrbios dos níveis de lipídeos séricos através da redução da atividade de várias enzimas que são essenciais para o metabolismo lipídico, causando um quadro de Dislipidemia ²⁰⁶. Assim, pacientes obesos e com DM2 devem ser monitorados antes de iniciar tratamentos com IFN- α ⁹. Contudo, nossos resultados demonstram que a expressão de *IFNA* foi maior nos grupos sem Dislipidemia (cDP e Controle). Além disso, a expressão de *IFNA* correlacionou-se de forma negativa com LDL-colesterol e colesterol total.

Em um estudo mais recente com 575 pacientes, foi demonstrada que a capacidade de produção de IFN- α está significativamente correlacionada com a idade, o sexo, e a glicemia de jejum; mas não com o IMC, pressão arterial, ácido úrico, ou lipídios. A glicemia de jejum revelou ser um fator importante para produção de IFN- α , sugerindo que quanto maior o grau de hiperglicemia menor a produção de IFN- α ²²⁷. Em concordância, nosso estudo mostrou que não só a glicemia de jejum, como HbA1c correlacionaram-se negativamente de forma significativa com a expressão de *IFNA*. Estes dados coincidem com outra pesquisa que verificou uma redução da secreção de IFN- α por células dendríticas em pacientes com DM2 ²¹⁶. Talvez, seja devido a elevada hiperglicemia apresentada pelos pacientes com DM2 descompensados (DMdDisDP), que a expressão de *IFNA* foi estatisticamente menor que nos grupos sem DM2 (DisDP, cDP e Controle).

Interferon gama (IFN- γ) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias produzidas por células *Natural Killer* e células Th1, sendo estas responsáveis pela ativação de macrófagos e aumento na produção de IL-1 e TNF- α ^{114, 129, 130}. IFN- γ é necessário para ativação da resposta imune mediada por células T contra diferentes agentes patogênicos ¹³⁰. O IFN- γ é uma citocina associada à aterosclerose, sua ação ocorre através da ativação de macrófagos, com acúmulo de lipídios subsequente ¹⁵⁰.

Células Th1 e Th2 inibem-se reciprocamente; por exemplo IL-10 (citocina produzida por células Th2) inibe células Th1, e IFN- γ inibe a ativação de Th2 ²¹². A IL-10 além de inibir a produção de citocinas por células Th1, em particular o IFN- γ , ela também inibe a capacidade de proliferação destas células ^{78, 79, 111}. IL-10 é um potente inibidor da atividade de monócitos / macrófagos, incluindo o estresse oxidativo e a produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6 ^{91, 184}. TNF- α é um cofator importante para a indução da produção de IFN- γ por células Th1, e a capacidade de IL-10 em inibir a produção de TNF- α por monócitos e macrófagos tem sido um dos mecanismos pelo qual a IL-10 inibe a produção de IFN- γ ^{52, 235}. Nossos resultados concordam exatamente com esses resultados. Nos grupos onde houve menor expressão do gene *IL10* (DMdDisDP, DMcDisDP e DisP), foram onde o gene *IFNG* expressou-se mais. A relação oposta ocorreu para os grupos cDP e Controle. Também em concordância, *IL10* e *IFNG* apresentaram correlação negativa, mostrando que quanto mais *IL10* é expresso, mais ele pode estar inibindo a expressão de *IFNG*.

Estudos mostraram que altos níveis de IFN- γ está independentemente associado com a diminuição da sensibilidade insulínica ¹⁴³. Além disso, em ratos com DM2 a produção de IFN- γ por células do baço e rim, é maior do que em pacientes sem DM2

²⁰⁵. Outro estudo já concluiu que linfócitos de pacientes com Dislipidemia produzem mais IFN- γ do que pacientes sem a doença ¹⁶⁶. Estudos em ratos mostrou uma relação positiva entre Dislipidemia com expressão gênica de *IFNG* ¹⁹⁰. Também já foi observado que a concentração sérica de IFN- γ é maior em pacientes que apresentam síndrome metabólica, e que existe uma correlação positiva significativa entre os níveis de IFN- γ e glicemia de jejum ($r = 0.466$, $P < 0.001$). IFN- γ pode exercer a sua ação interferindo com a sinalização de insulina e a absorção de glicose estimulada por insulina, que pode eventualmente levar a resistência insulínica e Síndrome Metabólica ²¹⁸. Em colaboração a estes estudos, encontramos correlação positiva entre o gene *IFNG* e parâmetros do perfil glicêmico (glicemia de jejum e HbA1c) e perfil lipídico (colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides). Com estes resultados podemos observar que não somente a relação negativa *IL10* / *IFNG* influenciou na expressão do gene *IFNG*, mas também o DM2 e Dislipidemia. Assim como encontrado na literatura, os pacientes que apresentavam DM2 e/ou Dislipidemia (DMdDisDP, DMcDis DP e DisDP) expressaram mais *IFNG* do que os pacientes sistemicamente saudáveis (cDP e Controle). Assim, provavelmente a Dislipidemia seja o principal fator que leva ao aumento da expressão deste gene pró-inflamatório, pois os três grupos que expressaram maiores níveis de *IFNG*, tiveram uma expressão muito semelhante entre si, e a Dislipidemia é a única alteração sistêmica em comum aos três grupos.

O Fator Regulador 1 de Interferon (IRF-1) é responsável por regular a via de sinalização dos IFNs, e além disso, regula genes envolvidos na resposta imunitária, crescimento celular, apoptose, indução da expressão de iNOS e inflamação ^{81, 223}. Diversas citocinas como IFN- α , TNF- α , IL-1 e IL-6, mas principalmente o IFN- γ são

capazes de ativar a transcrição de *IRF1* ²²⁴. Levando em consideração o papel funcional do IRF-1, ele regula a expressão gênica do *IFNA*, mas sua produção é realizada pelo *IFNG* por meio de STAT1 ¹⁴⁵. Lehtonen *et al.* ¹²⁷, (1997) observaram que em macrófagos humanos a expressão de IRF1 foi 10 vezes maior após 1 hora de estímulo com IFN- α , e 25 vezes maior quando estimuladas com IFN- γ em comparação aos níveis basais. Em nosso estudo, os resultados foram, em parte, de acordo com o observado na literatura. Podemos observar que a expressão do *IRF1*, mesmo não sendo sempre estatisticamente significativa, foi maior nos grupos DMdDisDP e DisDP. Da mesma forma, o gene *IFNG* expressou-se mais nestes grupos, enquanto que para *IFNA*, gene regulado pelo IRF-1, a expressão foi menor. Porém, para o grupo DMcDisDP os resultados foram conflitantes e não concordantes com a literatura. Em ratos, IRF-1 induziu a insulite, uma inflamação das ilhotas de Langerhans do pâncreas, e o diabetes ¹⁵².

Da mesma forma que em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa ³⁸, os níveis de expressão entre os grupos foram semelhantemente observadas para *JAK1* e *STAT3*. Isto pode ser explicado pela associação biológica JAK-1 / STAT-3 no processo de sinalização celular ⁵⁹. Nossas análises mostraram correlação positiva entre os três genes: *IL10RB*, *JAK1* e *STAT3*. Em relação à expressão de *STAT3* e *JAK1*, enquanto que os níveis de mRNA do *IL10*, foram menores nos grupos com Dislipidemia (DMdDisDp, DMcDisDP e DisDP) em relação aos sem a doença (cDP e Controle), para os genes *STAT3* e *JAK1* ocorreu o oposto. Anteriormente, foi demonstrado que a ativação de STAT-3 é necessária, mas não suficiente para a via de sinalização de IL-10 ¹⁶³. Além disso, JAK-1 e STAT-3 também

são induzidos por outras citocinas, tais como IFN- γ (induz JAK-1) e IL-6 (induz STAT-3), potentes citocinas pró-inflamatórias^{54, 244}. Talvez por estes fatores, que *IL10* e *JAK1* tiveram correlação negativa, pois com o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, como o *IFNG*, tem-se uma redução da expressão de genes anti-inflamatórios, como o *IL10*. Neste estudo, a expressão superior observada dos genes *JAK1* e *STAT3* nos grupos com Dislipidemia (mesmo que não tenham sido estatisticamente significantes para todos os grupos), pode ser explicada pela exigência potencial destes dois genes após os estímulos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IFN- γ que estão normalmente presentes no sangue de pacientes comprometidos sistêmica e metabolicamente.

O presente estudo também investigou a expressão dos genes *STAT1*, uma vez que esta molécula juntamente com *JAK1* faz parte da via de sinalização de IFN- α e de IFN- γ . A expressão dos genes *JAK1* e *STAT1* foram previamente demonstradas ser significativamente aumentada em resposta à estimulação de células do sangue com IFN- α e IFN- γ ¹²⁹. Assim como ocorreu com *JAK1* / *STAT3*, os níveis de expressão entre os grupos foram semelhantemente observadas para *JAK1* e *STAT1*. Em confirmação, estes dois genes mostraram em nossa pesquisa correlação positiva. Não houve diferença estatística na expressão de *STAT1* entre os grupos. Por outro lado, a expressão de *STAT1* e *JAK1*, mesmo sem resultados estatisticamente significativos, mostraram-se mais elevados em indivíduos com Dislipidemia (DMdDisDP, DMcDisDP e DisDP). Interessantemente, notou-se que houve correlação significativa entre *JAK1* e colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides. Como já foi observado, pacientes com DM2 e Dislipidemia apresentam uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias no

sangue, como IL-6 e IFN- γ ^{74, 124}. Embora as proteínas STATs possam ser ativadas por diferentes ligantes, existem certas citocinas consideradas preferenciais para ativação destas proteínas. IFN- γ ativa preferencialmente STAT-1 através de JAK-1/JAK-2 e IL-6 ativa STAT-3 através de JAK-1 ²¹⁰. Talvez devido à presença de um maior grau de inflamação sistêmica, que a expressão de *JAK1* e *STAT1* foram ligeiramente maiores em pacientes com Dislipidemia.

Nas análises de expressão, podemos observar que a DP pareceu não influenciar na expressão sistêmica dos genes analisados. Com este estudo, questiona-se a possibilidade da DP influenciar de forma significativa, em nível sistêmico, a expressão de genes relacionados ao sistema imune, e consequentemente contribuir para o aparecimento de complicações no paciente. Entretanto, pelas correlações observadas, percebeu-se que a severidade da DP foi maior quanto: (i) pior o perfil lipídico e glicêmico; (ii) menor expressão de citocinas anti-inflamatórias; (iii) maior expressão de citocinas pró-inflamatórias. Acreditamos que a expressão destes genes no sangue possa influenciar diretamente no tecido periodontal, ou seja, as descompensações metabólicas geradas pelo DM2 e pela Dislipidemia podem afetar a progressão da DP.

Para muitos dos genes investigados (como por exemplo: *IL10*, *SOCS3*, *IP10*, *IFNA* e *IFNG*) não foram encontradas diferenças estatísticas de expressão entre os grupos de pacientes com DM2 descompensados e compensados. Nossos resultados sugerem que a expressão deste genes estudados, envolvidos na modulação da resposta inflamatória, ocorre independente do controle glicêmico do paciente. Talvez o que tenha influenciado mais é o fato de nos dois grupos, os pacientes possuírem Dislipidemia. Não foram encontrados na literatura trabalhos que pudessem ser

comparados a este, impossibilitando discutir nossos resultados à luz da literatura científica.

Embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas entre o grupo DisDP e o grupo cDP quanto aos parâmetros periodontais, os resultados de expressão gênica demonstram que os pacientes com Dislipidemia já apresentam uma alteração na expressão de genes de citocinas pró e anti-inflamatórias, como bem observado pelos genes *IL10* e *IFNG*, e esta alteração à longo prazo pode influenciar na progressão da DP.

O presente estudo tem algumas limitações como a falta de dados longitudinais de acompanhamento das doenças e a falta de dados quanto à quantificação proteica destas citocinas estudadas, como as citocinas IL-10, IFN- γ e IFN- α . No entanto, os nossos resultados sugerem que, embora não tenhamos dados concretos sobre esta questão, acreditamos que a combinação dos níveis elevados de mediadores inflamatórios (exemplo, IFN- γ) e diminuição dos níveis de mediadores anti-inflamatórios (como, IL-10) possa ser de grande importância para o início e progressão de doenças envolvidas na síndrome metabólica, como o Diabetes e a Dislipidemia. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel dos IFNs e IL-10 nestas doenças.

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que:

- Não foram observadas diferenças na expressão gênica entre os pacientes com DM2 compensados e descompensados;
- A Dislipidemia foi a principal doença responsável pela diferença de expressão gênica entre os grupos, como bem observado para os genes *IL10*, *IL10RB*, *IFNA*, *IFNG* e *IP10*;
- Nos pacientes com Dislipidemia, a expressão de genes anti-inflamatórios (como *IL10*) foi menor, enquanto foi maior a expressão de genes pró-inflamatórios (como *IFNG*);
- Enquanto genes anti-inflamatórios correlacionaram-se negativamente com parâmetros de perfil glicêmico e lipídico, os genes pró-inflamatórios correlacionaram-se positivamente com estes parâmetros;
- A DP pareceu não influenciar a expressão sistêmica dos genes investigados;
- A redução da expressão de *IL10* e *IFNA* e o aumento da expressão de *IFNG* e *IP10* correlacionaram-se com piores parâmetros clínicos periodontais.
- Em DP acompanhada de distúrbios metabólicos, a presença de Dislipidemia pareceu desempenhar papel mais relevante na redução da expressão de genes anti-inflamatórios e aumento de pró-inflamatórios.

8 REFERÊNCIAS*

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
2. Adams DF. The American Academy of Periodontology. *J Periodontol*. 1996; 67(2): 177-9.
3. Aguet M, Grobke M, Dreiding P. Various human interferon alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. *Virology*. 1984; 132(1): 211-6.
4. Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus. *Inflammation*. 2013; 36(2): 364-71.
5. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67(1): 3-21.
6. Ahmed N. Glycation and diabetic complications. *J Pak Med Assoc*. 1991; 41(7): 171-4.
7. Aiello LP. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2005; 353(8): 839-41.
8. Al-Khabbaz AK, Al-Shammari KF. Diabetes mellitus and periodontal health: dentists' knowledge. *Med Princ Pract*. 2011; 20(6): 538-44.
9. Alexandropoulos EC, Kontochristopoulos GJ, Zakopoulou N. Hypertriglyceridaemia during low-dose interferon alpha-2b treatment in a patient with Kaposi's sarcoma. *Dermatology*. 2001; 202(4): 344-5.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Allen EM, Matthews JB, DJ OH, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(10): 894-901.
11. Almeida Abdo J, Cirano FR, Casati MZ, Ribeiro FV, Giampaoli V, Viana Casarin RC, et al. Influence of dyslipidemia and diabetes mellitus on chronic periodontal disease. *J Periodontol*. 2013; 84(10): 1401-8.
12. American Academy of Periodontology. International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-112. Oak Brook, Illinois, Oct 30 - Nov 2, 1999.
13. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37(1): 81-90.
14. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*. 2013; 36 (1): 11-66.
15. Ammons WF, Schectman LR, Page RC. Host tissue response in chronic periodontal disease. 1. The normal periodontium and clinical manifestations of dental and periodontal disease in the marmoset. *J Periodontal Res*. 1972; 7(2): 131-43.
16. 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.
17. Andriankaja OM, Sreenivasa S, Dunford R, DeNardin E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Aust Dent J*. 2010; 55(3): 252-9.
18. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 1-6.

19. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*. 1998; 160(1): 403-9.
20. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004; 32(4): 239-49.
21. Barona J, Blesso CN, Andersen CJ, Park Y, Lee J, Fernandez ML. Grape consumption increases anti-inflammatory markers and upregulates peripheral nitric oxide synthase in the absence of dyslipidemias in men with metabolic syndrome. *Nutrients*. 2012; 4(12): 1945-57.
22. Bassols J, Botas P, Moreno-Navarrete JM, Delgado E, Ortega F, Ricart W, et al. Environmental and genetic factors influence the relationship between circulating IL-10 and obesity phenotypes. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18(3): 611-8.
23. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celenti R, Kebschull M, et al. Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(4): 287-94.
24. Belting CM, Hiniker JJ, Dummett CD. Influence of diabetes mellitus on the severity of periodontal disease. *J Periodontol*. 1964; 35(6): 476-80.
25. Bertoldi AD, Kanavos P, Franca GV, Carraro A, Tejada CA, Hallal PC, et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. *Global Health*. 2013; 9: 62.
26. Bjelland S, Bray P, Gupta N, Hirscht R. Dentists, diabetes and periodontitis. *Aust Dent J*. 2002; 47(3): 202-7; quiz 72.
27. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(4): F645-59.

28. Borrell LN, Burt BA, Warren RC, Neighbors HW. The role of individual and neighborhood social factors on periodontitis: the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2006; 77(3): 444-53.
29. Borrell LN, Crawford ND. Social disparities in periodontitis among US adults: the effect of allostatic load. *J Epidemiol Community Health*. 2011; 65(2): 144-9.
30. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Berker E, Tepe E, Akkus S. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*. 2006; 35(3-4): 180-5.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, VIGITEL 2011. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2012. [acesso 2013 jul 12]. disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011.
32. Bray GA, Clearfield MB, Fintel DJ, Nelinson DS. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk. *Clin Cornerstone*. 2009; 9(4): 30-40; discussion 1-2.
33. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol*. 1996; 67(11): 1185-92.
34. Burgess PI, MacCormick IJ, Harding SP, Bastawrous A, Beare NA, Garner P. Epidemiology of diabetic retinopathy and maculopathy in Africa: a systematic review. *Diabet Med*. 2013; 30(4): 399-412.
35. Burke SJ, Goff MR, Lu D, Proud D, Karlstad MD, Collier JJ. Synergistic expression of the CXCL10 gene in response to IL-1beta and IFN-gamma involves NF-kappaB, phosphorylation of STAT1 at Tyr701, and acetylation of histones H3 and H4. *J Immunol*. 2013; 191(1): 323-36.

36. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013; 48(1): 30-6.
37. Casarin RC, Duarte PM, Santos VR, Lima JA, Gagnon G, Casati MZ, et al. Influence of glycemic control on Epstein-Bar and Cytomegalovirus infection in periodontal pocket of type 2 diabetic subjects. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(11): 902-6.
38. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, Apponi LH, Aparecida Giro EM, Valentini SR, et al. Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *J Periodontol.* 2012; 83(7): 926-35.
39. Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2010; 81(12): 1708-24.
40. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006; 35(3): 491-510.
41. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent.* 2009; 7(2): 107-27.
42. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(4): 228-36.
43. Chu X, Newman J, Park B, Nares S, Ordonez G, Iacopino AM. In vitro alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids. *Cell Tissue Res.* 1999; 296(2): 331-7.

44. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol.* 2008; 48(4): 628-37.
45. Coelho Rde S, Gusmao ES, Jovino-Silveira RC, Caldas Ade F. Profile of periodontal conditions in a Brazilian adult population. *Oral Health Prev Dent.* 2008; 6(2): 139-45.
46. Correa FO, Goncalves D, Figueredo CM, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SR. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(1): 53-8.
47. Cox AJ, Agarwal S, D MH, Carr JJ, Freedman BI, Bowden DW. C-reactive protein concentration predicts mortality in type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Diabet Med.* 2012; 29(6): 767-70.
48. Craig RG, Yip JK, So MK, Boylan RJ, Socransky SS, Haffajee AD. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *J Periodontol.* 2003; 74(7): 1007-16.
49. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol.* 1999; 70(11): 1313-21.
50. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89(11): 1241-6.
51. 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.

52. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*. 1993; 178(3): 1041-8.
53. Dallmeier D, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Fontes JD, Meigs JB, et al. Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers: a community-based cross-sectional study at the Framingham Heart Study. *Diabetol Metab Syndr*. 2012; 4(1): 28.
54. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994; 264(5164): 1415-21.
55. de Pommereau V, Dargent-Pare C, Robert JJ, Brion M. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol*. 1992; 19(9 Pt 1): 628-32.
56. Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, Stijnen T, Hofman A, Witteman JC. Risk of type 2 diabetes attributable to C-reactive protein and other risk factors. *Diabetes Care*. 2007; 30(10): 2695-9.
57. 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.
58. Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G. Type I interferons: expression and signalization. *Cell Mol Life Sci*. 1998; 54(10): 1109-21.
59. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1999; 19(6): 563-73.

60. Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. *J Periodontol.* 1998; 69(2): 113-9.
61. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res.* 2007; 42(4): 377-81.
62. Duarte PM, Miranda TS, Lima JA, Dias Goncalves TE, Santos VR, Bastos MF, et al. Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2012; 83(4): 426-34.
63. Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007; 13(6): 594-9.
64. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(5): 396-403.
65. Eguchi M, Gillis LC, Liu Y, Lyakhovsky N, Du M, McDermott JC, et al. Regulation of SOCS-3 expression by leptin and its co-localization with insulin receptor in rat skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 267(1-2): 38-45.
66. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, Cdc Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck GDRP. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012; 91(10): 914-20.

67. Elam MB, Yellaturu C, Howell GE, Deng X, Cowan GS, Kumar P, et al. Dysregulation of sterol regulatory element binding protein-1c in livers of morbidly obese women is associated with altered suppressor of cytokine signaling-3 and signal transducer and activator of transcription-1 signaling. *Metabolism*. 2010; 59(4): 587-98.
68. Elamin AM, Skaug N, Ali RW, Bakken V, Albandar JM. Ethnic disparities in the prevalence of periodontitis among high school students in Sudan. *J Periodontol*. 2010; 81(6): 891-6.
69. Emanuelli B, Glondou M, Filloux C, Peraldi P, Van Obberghen E. The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1 β -induced desensitization of insulin signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 3: S97-S103.
70. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(3): 1055-8.
71. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003; 52(1): 1-8.
72. Faber DR, Moll FL, Vink A, van der Waal C, Kalkhoven E, Schipper HS, et al. Adipose tissue quantity and composition contribute to adipokine concentrations in the subclavian vein and the inferior mesenteric vein. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36(8): 1078-85.
73. Faber DR, van der Graaf Y, Westerink J, Kanhai DA, Monajemi H, Visseren FL, et al. Hepatocyte growth factor and interferon-gamma inducible protein-10 are related to visceral adiposity. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43(4): 369-78.
74. Fentoglu O, Koroglu BK, Hicyilmaz H, Sert T, Ozdem M, Sutcu R, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(1): 8-16.

75. 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.
76. Fernandes JK, Wiegand RE, Salinas CF, Grossi SG, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, et al. Periodontal disease status in gullah african americans with type 2 diabetes living in South Carolina. *J Periodontol.* 2009; 80(7): 1062-8.
77. Fernandez-Miranda C, Castellano G, Guijarro C, Fernandez I, Schoebel N, Larumbe S, et al. Lipoprotein changes in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93(10): 1901-4.
78. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989; 170(6): 2081-95.
79. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991; 146(10): 3444-51.
80. Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol.* 1997; 68(2): 136-40.
81. Flodstrom M, Eizirik DL. Interferon-gamma-induced interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression in rodent and human islet cells precedes nitric oxide production. *Endocrinology.* 1997; 138(7): 2747-53.
82. Flores-Alfaro E, Parra-Rojas I, Salgado-Bernabe AB, Chavez-Maldonado JP, Salazar-Martinez E. Cardiovascular risk evaluated by C-reactive protein levels in diabetic and obese Mexican subjects. *Circ J.* 2008; 72(7): 1170-4.
83. Forslund HB, Lindroos AK, Blomkvist K, Hakeberg M, Berggren U, Jontell M, et al. Number of teeth, body mass index, and dental anxiety in middle-aged Swedish women. *Acta Odontol Scand.* 2002; 60(6): 346-52.

84. Fronczyk A, Moleda P, Safranow K, Piechota W, Majkowska L. Increased concentration of c-reactive protein in obese patients with type 2 diabetes is associated with obesity and presence of diabetes but not with macrovascular and microvascular complications or glycemic control. *Inflammation*. 2014; 37(2): 349-57.
85. Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J Periodontol*. 1993; 64(5 Suppl): 400-6.
86. Gajos G, Pilacinski S, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Controversies in diabetes in 2013 - a brief update. *Adv Clin Exp Med*. 2013; 22(6): 777-84.
87. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000; 71(10): 1535-45.
88. Garcia C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab*. 2010; 36(5): 327-38.
89. Garcia-Hernandez A, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*. 2012; 50(1): 276-88.
90. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(8): 671-9.
91. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol*. 1992; 148(6): 1792-6.

92. Gjermo P. Factors influencing the assessment of treatment needs. *J Clin Periodontol*. 1991; 18(6): 358-61.
93. Gjermo P, Rosing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000*. 2002; 29: 70-8.
94. Glavind L, Lund B, Loe H. The relationship between periodontal state and diabetes duration, insulin dosage and retinal changes. *J Periodontol*. 1968; 39(6): 341-7.
95. 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.
96. Gomes MA, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, Buso AM, Silva AG, Favoreto S, Jr., et al. Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2006; 41(3): 177-83.
97. Gomez JM, Vila R, Catalina P, Soler J, Badimon L, Sahun M. The markers of inflammation and endothelial dysfunction in correlation with glycated haemoglobin are present in type 2 diabetes mellitus patients but not in their relatives. *Glycoconj J*. 2008; 25(6): 573-9.
98. Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, Balian G, Hurwitz SR. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. *Connect Tissue Res*. 2000; 41(2): 81-91.
99. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(12): 1046-52.

100. Haas AN, Gaio EJ, Oppermann RV, Rosing CK, Albandar JM, Susin C. Pattern and rate of progression of periodontal attachment loss in an urban population of South Brazil: a 5-years population-based prospective study. *J Clin Periodontol*. 2012; 39(1): 1-9.
101. Haffajee AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(2): 89-99.
102. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 196-205.
103. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res*. 2002; 25(3): 229-45.
104. Han X, Kitamoto S, Lian Q, Boisvert WA. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem*. 2009; 284(47): 32950-8.
105. Han X, Kitamoto S, Wang H, Boisvert WA. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J*. 2010; 24(8): 2869-80.
106. Haque SJ, Williams BR. Signal transduction in the interferon system. *Semin Oncol*. 1998; 25(1 Suppl 1): 14-22.
107. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004; 145(1): 447-52.
108. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(1): 114-9.

109. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(3): 175-81.
110. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 1987; 28(6): 613-28.
111. Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol.* 1992; 4(5): 563-9.
112. Hsu LA, Ko YL, Wu S, Teng MS, Chou HH, Chang CJ, et al. Association of soluble intercellular adhesion molecule-1 with insulin resistance and metabolic syndrome in Taiwanese. *Metabolism.* 2009; 58(7): 983-8.
113. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care.* 2011; 34(6): 1249-57.
114. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation.* 2001; 103(21): 2610-6.
115. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1995; 1(4): 214-29.
116. Ingelsson E, Hulthe J, Lind L. Inflammatory markers in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38(7): 502-9.
117. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957; 147(927): 258-67.

118. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*. 1999; 93(5): 1456-63.
119. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2001; 72(6): 774-8.
120. Jisieike-Onuigbo NN, Unuigbe EI, Oguejiofor CO. Dyslipidemias in type 2 diabetes mellitus patients in Nnewi South-East Nigeria. *Ann Afr Med*. 2011; 10(4): 285-9.
121. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001; 6(1): 34-55.
122. Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, Alizadeh N, Giusti V, Dayer JM, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine*. 2005; 29(6): 270-4.
123. Kanai A, Kawamura T, Umemura T, Nagashima M, Nakamura N, Nakayama M, et al. 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.
124. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. 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.
125. Krause S, Pohl A, Pohl C, Liebrez A, Ruhling K, Losche W. Increased generation of reactive oxygen species in mononuclear blood cells from hypercholesterolemic patients. *Thromb Res*. 1993; 71(3): 237-40.

126. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(1): 49-60.
127. Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I. Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J Immunol.* 1997; 159(2): 794-803.
128. Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine.* 2005; 30(4): 160-7.
129. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2001; 126(1): 54-63.
130. Lin YC, Lu MC, Lin C, Chiang MK, Jan MS, Tang HL, et al. Activation of IFN-gamma/STAT/IRF-1 in hepatic responses to *Klebsiella pneumoniae* infection. *PLoS One.* 2013; 8(11): e79961.
131. Linden GJ, McClean K, Young I, Evans A, Kee F. Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(9): 741-7.
132. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology.* 2004; 145(6): 2997-3003.
133. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993; 16(1): 329-34.
134. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(2): 125-35.

135. 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; 27(8): 537-41.
136. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care*. 1992; 15(11): 1509-16.
137. Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, Taraborelli T, Guagnano MT, Michetti N, et al. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(10): 5876-9.
138. 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.
139. Mbanya JC, Motala AA, Sobngwi E, Assah FK, Enoru ST. Diabetes in sub-Saharan Africa. *Lancet*. 2010; 375(9733): 2254-66.
140. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006; 77(8): 1289-303.
141. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007; 44: 127-53.
142. Mehra R. Global public health problem of sudden cardiac death. *J Electrocardiol*. 2007; 40(6 Suppl): S118-22.
143. Memon AA, Sundquist J, Wang X, Palmer K, Sundquist K, Bennet L. The association between cytokines and insulin sensitivity in Iraqi immigrants and native Swedes. *BMJ Open*. 2013; 3(11): e003473.

144. Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, et al. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin*. 2004; 22(4): 485-504.
145. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, Maruyama M, Harada H, Sudo Y, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*. 1988; 54(6): 903-13.
146. Montori VM, Deming J, Shah ND. How should clinicians and patients choose antihyperglycemic agents?: an evidence-based approach. *Pol Arch Med Wewn*. 2011; 121(6): 208-12.
147. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683-765.
148. Morari J, Torsoni AS, Anhe GF, Roman EA, Cintra DE, Ward LS, et al. The role of proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. *Metabolism*. 2010; 59(2): 215-23.
149. Morrison HI, Ellison LF, Taylor GW. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. *J Cardiovasc Risk*. 1999; 6(1): 7-11.
150. Murray HW. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med*. 1988; 108(4): 595-608.
151. Murussi M, Baglio P, Gross JL, Silveiro SP. Risk factors for microalbuminuria and macroalbuminuria in type 2 diabetic patients: a 9-year follow-up study. *Diabetes Care*. 2002; 25(6): 1101-3.
152. Nakazawa T, Satoh J, Takahashi K, Sakata Y, Ikehata F, Takizawa Y, et al. Complete suppression of insulinitis and diabetes in NOD mice lacking interferon regulatory factor-1. *J Autoimmun*. 2001; 17(2): 119-25.

153. Narverud I, Ueland T, Nenseter MS, Retterstol K, Telle-Hansen VH, Halvorsen B, et al. Children with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory imbalance between the tumor necrosis factor alpha system and interleukin-10. *Atherosclerosis*. 2011; 214(1): 163-8.
154. 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.
155. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005; 353(25): 2643-53.
156. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. 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.
157. Navarro-Sanchez AB, Faria-Almeida R, Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(10): 835-43.
158. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*. 2013; 40(1): 195-211.
159. Nesse W, Linde A, Abbas F, Spijkervet FK, Dijkstra PU, de Brabander EC, et al. Dose-response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 diabetics. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(4): 295-300.
160. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*. 2001; 72(9): 1221-7.

161. Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamuta M, Murakami S, Okada H. Differential mRNA expression of inflammatory cytokines in inflamed gingival tissues (abstract). *J Dent Res*. 1997; 76: 301.
162. 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.
163. O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. 1998; 17(4): 1006-18.
164. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(3): 248-66.
165. Okada H, Murakami S, Kitamura M, Nozaki T, Kusumoto Y, Hirano H, et al. Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanisms of periodontal tissue destruction. *Oral Dis*. 1996; 2(1): 87-95.
166. Okopien B, Krysiak R, Kowalski J, Madej A, Belowski D, Zielinski M, et al. The effect of statins and fibrates on interferon-gamma and interleukin-2 release in patients with primary type II dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2004; 176(2): 327-35.
167. Oliveira RN, Corbi SCT, Bastos AS, Orrico SRP, Scarel Caminaga RM. Periodontal disease in patients with Diabetes Mellitus: influence of genetic polymorphisms? *Rev Odontol UNESP*. 2011; 40(4): 187-94.
168. Ose L. Diagnostic, clinical, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia in children. *Semin Vasc Med*. 2004; 4(1): 51-7.
169. Ostberg AL, Bengtsson C, Lissner L, Hakeberg M. Oral health and obesity indicators. *BMC Oral Health*. 2012; 12: 50.

170. Pacios S, Kang J, Galicia J, Gluck K, Patel H, Ovaydi-Mandel A, et al. Diabetes aggravates periodontitis by limiting repair through enhanced inflammation. *FASEB J.* 2012; 26(4): 1423-30.
171. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 9-11.
172. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976; 34(3): 235-49.
173. Papapanou PN. Epidemiology and natural history of periodontal disease. In: Lang NP, Karring T, editors. *European Workshop on Periodontology. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*; 1993; Charter House at Ittingen, Switzerland. Berlin: Quintessence; 1994.
174. Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemela O, Karttunen R, Raunio T, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(10): 881-7.
175. Peer N, Kengne AP, Motala AA, Mbanya JC. Diabetes in the Africa region: 2013 update for the IDF diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013.
176. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003; 111(12): 1805-12.
177. Peres MA, Antunes JL, Boing AF, Peres KG, Bastos JL. Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based oral health survey. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(3): 196-201.
178. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Borden R, et al. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 1998; 58(12): 2489-99.

179. Pfutzner A, Forst T. High-sensitivity C-reactive protein as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther.* 2006; 8(1): 28-36.
180. Pietropaoli D, Tatone C, D'Alessandro AM, Monaco A. Possible involvement of advanced glycation end products in periodontal diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(3): 683-91.
181. Pitiphat W, Savetsilp W, Wara-Aswapati N. C-reactive protein associated with periodontitis in a Thai population. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 120-5.
182. 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.
183. Pu LJ, Lu L, Xu XW, Zhang RY, Zhang Q, Zhang JS, et al. Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C-reactive protein levels in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 5: 27.
184. Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, Fong S, Lowe D, Min HY, et al. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1992; 148(3): 808-14.
185. Ramirez J, Parra B, Gutierrez S, Arce R, Jaramillo A, Ariza Y, et al. Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study. *Aust Dent J.* 2014; 59(1): 29-36.
186. Reboul J, Gardiner K, Monneron D, Uze G, Lutfalla G. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. *Genome Res.* 1999; 9(3): 242-50.
187. Reeves AF, Rees JM, Schiff M, Hujoel P. Total body weight and waist circumference associated with chronic periodontitis among adolescents in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006; 160(9): 894-9.

188. Ribeiro FV, de Mendonca AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011; 82(8): 1187-96.
189. Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2004; 53(9): 2232-41.
190. Robertson AK, Zhou X, Strandvik B, Hansson GK. Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen. *Scand J Immunol*. 2004; 59(3): 285-93.
191. Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Increased levels of C-reactive protein in noncontrolled type II diabetic subjects. *J Diabetes Complications*. 1999; 13(4): 211-5.
192. Ruta LM, Magliano DJ, Lemesurier R, Taylor HR, Zimmet PZ, Shaw JE. Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet Med*. 2013; 30(4): 387-98.
193. Sajadi SM, Khoramdelazad H, Hassanshahi G, Rafatpanah H, Hosseini J, Mahmoodi M, et al. Plasma levels of CXCL1 (GRO-alpha) and CXCL10 (IP-10) are elevated in type 2 diabetic patients: evidence for the involvement of inflammation and angiogenesis/angiostasis in this disease state. *Clin Lab*. 2013; 59(1-2): 133-7.
194. Salekzamani Y, Shirmohammadi A, Rahbar M, Shakouri SK, Nayebi F. Association between human body composition and periodontal disease. *ISRN Dent*. 2011; 2011: 863847.

195. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol.* 1997; 68(2): 127-35.
196. Salzberg TN, Overstreet BT, Rogers JD, Califano JV, Best AM, Schenkein HA. C-reactive protein levels in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77(6): 933-9.
197. Sambunjak D, Nickerson JW, Poklepovic T, Johnson TM, Imai P, Tugwell P, et al. Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; (12): CD008829.
198. Santos VR, Lima JA, Goncalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010; 81(10): 1455-65.
199. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Bastos MF, et al. Partial- and full-mouth scaling and root planing in type 2 diabetic subjects: a 12-mo follow-up of clinical parameters and levels of cytokines and osteoclastogenesis-related factors. *J Periodontal Res.* 2012; 47(1): 45-54.
200. 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.
201. Sastrowijoto SH, Hilleman P, van Steenberg T, Abraham-Inpijn L, de Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *J Clin Periodontol.* 1989; 16(5): 316-22.
202. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013; 28(2): 169-80.

203. Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, Shu L, Ribaux P, Haataja L, et al. CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell Metab.* 2009; 9(2): 125-39.
204. Seppala B, Sorsa T, Ainamo J. Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. *J Periodontol.* 1997; 68(12): 1237-45.
205. Shi YC, Liao JW, Pan TM. Antihypertriglyceridemia and anti-inflammatory activities of monascus-fermented dioscorea in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2011; 2011: 710635.
206. Shinohara E, Yamashita S, Kihara S, Hirano K, Ishigami M, Arai T, et al. Interferon alpha induces disorder of lipid metabolism by lowering postheparin lipases and cholesteryl ester transfer protein activities in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 25(6): 1502-6.
207. Silva-Boghossian CM, Luiz RR, Colombo AP. Periodontal status, sociodemographic, and behavioral indicators in subjects attending a public dental school in Brazil: analysis of clinical attachment loss. *J Periodontol.* 2009; 80(12): 1945-54.
208. Sima C, Glogauer M. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Curr Diab Rep.* 2013; 13(3): 445-52.
209. Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, et al. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(18): 8529-33.
210. Souza JA, Rossa C, Jr., Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(2): 128-38.

211. Starr R, Hilton DJ. SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30(10): 1081-5.
212. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 1991; 5(2): 171-7.
213. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995; 270(45): 27348-57.
214. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005; 365(9467): 1333-46.
215. Su G, Mi S, Tao H, Li Z, Yang H, Zheng H, et al. Association of glycemic variability and the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2011; 10: 19.
216. Summers KL, Marleau AM, Mahon JL, McManus R, Hramiak I, Singh B. Reduced IFN- α secretion by blood dendritic cells in human diabetes. *Clin Immunol.* 2006; 121(1): 81-9.
217. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Ren YZ, Qin GM. Changes of adiponectin and inflammatory cytokines after periodontal intervention in type 2 diabetes patients with periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(12): 970-4.
218. Surendar J, Mohan V, Rao MM, Babu S, Aravindhan V. Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). *Diabetes Technol Ther.* 2011; 13(4): 477-82.
219. 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.

220. Susanto H, Nesse W, Dijkstra PU, Hoedemaker E, van Reenen YH, Agustina D, et al. Periodontal inflamed surface area and C-reactive protein as predictors of HbA1c: a study in Indonesia. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(4): 1237-42.
221. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004; 75(7): 1033-41.
222. 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.
223. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26: 535-84.
224. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 623-55.
225. Teng YT, Mahamed D, Singh B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun*. 2005; 73(6): 3453-61.
226. Thomas CE, Ku G, Kalyanaraman B. Nitro spin trap lipophilicity as a determinant for inhibition of low density lipoprotein oxidation and activation of interleukin-1 beta release from human monocytes. *J Lipid Res*. 1994; 35(4): 610-9.
227. Tominaga M, Uno K, Yagi K, Fukui M, Hasegawa G, Yoshikawa T, et al. Association between capacity of interferon-alpha production and metabolic parameters. *J Interferon Cytokine Res*. 2010; 30(6): 451-4.

- 228. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): 39-53.
- 229. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002; 30(3): 182-92.
- 230. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22(4): 168-74.
- 231. Valentaviciene G, Paipaliene P, Nedzelskiene I, Zilinskas J, Anuseviciene OV. The relationship between blood serum lipids and periodontal condition. *Stomatologija*. 2006; 8(3): 96-100.
- 232. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes*. 2002; 51(4): 1088-92.
- 233. Wang PL, Shirasu S, Shinohar M, Azuma Y, Daito M, Yasuda H, et al. IL-10 inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human gingival fibroblasts production of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263(2): 372-7.
- 234. Wang Z, Hoy WE. C-reactive protein and the risk of developing type 2 diabetes in Aboriginal Australians. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 76(1): 37-43.
- 235. Wherry JC, Schreiber RD, Unanue ER. Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect Immun*. 1991; 59(5): 1709-15.
- 236. Wong PK, Egan PJ, Croker BA, O'Donnell K, Sims NA, Drake S, et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2006; 116(6): 1571-81.

237. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Geneva: IDF Consult; 2006.
238. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2011; 894: 1-253.
239. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. J Periodontal Res. 1997; 32(1 Pt 2): 115-9.
240. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. J Biol Chem. 1994; 269(13): 9889-97.
241. Yoon AJ, Cheng B, Philipone E, Turner R, Lamster IB. Inflammatory biomarkers in saliva: assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. J Clin Periodontol. 2012; 39(5): 434-40.
242. Yosef-Levi IM, Grad E, Danenberg HD. [C-reactive protein and atherothrombosis--a prognostic factor or a risk factor?]. Harefuah. 2007; 146(12): 970-4, 96.
243. Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. J Cardiol. 2009; 53(3): 317-33.
244. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(11): 4806-10.

ANEXO

Certificado de aprovação deste estudo pelo CEP

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA	
		Comitê de Ética em Pesquisa	
			
Certificado			
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "DIABETES MELLITUS E DOENÇA PERIODONTAL: ANÁLISE CLÍNICA, GENÉTICA, MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E BIOQUÍMICA", sob o protocolo nº 50/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) SILVANA REGINA PEREZ ORRICO, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 04 (quatro) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.			
Certify that the research project titled "DIABETES MELLITUS AND PERIODONTAL DISEASE: CLINICAL, GENETICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS", protocol number 50/06, under Dr SILVANA REGINA PEREZ ORRICO, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 04 (four) years when the final review of this study will occur.			
Araraquara, 23 de abril de 2007.			
Profª Drª Mirian Aparecida Onofre Coordenadora			

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

Araraquara, 21 de março de 2014.

RAFAEL NEPOMUCENO OLIVEIRA