

Renata Oliveira Samuel

Influência da infecção endodôntica e/ou periodontal  
associadas à diabetes na quantificação sérica da  
citocina pró-inflamatória IL-17 e na glicemia de ratos  
Wistar

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares  
Angelo Cintra

Araçatuba, SP

2012

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S193i Samuel, Renata Oliveira.  
Influência da infecção endodôntica e/ou periodontal associadas à diabetes na quantificação sérica da citocina pró-inflamatória IL-17 e na glicemia de ratos Wistar / Renata Oliveira Samuel. - Araçatuba : [s.n.], 2013  
58 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Diabetes mellitus 2. Periodontite periapical 3. Doenças periodontais 3. Interleucina-17

Black D24  
CDD 617.64

# Dados Curriculares

Renata Oliveira Samuel

## Nascimento

14.01.1988

Uberaba – MG

## Filiação

Aristides Samuel Júnior

Vera Lúcia de Oliveira Samuel

## 2006/2010

Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Uberaba - UNIUBE.

## 2010/2012

Especialização em Endodontia pela Associação Brasileira de Odontologia - ABO-MG.

## 2011/2013

Curso de Mestrado em Ciência Odontológica, área de Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.

## Associações

Associação Brasileira de Odontologia

Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas

Associação Internacional de Pesquisas Odontológicas

# Dedicatória

À **Deus**, pela oportunidade do trabalho, do crescimento, do progresso.

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus.”

Aos que me deram a vida. Ao meu porto seguro, à minha calma. Aos que me dão amor genuíno e incondicional, **Vera Lúcia Oliveira Samuel** e **Aristides Samuel Júnior**.

À minha irmã, **Patrícia Oliveira Samuel**, pela paz, pelos ensinamentos que seus olhos me transmitem, pelo amor no sentido mais puro da palavra.

Ao meu irmão, **Fernando Oliveira Samuel**, pela serenidade, inspiração. Pelo exemplo de força de vontade e determinação que representa em minha vida.

À minha irmã, **Luciana Oliveira Samuel**, por sempre torcer por minhas conquistas, pela receptividade, pelos momentos maravilhosos que tem proporcionado.

Ao meu namorado, **Leonardo Biagioni de Lima**, pelo apoio de sempre em minhas escolhas, pelas vibrações positivas. Por estar ao meu lado em todos os momentos.

# Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, professor **Luciano Tavares Angelo Cintra**, pela oportunidade ímpar de crescimento pessoal e profissional. A quem devo imensa gratidão por tudo que me ensinou, pela dedicação e profissionalismo.

À professora **Valéria Marçal Felix de Lima**, pela contribuição inestimável para realização deste trabalho, pela paciência e competência.

À professora **Denise Bertulucci Rocha Rodrigues**, por ter me incentivado a dar os primeiros passos, pela base e estímulo para entrar no mundo da pesquisa.

# Agradecimentos

É impossível vencer ou ser feliz sozinho. Por isso, são muitas as pessoas que participaram desta conquista e que gostaria de dividir a alegria deste momento.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação em Ciência Odontológica, **Eloi Dezan Júnior, João Eduardo Gomes Filho, Mauro Juvenal Nery, Juliano Pelim Pessan, Robson Frederico Cunha, Alberto Delbém, José Arlindo Otoboni Filho**, pelos ensinamentos e agradável convivência.

Ao professor **Gustavo Sivieri Araújo**, pelo incentivo a ingressar na pós-graduação.

À **Índia Olinta de Azevedo Queiroz** por tudo que me ajudou neste período. Pela companhia, solicitude, amizade e ótima convivência.

Aos meus amigos-companheiros de pós-graduação **Annelise Katrine Carrara Prieto, Mariane Maffei Azuma, Luciana Ferreira Louzada, Paulo Duarte** pela participação ativa na realização deste trabalho. Pessoas a quem devo imensa gratidão pelos bons momentos, pela parceria e amizade, que fizeram meu cotidiano mais leve nesse período.

À **Clícia Ribeiro, Francine Beneti, Ludmilla Santos, Aginaldo Candido da Silva Facundo, Simone Watanabe, Diego Valentim, Loiane Matsunari, Marcelo Wayama, Carla Sipert, Danna Moreira** pelas valiosas colaborações, pelo companheirismo.

Às pós-graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, **Luis Gustavo Narciso, Larissa Melo, Kathlenn Liezbet e Juliana Perosso**, por não medir esforços para me ajudar no departamento de Imunologia.

Aos funcionários da faculdade, **Cláudia Neves, Nelci Vieira, Peterson, Grazielle, Alexandro, Camilo**, pela paciência e compromisso em nos auxiliar.

À **Alice**, pessoa a quem devo eterna gratidão, pela confiança e amizade. Por ser a primeira pessoa a me acolher quando era tudo tão novo.

À **Elisângela e família**, pessoas maravilhosas que conheci neste período. A quem devo imensa consideração, por tudo que me ensinaram.

À **Lílian Margareth Biagioni de Lima e família**, pela torcida, pelos bons momentos, conselhos e palavras confortadoras nos dias difíceis.

À **Raíssa Campos Mazetti**, que mesmo de longe sempre foi mais que presente nesta vitória.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** e a **Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba**.

Às agências de fomento, **CNPq**, **Fundunesp** e **FAPESP** pela contribuição financeira para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

*“A Dor e a dificuldade, o trabalho e a provação, em suas esferas de serviço, representam matérias abençoadas em cuja assimilação, ser-nos-á possível, efetuar o próprio burilamento, à feição do diamante que, aprisionado no cascalho, reclama o esmeril que o dilacera, convertendo-se, por fim, na pedra formosa e rara, suscetível de refletir as magnificências da luz.”*

*Chico Xavier*



## RESUMO

Samuel, RO. Influência da infecção endodôntica e/ou periodontal associadas à diabetes na quantificação sérica da citocina pró-inflamatória IL-17 e na glicemia de ratos Wistar. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2013.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da periodontite apical e/ou doença periodontal associadas à diabetes na quantificação sérica da citocina pró-inflamatória IL-17 e na glicemia. Foram utilizados 80 ratos da linhagem Wistar divididos em 8 grupos de 10 ratos: G1 – ratos normoglicêmicos ; G2 – ratos com infecção endodôntica; G3 – ratos com infecção periodontal; G4 – ratos com infecção endodôntica e periodontal; G5 – ratos diabéticos; G6 – ratos diabéticos com infecção endodôntica; G7 – ratos diabéticos com infecção periodontal; G8 – ratos diabéticos com infecção endodôntica e periodontal. A diabetes foi induzida pela aplicação de estreptozotocina via veia peniana, cujo desenvolvimento da doença foi confirmado no sexto e último dia do experimento pela avaliação glicêmica no sangue por meio de uma punção na extremidade da cauda do animal, seguida de pequena compressão para a obtenção de uma gota de sangue. A infecção endodôntica foi induzida pela exposição pulpar do primeiro molar superior direito. A infecção periodontal foi induzida por meio da confecção de uma amarrinha junto ao colo dentário do segundo molar superior esquerdo. Com 30 dias pós-operatórios foi realizada a glicemia novamente e a coleta de sangue pela punção cardíaca para a quantificação da citocina IL-17 empregando a técnica de ELISA de captura. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O nível glicêmico foi maior em ratos diabéticos quando comparados com ratos controle aos 6 e 30 dias ( $p < 0,05$ ). Entretanto, aos 30 dias nos grupos de ratos diabéticos, observou-se que a presença da infecção periodontal isolada (G7) ou associada à endodôntica (G8) aumentou de forma significativa a glicemia quando comparado com os ratos diabéticos sem infecções orais (G5) ( $p < 0,05$ ). A presença da doença sistêmica diabetes e da periodontite apical ou doença

periodontal isoladas não foram capazes de elevar o nível sérico de IL-17 ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a presença das infecções orais associadas (G4 e G8) elevaram de forma significativa o nível sérico de IL-17, independente da presença da diabetes ( $p < 0,05$ ). Pode-se concluir que a periodontite apical, quando associada com a doença periodontal, pode aumentar a glicemia e o nível sérico de IL-17 em ratos normoglicêmicos ou diabéticos.

**Palavras-Chave:** Diabetes; infecções orais, IL-17, glicemia.

## ABSTRACT

Samuel RO. Influence of endodontic infection and / or periodontal associated with diabetes in serum levels proinflammatory cytokine IL-17 and on glycemia in Wistar rats. Araçatuba: São Paulo State University, 2013.

The aim of the study was to evaluate the influence of periapical lesions and/or periodontal disease on the IL-17 serum and dosage glycemic a rat model of diabetes mellitus. Eighty male Wistar rats were divided into eight groups of ten animals each: normal rats (G1), rats with pulpal infection (G2), rats with periodontal disease (G3), rats with pulpal infection and periodontal disease (G4), diabetic rats (G5), diabetic rats with pulpal infection (G6), diabetic rats with periodontal disease (G7), diabetic rats with pulpal infection and periodontal disease (G8). Diabetes was induced using streptozotocin, pulpal infection were induced by dental pulp exposure to the oral environment and the periodontal disease by periodontal ligature. Blood glucose was measured by means of a perforation in the tail of the animal after 0, 6 and 30 days post-operative. The animals were sacrificed after 30 days and the IL-17 levels were measured by ELISA. The total assessed values was tabulated according to each experimental group and statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Glucose levels were higher in diabetic rats compared to control rats at 6, and 30 days ( $p < 0.05$ ). However, at 30 days, and among the groups of diabetic rats, it was observed that the presence of periodontal infection alone (G7) or associated with endodontic (G8) increased significantly the blood glucose compared to diabetic rats without oral infections (G5) ( $p < 0.05$ ). The presence of systemic disease diabetes was not able to increase the level of serum IL-17 ( $p < 0.05$ ). However, the presence of the associated oral infections (G4, G8) significantly elevated the serum level of IL-17, regardless of the presence of diabetes ( $p < 0.05$ ). It can be concluded that the endodontic infection when associated with periodontal disease may increase blood glucose levels in diabetic rats and the serum level of IL-17 in normoglycemic or diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes; oral infections; IL-17; glycemia

## Lista de Tabelas

Páginas

---

Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos ratos 33

Tabela 2 – Média e desvio padrão do nível glicêmico nos diferentes grupos de acordo com os períodos de avaliação 42

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de IL-17 em pg/mL por grupo 44

## Lista de Figuras

|   | <u>Páginas</u> |
|---|----------------|
| Figura 1- Injeção de estreptozotocina via veia peniana do rato  | 39             |
| Figura 2 – Abertura do 1º molar superior direito com a broca Ln   | 39             |
| Figura 3 – Ligadura em volta do colo dentário do segundo molar superior esquerdo com fio de algodão nº 24   | 39             |
| Figura 4 – Infecção periodontal induzida do lado esquerdo por meio de um fio de algodão em torno do segundo molar superior e infecção endodôntica induzida do lado direito por meio da abertura coronária com a broca Ln, como nos grupos 4 e 8 | 40             |
| Figura 5 – Coleta de sangue por meio de punção cardíaca   | 40             |

## Lista de Abreviaturas

**DM** Diabetes Mellitus

**DP** Doença periodontal

**G1** Grupo 1: ratos normoglicêmicos

**G2** Grupo 2: ratos com periodontite apical

**G3** Grupo 3: ratos com doença periodontal

**G4** Grupo 4: ratos com periodontite apical e doença periodontal

**G5** Grupo 5: ratos diabéticos

**G6** Grupo 6: ratos diabéticos com periodontite apical

**G7** Grupo 7: ratos diabéticos com doença periodontal

**G8** Grupo 8: ratos diabéticos com periodontite apical e doença periodontal

**PA** Periodontite apical

# SUMÁRIO

## *Páginas*

I - INTRODUÇÃO ..... 16

II - REVISÃO DE LITERATURA ..... 21

III - OBJETIVOS ..... 30

IV - MATERIAL E MÉTODOS ..... 32

V - RESULTADOS ..... 42

VI - DISCUSSÃO ..... 47

VII - CONCLUSÃO ..... 52

VIII - REFERÊNCIAS ..... 54

# *Introdução*



Comumente, indivíduos portadores de Diabetes Mellitus (DM) possuem complicações locais e sistêmicas decorrentes desta manifestação (Marwaha, et al., 2010; Honkanen, et al., 2010; Zeng, et al., 2011; Simoni et al., 2011; Silva, et al., 2012). A doença periodontal (DP) é a mais relatada dentre as complicações da cavidade oral associada à DM. Já está bem estabelecida uma influência tanto da DP na patogênese da DM, quanto da DM influenciando na patogênese da DP (Taylor & Borgnakke, 2008; Al-Khabbaz & Al-Shammari, 2011; Preshaw, et al., 2012). Um dos mecanismos envolvidos nesta associação inclui a presença aumentada de mediadores pró-inflamatórios liberados tanto local como sistemicamente (Schenkein, et al., 2010; Silva, et al., 2012).

A infecção endodôntica, caracterizada pela periodontite apical (PA), é tão comum quanto a doença periodontal. Entretanto, por mais que a PA tenha um processo patológico semelhante à DP, representadas pela resposta do organismo frente a um agente agressor resultando na liberação de mediadores inflamatórios e consequente reabsorção óssea (Silva, et al., 2007), ainda não foi devidamente estudada. Assim, não há respaldo científico para uma possível influência da infecção endodôntica na saúde sistêmica e especialmente em organismos portadores de DM.

A DM é uma doença metabólica que ocorre devido a distúrbios na produção de insulina ou devido à resistência celular à entrada de insulina resultando no metabolismo anormal de gordura, açúcar e proteína conduzindo ao estado hiperglicêmico (Guyton, 2002). Estima-se para o ano de 2030, um aumento de 69% de adultos portadores de DM em países em desenvolvimento (Shaw, Sicree, Zimmet, 2010). Se não controlada, pode contribuir na

suscetibilidade à infecção e inflamação como observado nas doenças periodontal ou endodôntica (Fouad, 2003, Deshpande et al., 2010; Lakschevitz et al., 2011; Preshaw et al., 2012).

A forma com que as infecções locais interferem na DM e vice versa, envolve a participação do sistema imunológico, com a liberação de mediadores inflamatórios. A presença de DM por si só já leva a alterações na produção de algumas citocinas (Triñanes, et al., 2011; Surendar, et al., 2012), podendo estas por sua vez, modular infecções orais (Amir, et al., 2011; Sun et al., 2011). Um dos mediadores inflamatórios liberados tanto pela DM e como pelas infecções orais é a IL-17 (Marwaha, et al., 2010; Schenkein, et al., 2010; Marçal, et al., 2010)

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por células T, denominadas Th 17 (Gaffen, 2011). Sabe-se que ela é ativa em respostas inflamatórias, auto-imunes e antimicrobianas à patógenos em uma variedade de doenças infecciosas (Schenkein et al., 2010). No entanto, a família da IL-17 é a mais nova e menos compreendida das subclasses de citocinas. Elas têm muitas características únicas, estruturais e funcionais (Gaffen, 2011). Por outro lado, têm sido demonstrado que a IL-17 pode contribuir para a patogênese de várias doenças como câncer (Chen, et al., 2012), lúpus eritematoso sistêmico (Dolff, et al., 2011), psoríase (Ariza & Williams, 2011), artrite reumatóide (Yu & Ibrahim, 2011). Há evidências de que a IL-17 atua ativamente na patogênese da DM (Marwaha, et al., 2010; Honkanen, et al., 2010; Zeng, et al., 2011; Simoni et al., 2011; Silva, et al., 2012). Devido a grande influência deste mediador, especula-se inclusive a proposta de se criar vacinas que suprimam os níveis de IL-17 no soro de

pacientes diabéticos e esta terapia tem se mostrado promissora para melhorar o controle glicêmico destes pacientes (Honkanen, et al., 2010 Wang, et al., 2011).

Em relação à DP, já foi demonstrado que como a DM aumenta o nível sérico de IL-17, ela acaba potencializando a DP e vice-versa (Santos, et al., 2010; Zhao et al., 2011). Verifica-se também, aumento na concentração de IL-17 no soro de indivíduos com DP independente da presença da DM (Schenkein et al., 2010). Devido a estes aumentos na produção de mediadores inflamatórios decorrentes desta infecção periodontal, ocorre vários distúrbios metabólicos, como um aumento do nível de glicose no sangue de diabéticos (Hungund & Panseriya, 2012).

O processo inflamatório proporcionado pela infecção endodôntica em um paciente saudável também conta com a presença de diversos mediadores inflamatórios, entre eles a IL-17 (Xiong, Wei, Peng, 2009; Marçal, et al., 2010). Estudos em ratos demonstraram que a presença deste mediador participa ativamente da patogênese da infecção endodôntica em períodos de 21 (Oseko, et al., 2009) e 28 dias (Xiong, Wei, Peng, 2009). Estudos em humanos demonstraram que além da interferência da IL-17 na patogênese de PA, há ainda a influência direta de seu aumento em quadros de exacerbação e/ou reagudecimento da lesão periapical (Colić, et al, 2007; Marçal, et al., 2010). Por outro lado, não há ainda nenhum trabalho que se preocupou em avaliar se a presença de PA altera a concentração sérica de IL-17 ou se altera o nível de glicose de normoglicêmicos ou diabéticos.

Considerando os fatores já abordados com relação à DM e a semelhança entre as manifestações orais infecciosas (PA e DP) a hipótese deste estudo é:

- a infecção endodôntica, reconhecida como PA, presente de forma isolada ou associada à DP, assim como a DM, pode influenciar na presença sérica da citocina pró-inflamatória IL-17 e no aumento glicêmico em ratos normais e diabéticos.

# *Revisão de Literatura*

## II - REVISÃO DE LITERATURA

---

A infecção endodôntica é caracterizada pela presença de microrganismos patogênicos junto ao tecido pulpar, que ocasionam a necrose deste tecido e propiciam a ocorrência de reabsorções ósseas a fim de conter a infecção. Este processo é reconhecido como PA (Leonardo, 2005).

Estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo mostram que a PA está presente em 22-65% dos dentes tratados endodonticamente (Siqueira, et al., 2005; Dugas, et al., 2003; De Moor, et al., 2000). Entretanto, o diagnóstico de PA por meio de imagens radiográficas convencionais pode ser subestimado (Estrela et al., 2008). Quando a tomografia computadorizada é usada para avaliar a prevalência destas lesões, foi demonstrado que ela está presente em 78,1% dos dentes tratados endodonticamente (Paes, et al., 2012) e em dentes não tratados, a lesão apical pode ser encontrada em até 74,7% (Estrela, et al., 2008).

A DP é relacionada ao acúmulo de biofilme e cálculo nas superfícies dentais que favorecem a virulência bacteriana causando destruição do tecido periodontal e do osso alveolar (Page et al., 1997). A relação entre a DM e a DP já está bem estabelecida em diversos trabalhos (Taylor & Borgnakke, 2008; Al-Khabbaz & Al-Shammari, 2011; Preshaw, et al., 2012). Pacientes diabéticos do tipo 2 têm o risco de desenvolvimento de DP multiplicado por três sem relação com idade, sexo ou higiene bucal (Mealey & Ocampo, 2007). Já foi demonstrado inclusive, tanto a diabetes interferindo negativamente na saúde periodontal, quanto à doença periodontal potencializando o aumento glicêmico em pacientes diabéticos (Shimoe et al., 2011; Marigo et al., 2011).

A relação entre infecções orais e sistêmicas tem sido cada vez mais explorada nas pesquisas de área médica-odontológica (Segura-Egea, et al., 2012; Cintra et al., 2012). Entretanto, a teoria da infecção local ainda tem aspectos muito controversos. A inflamação de origem endodôntica não recebeu a mesma atenção que a inflamação proveniente do periodonto (Silva, et al., 2007), embora ambas as infecções sejam decorrentes predominantemente de bactérias gram negativas e envolvam um mecanismo imunológico semelhante, com consequente liberação de mediadores inflamatórios e patogênese relacionada à reabsorção óssea. (Silva, et al., 2007).

Pacientes diabéticos são particularmente propensos à infecções bacterianas ou oportunistas (Bender & Bender, 2003). Esta vulnerabilidade é causada por um distúrbio circulatório generalizado, que pode ser amenizado pelo organismo por meio da angiogênese de vasos colaterais. Como a polpa dentária tem limitada ou nenhuma circulação colateral, aumenta o estresse oxidativo na região, potencializando a patogênese destas infecções (Leite, et al., 2008).

Além disso, um dos relatos mais comuns de nestes pacientes é a sensação de boca seca, conhecida como xerostomia, que ocorre em diabéticos devido a alterações nas glândulas salivares (Busato, et al., 2012, Fukushima, et al., 2012). Estas alterações também podem induzir a uma maior susceptibilidade às infecções bacterianas, dentre outras injúrias como, por exemplo, dor na região bucal, especialmente se o paciente estiver usando próteses (Manfredi et al, 2004). Outro prejuízo sofrido pela falta da saliva é o acúmulo de placa e detritos, o que poderia ser um fator contribuinte para infecções secundárias, como a cárie e a DP, já que uma das funções da saliva

é a de limpeza e lavagem da cavidade oral (Ide et al., 2011, Isola et al., 2011; Busato, et al., 2012). A cárie pode ser potencializada também devido a alterações na composição da saliva em condições hiperglicêmicas. O aumento na concentração de glicose e diminuição do nível de cálcio na saliva induz a patogênese de lesões cariosas.(Iqbal, et al., 2011).

Em um estudo anterior, foram feitas observações em dentes não cariados extraídos de pacientes diabéticos com longo prazo de duração (de 15 a 24 anos). Foram selecionados 7 pacientes com idades que variaram de 23-39 anos. Tais polpas foram comparadas com um grupo controle de 13 pacientes não diabéticos. Foram observadas nos diabéticos alterações no tecido periodontal. Tanto no tecido pulpar, quanto no periodontal, houve presença de angiopatias, e uma membrana basal espessada. Estas mudanças foram localizadas nos vasos sanguíneos, e pareceu mais pronunciado na área central das polpas. Essas diferenças não ocorreram com polpas de pacientes controle (Russell, 1967).

Foi relatado também em outro estudo, presença de odontalgias em pacientes diabéticos. Segundo os autores, odontalgias criam problemas de diagnóstico, especialmente porque muitos dos dentes adjacentes podem estar em um estado de necrose pulpar, sem resposta durante os testes de sensibilidade. O problema pode se tornar mais complicado quando os dentes não estão cariados ou quando os sintomas dolorosos ocorrerem bilateralmente com ausência de resposta da polpa durante o teste de vitalidade dos dentes adjacentes. Esta condição é muitas vezes referida como odontalgia diabética. A condição hiperglicêmica pode levar à insuficiência circulatória com isquemia, evoluindo a quadros de necrose pulpar ocasionalmente (Bender, et al., 1963).



Há alterações também no sistema antioxidante do tecido pulpar decorrentes da diabetes. Em um estudo utilizando modelo animal e estreptozotocina para induzir o diabetes, foi demonstrado que houve um aumento de atividade da catalase e da redução da concentração de ácido siálico. Tais resultados são de suma importância clínica no planejamento de diversos tratamentos como proteção pulpar direta, restaurações em cavidades profundas, clareamento dentário, dentre outros (Leite, et al., 2008). Sendo assim, o prognóstico para tratamentos conservadores em pacientes diabéticos pode não ser favorável. A polpa destes pacientes possui uma deficiente cicatrização de feridas, o que pode levar a irritação crônica da polpa dentária em exposição (Garber, et al., 2009).

Outro fator que pode piorar o prognóstico do tratamento endodôntico em pacientes diabéticos é a dificuldade de acesso à câmara pulpar e canais radiculares, devido a alterações morfológicas na câmara pulpar decorrente de uma maior quantidade de nódulos pulpares (Yuji Inagaki, et al., 2010). Em um estudo recente foi evidenciado uma maior expressão de osteopontina em ratos diabéticos comparados com ratos controle, sugerindo que esta molécula possa ser responsável por esta calcificação pulpar, já que ela está envolvida na patogênese de complicações como aterosclerose e outras complicações cardiovasculares em pacientes diabéticos (Yuji Inagaki, et al., 2010).

Em pacientes diabéticos o risco de extração é 30% maior do que em pacientes não diabéticos. Este dado foi comprovado por meio de um estudo em que analisaram um total de 49.334 dentes tratados endodônticamente selecionados aleatoriamente a partir de banco de dados no ano de 2003 e foram acompanhados por 2 anos. Da mesma forma, outras doenças sistêmicas

como hipertensão e doença arterial coronariana tiveram um índice de extração pós-tratamento endodôntico significativamente maior quando comparados com pacientes saudáveis (Wang, et al., 2011). Em outro trabalho semelhante, os autores obtiveram os resultados parecidos com relação à DM (Mindiola, et al., 2006).

Há algumas evidências de que diabetes não controlada pode resultar em uma resposta imune descontrolada na área perirradicular, seguido por um processo de cicatrização retardada (Brito, et al., 2012). Nestes pacientes diabéticos há uma presença mais significativa de PA (Segura-Egea, et al., 2005; López-López, et al., 2011; Marotta, et al., 2012), e geralmente estas lesões são maiores em sua extensão e não se curam mesmo após tratamento endodôntico. Além disso, pacientes que recebem insulina aumentam a dor perirradicular pré-operatória e aumentam a frequência de reagudecimentos durante o tratamento (Fouad & Burleson, 2003).

Esse aumento da prevalência da PA e propensão à prognósticos desfavoráveis nestas infecções endodônticas em hiperglicêmicos pode ser decorrentes de alterações metabólicas devido à maior presença sérica de citocinas pró-inflamatórias nestes pacientes, conduzindo o indivíduo a complicações, como quadros de inflamação exacerbada mediante a presença de patógenos (Zeng, et al., 2011). O processo inflamatório proporcionado pela infecção endodôntica em um paciente saudável conta com a presença de diversos mediadores inflamatórios, entre eles a IL-17 (Xiong, Wei, Peng, 2009; Marçal, et al., 2010).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória da família de células T reguladoras e seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido

(Gaffen, 2011). Acredita-se que ela induza reações de fase aguda estimulando a produção de IL-6, células NK, macrófagos, entre outros (Gaffen, 2009). Além disso, afirma-se que esta interleucina tem papel vital na resposta imunológica, especialmente em superfícies mucosas (Khader, Gaffen, Kolls, 2009).

Estudos mostram que ela está diretamente relacionada com a patogênese da DM (Marwaha, et al., 2010; Honkanen, et al., 2010; Zeng, et al., 2011; Simoni et al., 2011). E especula-se ainda a proposta de se criar vacinas que suprimam os níveis de IL-17 no soro de pacientes diabéticos e esta terapia tem se mostrado promissora para melhorar o controle glicêmico destes pacientes (Honkanen, et al., 2010; Wang, et al., 2011).

Na DP já foi comprovado o aumento da IL-17 tanto local (Silva, et al., 2012) como sistemicamente (Schenkein, et al., 2010), inclusive já foi feito este tipo de avaliação local em diabéticos e não diabéticos comparativamente com a presença de DP (Silva, et al., 2012). Neste estudo foi constatado que a IL-17 atua potencializando a progressão da DP principalmente em períodos iniciais, ou seja, em fase aguda (Silva, et al., 2012).

O nível sérico de IL-17 em portadores de DP também aumenta (Schenkein, et al., 2010; Zhao, et al., 2011). E este aumento pode potencializar a patogênese de ambas as doenças (Santos, et al., 2010; Silva, et al., 2012; Sun, et al., 2011), aumentando, por exemplo, o nível de perda óssea na DP (Silva, et al., 2012) e o nível glicêmico na DM, devido ao distúrbio metabólico proporcionado por este desequilíbrio (Hungund & Panseriya, 2012).

Estudos em ratos demonstraram também a presença local de IL-17 em PA em diferentes períodos (Xiong, Wei, Peng, 2009). A partir do dia de indução da lesão até o 28º dia, o número de IL-17 e de neutrófilos subiu e atingiu pico

no dia 28. Acredita-se que esta citocina pode estar envolvida na reabsorção óssea periapical e na patogênese da lesão (Xiong, Wei, Peng, 2009).

Em outro relato, foi demonstrada a presença da IL-17 em lesões que o tratamento endodôntico mostrou falhas (Henriques, et al., 2011). Nestes tratamentos houve um predomínio de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da PA, incluindo IL-17 (Henriques, et al., 2011).

Em humanos também já foi confirmada a presença de IL-17 participando ativamente da patogênese da lesão periapical (Colić, et al., 2007; Colić, et al., 2009; Marçal, et al., 2010). O primeiro estudo em humanos identificando a presença de IL-17 em PA aconteceu em 2007, e foi relatada sua presença estimulada a partir da citocina IL-8 (Colić, et al., 2007). Além disso, chegou-se a conclusão que a IL-17, influencia na exacerbação da inflamação em lesões crônicas apicais (Colić, et al., 2007).

Também foi avaliado comparativamente a presença e predominância de cada tipo de células inflamatórias (Th1, Th2 e Th17) em relação ao período de inflamação periapical (Colić, et al., 2009). Observou-se que a resposta imune Th1 é provavelmente importante para todas as fases do desenvolvimento da lesão periapical e que as células Th2 são mais presentes em lesões crônicas. Por outro lado, as células Th17 desempenham um papel dominante no agravamento da inflamação (Colić, et al., 2009).

Lesões em que ocorrem reagudecimentos observa-se um aumento da IL-17 e, conseqüentemente, um aumento da infiltração de leucócitos, em sua maioria neutrófilos, graças à ação quimiotática promovida por esta citocina, o que potencializa a inflamação (Marçal, et al., 2010).

Percebe-se que embora existam trabalhos que relacionem a PA com a DM (López-López, et al., 2011), o assunto ainda carece de informações. Ainda não foram realizadas avaliações quanto à presença sérica de IL-17 ou aumento do nível glicêmico em diabéticos, nem em não diabéticos quando há presença de PA, embora seja comprovada sua presença local (Colić, et al., 2009; Xiong, Wei, Peng, 2009; Marçal, et al., 2010; Henriques, et al., 2011). Desta forma, buscamos fazer uma análise sérica da IL-17 objetivando responder estas questões.

# *Objetivo*

### **III - OBJETIVO**

---

O objetivo deste trabalho foi:

- avaliar a influência da infecção endodôntica e/ou periodontal associadas à diabetes na quantificação sérica da citocina pró-inflamatória IL-17.
- avaliar a influência da infecção endodôntica e/ou periodontal associadas à diabetes nos níveis glicêmicos.

# *Material e Métodos*



### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. RATOS

Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 200 gramas (g), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética no uso de ratos em experimentação (CEUA – Unesp 2012/0540).

#### 4.1.2. DROGAS

Para anestesia dos ratos foi utilizado sedativo à base de xilazina (Anasedan, Divisão Vetbrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil – 10 mg/kg e anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Cetamin, Syntec do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil – 40mg/kg).

Para a indução da diabetes foi utilizada a droga estreptozotocina (Sigma® - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA – 35mg/Kg).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. DIVISÃO EM GRUPOS

Os grupos foram formados de acordo com as condições sistêmicas e procedimentos locais de indução das infecções endodôntica e periodontal e podem ser visualizados na tabela 1.

**Tabela 1** – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos ratos

|                    |           | Infecções orais |        |             |       |
|--------------------|-----------|-----------------|--------|-------------|-------|
|                    |           | Nenhuma         | Pulpar | Periodontal | Ambas |
| Condição sistêmica | Saudável  | G1              | G2     | G3          | G4    |
|                    | Diabético | G5              | G6     | G7          | G8    |

Os 80 ratos em estudo foram divididos em 8 grupos experimentais, contendo 10 ratos cada assim compostos:

- Grupo 1: ratos saudáveis;
- Grupo 2: ratos portadores de periodontite apical induzida;
- Grupo 3: ratos portadores de doença periodontal induzida;
- Grupo 4: ratos portadores de periodontite apical e doença periodontal induzidas;
- Grupo 5: ratos diabéticos;
- Grupo 6: ratos diabéticos e portadores de periodontite apical induzida;
- Grupo 7: ratos diabéticos portadores de doença periodontal induzida;
- Grupo 8: ratos diabéticos portadores de periodontite apical e doença periodontal induzida.

#### 4.2.2. INDUÇÃO DA DIABETES

Após anestesia, metade dos ratos receberam uma dose de 35mg/kg de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5), via endovenosa (veia peniana). Os demais ratos receberam também por via endovenosa apenas solução salina (0.15m), com o intuito de promover nestes uma indução falsa para submeter o mesmo estresse (Figura 1).

#### 4.2.3. INDUÇÃO DA PERIODONTITE APICAL

Para o desenvolvimento da infecção pulpar, 40 ratos (grupos 2, 4, 6 e 8) foram novamente anestesiados pelo mesmo protocolo descrito e foram expostas as polpas dos primeiros molares superiores direitos de cada animal, empregando-se de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck - Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro (Figura 2).

#### 4.2.4. INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL:

Para o desenvolvimento da infecção periodontal, 40 ratos (grupos 3, 4, 7 e 8) foram anestesiados com o mesmo protocolo anestésico e foi realizada a ligadura em torno do colo dentário de cada animal. A indução por ligadura foi realizada com a colocação de um fio de algodão numero 24, ao redor do segundo molar superior, cujo posicionamento correto das ligaduras foi feito com o auxílio de uma pinça modificada e de um espaçador digital #25 empregado para o afastamento dos dentes, facilitando a passagem do fio. As ligaduras permaneceram por todo o período pós-operatório (Figura 3). Sendo

que nos grupos 4 e 8 haviam duas lesões, a endodôntica do lado direito e a periodontal do lado esquerdo (Figura 4).

#### 4.2.5. ANÁLISE GLICÊMICA

Foi realizada a mensuração da glicemia de todos os ratos previamente à indução da diabetes, em jejum de 12/14 horas. Esta primeira mensuração foi considerada o marco inicial do experimento (dia 0). Após 6 dias foi realizada nova mensuração glicêmica (dia 6) e as infecções orais foram induzidas. Ao final do experimento (dia 30) a glicemia foi novamente mensurada para confirmar a manutenção do estado hiperglicêmico. Nos períodos definidos e sempre às 9 horas da manhã, os níveis de glicose sanguínea foram determinados. Utilizando-se agulha 29Gx1/2" (Nipro Corporation, Honjo-Nishi, Kita-ku, Osaka, Japan) realizou-se uma punção na extremidade da cauda do animal, seguida de pequena compressão para a obtenção de uma gota de sangue. Na seqüência, utilizando aparelho para glicemia e às fitas glicotestes (Accu-Check Performa - Roche-Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) os valores foram obtidos e anotados em uma planilha para descrição dos resultados. Antes e após a punção a extremidade caudal foi limpa e desinfetada com PVPI (Povidini tópico- Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda. São Paulo, SP, Brasil). Foram considerados diabéticos os ratos com nível glicêmico maior ou igual a 200mg/dl.

#### 4.2.6. COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISES

Após 30 dias pós-operatórios os ratos foram novamente anestesiados e foi realizada a coleta de 1mL de sangue por meio de punção cardíaca (Figura 5). Na sequência, os ratos foram mortos por uma sobredose anestésica.

As amostras sanguíneas para IL-17 foram colocadas em heparina (10U/ml), centrifugadas e armazenadas a -80°C. A concentração plasmática de IL-17 foi medida por ELISA, por meio de um kit específico para quantificação plasmática de IL-17 em ratos (Rat IL-17A ELISA MAX™ Deluxe, cat #437904, Biolegend, San Diego, CA, USA).

### 4.3. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

#### 4.3.1. DETERMINAÇÃO DA IL-17 NO PLASMA

##### Preparação do reagente

Colocou-se primeiramente todos os componentes do kit para ELISA de captura (Rat IL-17A ELISA MAX™ Deluxe, cat #437904, Biolegend, San Diego, CA, USA) para temperatura ambiente (25-30°C) e fez-se o preparo dos reagentes de acordo com as recomendações do fabricante.

##### Procedimento

Para a realização do ELISA de captura utilizamos placa de meia área. O protocolo de detecção utilizado para as citocinas foi o recomendado pelo fabricante do kit. Inicialmente foram pipetados 50µl do anticorpo primário (já diluído) em cada poço. Foi colocada a placa de vedação para a incubação em “overnight” à 4°C. Foi realizada a lavagem por 5 vezes com aproximadamente 300µl de tampão fosfato-salino (PBS) contendo Tween 20 a 0.05%. Posteriormente foi adicionado 100µl do diluente de ensaio A 1x, que veio no kit. Este diluente permaneceu incubado por 1 hora e novamente foi feita a lavagem como descrita anteriormente. Foram pipetados então 50µl do recombinante, após a realização da diluição seriada para obtenção da curva padrão. Foram pipetadas 50µl das amostras nos poços apropriados. Novamente foi realizado o selamento da placa e a incubação das amostras à temperatura ambiente por 2 horas. A lavagem foram realizadas novamente da mesma forma já descrita. Foram adicionados 50µl de anticorpo secundário em cada poço, a placa de vedação foi colocada para incubação da amostra por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente foi realizada a aspiração e lavagem. Então foram

adicionados 50µl de reagente enzimático diluído (Estreptavidina-HRP) a cada poço. Foi feito o selamento da placa e a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A lavagem nesta etapa foi feita 7 vezes e os poços foram mergulhados por um minuto em tampão de lavagem. Posteriormente foram adicionados 50µl de solução de substrato TMB em cada poço. A incubação foi realizada sem o selador de placa durante trinta minutos à temperatura ambiente e isenta de luz. Por fim, foram adicionados 20µl de solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Packard ELISA reader, Packard Bioscience Company, Illinois, EUA) ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

#### 4.3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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



Figura 1 – Injeção de estreptozotocina via veia peniana do rato



Figura 2 – Abertura do 1º molar superior direito com a broca Ln



Figura 3 – Ligadura em torno do colo dentário do segundo molar superior esquerdo com fio de algodão nº 24





Figura 4 – Infecção periodontal induzida do lado esquerdo por meio de um fio de algodão em torno do segundo molar superior e endodôntica induzida do lado direito por meio da abertura coronária com a broca Ln, como nos grupos 4 e 8



Figura 5 – Coleta de sangue por meio de punção cardíaca.

# *Resultados*

**5.1. NÍVEIS DE GLICEMIA**

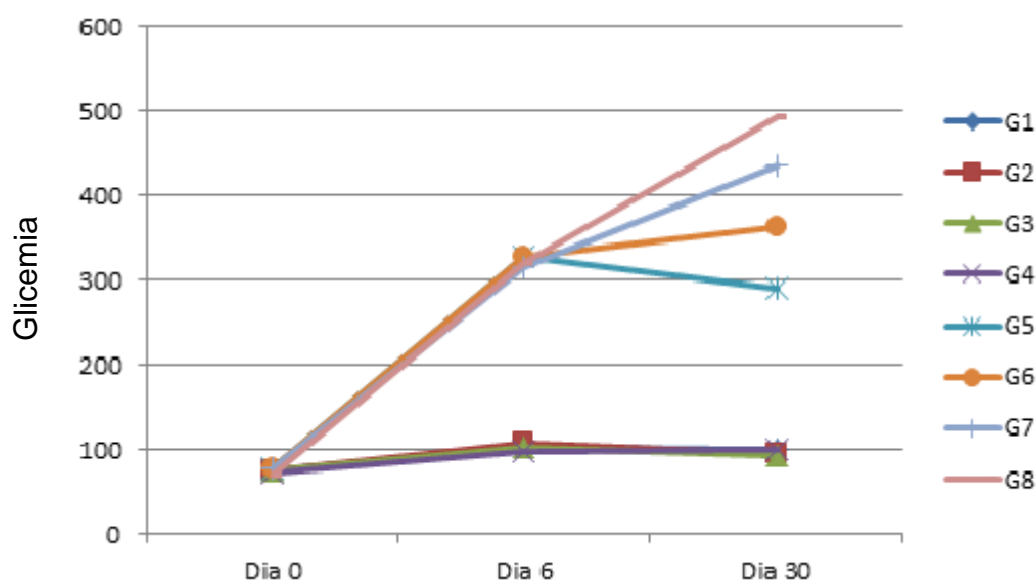
Os valores glicêmicos encontrados para os períodos pré-determinados (0, 6 e 30 dias) estão representados na tabela 2. Pode-se observar que no período inicial (0), em jejum, os ratos apresentavam valores glicêmicos semelhantes e abaixo de 100 mg/dL. Entretanto, no sexto dia após a indução da DM (dia 6) observou-se aumento significativo da glicemia de todos os ratos dos grupos submetidos à aplicação da estreptozotocina (Grupos 5 a 8).

**Tabela 2** – Média e desvio padrão do nível glicêmico nos diferentes grupos de acordo com os períodos de avaliação.

| <b>Nível sérico de glicose (mg/dL) ± Desvio Padrão*</b> |                                 |                                 |                                  |           |
|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------|
| <b>Grupos</b>   | <b>Dia 0</b>                    | <b>Dia 6</b>                    | <b>Dia 30</b>                    | <b>n</b>  |
| <b>G1</b>   | <b>075.2 ± 11.2<sup>a</sup></b> | <b>104.8 ± 09.9<sup>a</sup></b> | <b>101.3 ± 10.1<sup>a</sup></b>  | <b>10</b> |
| <b>G2</b>   | <b>075.0 ± 10.7<sup>a</sup></b> | <b>109.3 ± 06.9<sup>a</sup></b> | <b>096.8 ± 08.8<sup>a</sup></b>  | <b>10</b> |
| <b>G3</b>   | <b>076.2 ± 09.2<sup>a</sup></b> | <b>103.5 ± 12.1<sup>a</sup></b> | <b>094.5 ± 07.9<sup>a</sup></b>  | <b>10</b> |
| <b>G4</b>   | <b>074.6 ± 06.9<sup>a</sup></b> | <b>098.2 ± 05.8<sup>a</sup></b> | <b>100.4 ± 09.1<sup>a</sup></b>  | <b>10</b> |
| <b>G5</b>   | <b>077.7 ± 08.8<sup>a</sup></b> | <b>328.2 ± 37.8<sup>b</sup></b> | <b>291.8 ± 42.9<sup>b</sup></b>  | <b>10</b> |
| <b>G6</b>   | <b>077.4 ± 10.1<sup>a</sup></b> | <b>328.1 ± 46.1<sup>b</sup></b> | <b>364.3 ± 39.1<sup>bc</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G7</b>   | <b>078.4 ± 07.6<sup>a</sup></b> | <b>316.9 ± 38.4<sup>b</sup></b> | <b>436.5 ± 44.7<sup>cd</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G8</b>   | <b>071.8 ± 09.3<sup>a</sup></b> | <b>320.1 ± 40.4<sup>b</sup></b> | <b>492.8 ± 48.8<sup>d</sup></b>  | <b>10</b> |

\*Letras sobrescritas diferentes (a, b) em colunas representam diferença estatística (p<0.05).

No período final do experimento (dia 30) observou-se a manutenção da hiperglicemia nos grupos diabéticos (Grupos 5 a 8). Além disso, algumas alterações da glicemia em função das infecções orais foram observadas nos grupos diabéticos neste período (Gráfico 1).



**Gráfico 1** – Representação gráfica dos níveis médios de glicemia entre os grupos nos períodos análise.

Observou-se aumento do nível glicêmico com a presença das infecções orais nos ratos diabéticos (Tabela 2). A DP isolada (G7) ou associada à PA (G8) aumentou de forma significativa a glicemia de ratos diabéticos quando comparado com o grupo controle apenas diabético (G5). Apesar de demonstrar maior influência na glicemia, a DP isolada não foi diferente da PA isolada em ratos normoglicêmicos (G2 x G3) ou diabéticos (G6 x G7).

## 5.2. NÍVEIS DE IL-17

Os valores médios de IL-17 encontrados para cada grupo experimental, no período de 30 dias, estão contidos na tabela 3.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão dos valores de IL-17 em pg/mL por grupo

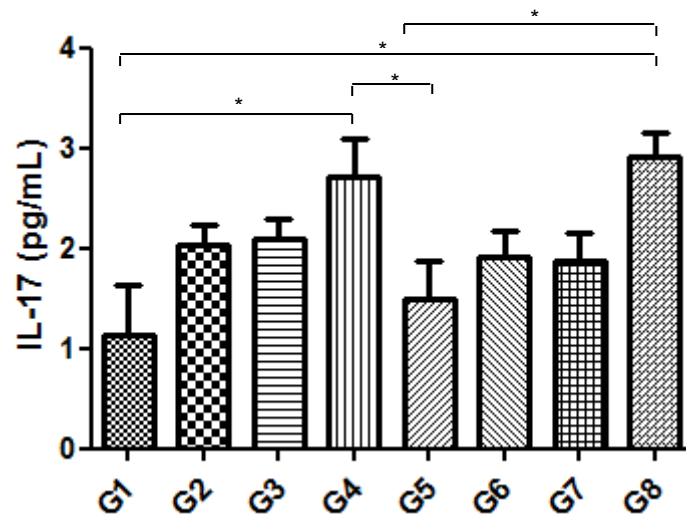
| <b>Grupo</b> | <b>IL-17 (pg/mL)</b>              | <b>N</b>  |
|--------------|-----------------------------------|-----------|
| <b>G1</b>    | <b>1.00 ± 0.99<sup>a</sup></b>    | <b>10</b> |
| <b>G2</b>    | <b>1.76 ± 0.99<sup>a, b</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G3</b>    | <b>2.08 ± 0.58<sup>a, b</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G4</b>    | <b>2.70 ± 0.78<sup>b</sup></b>    | <b>10</b> |
| <b>G5</b>    | <b>1.27 ± 0.85<sup>a</sup></b>    | <b>10</b> |
| <b>G6</b>    | <b>1.90 ± 0.78<sup>a, b</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G7</b>    | <b>1.87 ± 0.80<sup>a, b</sup></b> | <b>10</b> |
| <b>G8</b>    | <b>2.90 ± 0.68<sup>b</sup></b>    | <b>10</b> |

\*Letras sobrescritas diferentes (a, b) em colunas representam diferença estatística ( $p < 0.05$ )

Diante dos valores obtidos e da análise estatística pode-se observar a presença de IL-17 em níveis aumentados nos grupos com as doenças orais associadas quando comparados com os grupos sem infecções orais, independente da presença da DM ( $p = 0.000$ ).

A presença da DM isoladamente elevou o nível de IL-17, mas não de forma significativa ( $p > 0.05$ ). As PA e DP isoladas não influenciaram na concentração sérica de IL-17 ( $p > 0.05$ ). Houve diferença significativa entre o grupo 4 (ratos normais com PA e DP) quando comparados com o grupo 1 (ratos normoglicêmicos sem infecções orais), ( $p = 0.02$ ) e com o grupo 5 (ratos diabéticos sem infecções orais) ( $p = 0.008$ ). Além disso, ratos diabéticos com PA e DP (G8) também apresentaram concentração maior de IL-17 quando

comparados com os ratos normoglicêmicos sem infecções orais (G1) ( $p=0.01$ ) e com os ratos diabéticos sem infecções orais (G5) ( $p=0.008$ ). (gráfico 2).



**Gráfico 2** – Representação gráfica do nível de IL-17 entre os diferentes grupos.

G1: ratos normoglicêmicos; G2: ratos com PA; G3 ratos com DP; G4: ratos com PA e DP; G5: ratos com DM; G6: ratos com DM e PA; G7: ratos com DM e DP; G8: ratos com DM, PA e DP. Foram observadas diferenças entre os grupos G1 e G4, G1 e G8, G4 e G5, G5 e G8 ( $*p<0,05$ , teste de Tukey).

# *Díscussão*

Os ratos utilizados neste estudo apresentaram pesos corporais uniformes e eram normoglicêmicos. Após a indução da DM pela administração de estreptozotocina, a glicemia foi aproximadamente 3 vezes mais elevada em diabéticos do que nos não-diabéticos no período de 6 e 30 dias. Além disso, os ratos mostraram polidipsia e poliúria. O metabolismo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina é muito semelhante ao metabolismo de humanos diabéticos (Garber, et al., 2009).

Dois modelos de infecção oral foram utilizados no presente estudo. PA foi induzida pela exposição pulpar do primeiro molar superior direito de cada animal, com subsequente infecção bacteriana a partir do ambiente oral. Esta metodologia já foi descrita com sucesso em outros trabalhos (Garber et al. 2009, Cintra et al. 2012). DP foi induzida pela presença de uma ligadura em torno do dente, método geralmente usado também para este fim (Holzhausen et al. 2002).

No presente estudo, os níveis de glicose no sangue foram mais elevados nos ratos diabéticos do que nos ratos normoglicêmicos ( $p < 0,05$ ). Além disso, a presença de infecções orais associadas (DP e PA) aumentou o nível da concentração de glicose no sangue de ratos diabéticos ( $p < 0,05$ ). Essas descobertas sugerem que a PA e DP concomitantes podem reduzir o controle metabólico em diabéticos. Outros estudos também encontraram diferenças no nível de glicose em pacientes com DP e DM, (Moeintaghavi et al., 2012; Botero et al 2012) e, mostra-se ainda que o sucesso do tratamento periodontal ajuda a melhorar o metabolismo glicêmico (Moeintaghavi et al., 2012; Botero et al 2012).



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

Assim como ocorre na DP (Mendonça, et al., 2012), há um aumento local de IL-17 em PA (Xiong, Wei, Peng, 2008; Marçal, et al., 2010). E, já existem estudos mostrando que além do aumento local desta citocina na DP, há um aumento no nível sérico de IL-17 associado a esta doença periodontal agressiva em humanos, o que acaba potencializando doenças autoimunes como a DM (Gangadhar, Ramesh, Thomas, 2011). Tamanha a preocupação do efeito sistêmico deste mediador associado à DM, terapias anti-IL-17 têm sido propostas à pacientes hiperglicêmicos a fim de amenizar seu efeito deletério (Honkanen, et al., 2010; Wang, et al., 2011).

Com relação às infecções de origem endodôntica, este é o primeiro estudo quantificando a IL-17 sérica proveniente de PA. Em nossos resultados foi demonstrado que não houve diferença significativa no nível de IL-17 entre ratos diabéticos e não diabéticos. Este resultado está de acordo com outros estudos realizados em também em ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina (Tsai, et al., 2012; Silva, et al., 2012).

Embora o rato seja um modelo experimental de infecções orais bem estabelecido na literatura, podem acontecer diferenças nos resultados de acordo com diferentes metodologias empregadas (Serreze & Leiter, 1994). A estreptozotocina tem sido amplamente utilizada em pesquisas para desenvolver diabetes em ratos (Dirice, et al., 2011). A droga é levada para as

células por meio de receptores de GLUT2 devido à sua semelhança com a molécula de glicose, e é capaz de limitar a sua ação principalmente nas células beta pancreáticas. O seu efeito tóxico é exercido por meio de mecanismos, tais como a formação de óxido nítrico, alquilação e fragmentação do ADN (Yamamoto, Uchigata, Okamoto, 1981; Turk, et al., 1993).

Em um relato utilizando modelo animal induzido por estreptozotocina, foi mostrado que em diabéticos e não diabéticos portadores de DP houve um aumento de IL-17 nos primeiros 15 dias em que a lesão foi induzida, enquanto que nos períodos de 30 dias houve uma redução dos níveis de IL-17. Afirma-se que há presença deste mediador em quadros de doença periodontal, por um mecanismo secundário, já que esta resposta inflamatória parece se amenizar em um tempo de 30 dias, quando a lesão se cronifica (Silva, et al., 2012).

Confirmando esta hipótese, em uma avaliação local da presença de IL-17, foi demonstrado que lesões periapicais que podem experimentar um processo de exacerbação ou reagudecimento que são caracterizadas pela presença aumentada de IL-17, ou seja, há um aumento deste mediador em fases agudas (Colić, et al, 2007; Marçal, et al, 2010). Há na literatura ainda mais indícios que confirmem esta suposição. Embora uma das características da IL-17 seja a plasticidade, ou seja, a capacidade de regular tanto células Th1 quanto células Treg, de acordo com cada situação (Zhu & Paul, 2010), frente à agentes infecciosos a IL-17 está mais ligada à imunidade inata (Gaffen, et al., 2006), sendo esta interleucina diretamente relacionada com a presença de neutrófilos, células que desempenham papel inicial na inflamação, sendo uma das principais promotoras de danos teciduais (Bian, et al., 2012).

Também em nossos resultados, nem a PA, nem a DP isoladas provocaram aumento sérico significativo em um período de 30 dias quando comparados com ratos controle tanto no grupo de ratos diabéticos e quanto no grupo de ratos não diabéticos. Por outro lado, a PA associada à DP elevou o nível sérico da IL-17 após o período de 30 dias. Estes resultados sugerem que a PA é capaz de potencializar quadros de alterações inflamatórias sistêmicas quando associado à DP. Este aumento de IL-17 é presumivelmente destinado a acelerar a remoção da causa inflamatória original, no entanto isto pode ser prejudicial, conduzindo a propensão de danos teciduais frente à injúria causada inflamação. Pior ainda, se associarmos o aumento da IL-17 com o consequente aumento de neutrófilos, como mostra a literatura (Marçal, et al., 2010; Bian, et al., 2012), em um período tardio em que a inflamação já se encontraria em fase crônica, o organismo pode se mostrar vulnerável infecções, além de apresentar reações exacerbadas levando à consequências deletérias aos tecidos (Bian, et al., 2012).

Diante disso, percebe-se que em um período de 30 dias PA e DP isoladas não causam alteração no nível de IL-17. No entanto, quando a PA é associada à DP, há um aumento significativo, evidenciando sua interferência de forma sistêmica.

# *Conclusões*

## **VII - CONCLUSÕES**

---

Considerando as limitações do estudo pode-se concluir que:

1 – A presença da PA isolada não altera o nível glicêmico de ratos normoglicêmicos ou diabéticos no período de 30 dias.

2 - A presença da DP isolada não altera o nível glicêmico de ratos normoglicêmicos no período de 30 dias.

3 - A presença da DP isolada aumenta o nível glicêmico de ratos diabéticos no período de 30 dias.

4- A presença de PA e DP associadas aumentam o nível glicêmico de ratos diabéticos no período de 30 dias.

5- A DM não altera o nível sérico de IL-17 em ratos no período de 30 dias.

6- A PA ou a DP isoladas não alteram o nível sérico de IL-17 em ratos normoglicêmicos ou diabéticos no período de 30 dias.

7- A PA e DP associadas aumentam o nível sérico de IL-17 em ratos normoglicêmicos ou diabéticos em um período de 30 dias.

# *Referências*

## VIII - REFERÊNCIAS

---

1. Al-Khabbaz, Al-Shammari. Diabetes mellitus and periodontal health: dentists' knowledge. *Med Princ Pract.* 2011; 20(6): 538-44.
2. Amir J, Waite M, Tobler J, Catalfamo DL, Koutouzis T, Katz J, Wallet SM. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. *Cell Immunol.* 2011; 272(1): 45-52.
3. Ariza ME, Williams MV. A Human Endogenous Retrovirus K dUTPase Triggers a T(H)1, T(H)17 Cytokine Response: Does It Have a Role in Psoriasis? *J Invest Dermatol.* 2011; 131(12): 2419-27.
4. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003; 29(6): 383-9.
5. Bender IB, Seltzer S, Freedland JB. The relationship of systemic disease to endodontic failures and treatment procedures. *Oral Surg,* 1963; 1102–15.
6. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol.* 2012; 15, 188(2): 844-53.
7. Botero JE, Yepes FL, Roldán N, , Castrillón CA , Hincapie JP , Ochoa SP , Ospina CA , Becerra MA , Jaramillo A , Gutierrez SJ , Contreras A. Tooth and Periodontal Clinical Attachment Loss are Associated With Hyperglycemia in Diabetic Patients. *J Periodontol.* 2012; 83, 1245-50.
8. Brito, Teles,Teles, Totola, Vieira, Sobrinho. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. *J Endod.* 2012; 38(4): 481-485.
9. Busato IM, Ignácio SA, Brancher JA, Moysés ST, Azevedo-Alanis LR. Impact of clinical status and salivary conditions on xerostomia and oral health-related quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2012; 40 (1): 62-9.
10. Chen D, Hu Q, Mao C, Jiao Z, Wang S, Yu L, Xu Y, Dai D, Yin L, Xu H. Increased IL-17-producing CD4(+) T cells in patients with

- esophageal cancer. *Cell Immunol.* 2012; 272 (2): 166-74.
11. Cintra LT, DA Silva Facundo AC, MM Azuma, Sumida DH, RD Astolphi, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Investig Oral* . 2012.
  12. Colić M, Vasilijić S, Gazivoda D, Vučević D, Marjanović M, Lukić A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(4): 315-20.
  13. Colić M, Gazivoda D, Majstorović I, Dragicević A, Vasilijić S, Rudolf R, Milosavljević P, Vučević D. Immunomodulatory activity of IL-27 in human periapical lesions. *J Dent Res.* 2009; 88(12): 1142-7.
  14. De Moor RJ, Hommez GM, De Boever JG, Delme KI, Martens GE. Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population. *Int Endod J.* 2000; (33): 113-20.
  15. Deshpande K, Jain A, Sharma R, Prashar S, Jain R. Diabetes and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2010; 14(4): 207-12.
  16. Dirice E, Kahraman S, Elpek GO, Aydin C, Balci MK, Omer A, Sanlioglu S, Sanlioglu AD. TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY-applied NOD mice. *Exp Diabetes Res.* 2011; 625813.
  17. Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG, Abdulahad WH. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2011; 141(2): 197-204.
  18. Dugas NN, Lawrence HP, Teplitsky PE, Pharoah MJ, Friedman S. Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian populations. *Int Endod J.* 2003; (36): 181-92.
  19. Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod* 2008; (34): 273–9.
  20. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134(1): 43-51.



21. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ.* 2003; 67(4): 459-67.
22. Fukushima, Nashida, Haga-Tsujimura, Mataga. Chitinase expression in parotid glands of non-obese diabetic mice. *Oral Dis.* 2012; 18 (5): 506-12.
23. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(5): 613-9.
24. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2009; (9): 556-67.
25. Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm.* 2006; (74): 255-82.
26. Gangadhar V, Ramesh A , B Thomas . Correlation between leptin and the health of the gingiva: a predictor of medical risk. *Indianas J Res Dent.* 2011; 22 (4): 537-41.
27. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod.* 2009; 35, 60-2.
28. Guyton, AC. *Fisiologia médica.* 10ª ed. Guanabara Coogan, 2002.
29. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod.* 2011; 37(12): 1659-62.
30. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002; 73(9): 1030-6.
31. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T, Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010; 185(3): 1959-67.
32. Hungund S, Panseriya BJ. Reduction in HbA1c levels following non-surgical periodontal therapy in type-2 diabetic patients with chronic generalized periodontitis: A periodontist's role. *J Indian Soc Periodontol.* 2012 Jan;16(1):16-21.
33. Ide, Hoshuyama, Wilson, Takahashi, Higashi. Periodontal Disease and Incident Diabetes: a Seven-year Study. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 41-6.

34. Iqbal, Farhat Kazmi, Saad Asad, Muhammad Mumtaz, Yyaz Ali Khan. Dental caries & diabetes mellitus. *Pakistan Oral & Dental J.* 2011; (1): 31.
35. Isola, Lantini, Solinas, Diana, Isola, Loy, Cossu. Diabetes affects statherin expression in human labial glands. *Oral Diseases* 2011; 17 (7): 685–9.
36. Kai J, Puntambekar A, Santiago N, Lee SH, Sehy DW, Moore V, Han J, Ahn CH. A novel microfluidic microplate as the next generation assay platform for enzyme linked immunoassays (ELISA). *Lab Chip.* 2012; 12 (21): 4257-62.
37. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the cross roads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Immunol.* 2009; (2): 403-11.
38. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M. *Curr Diabetes Rev.* 2011; 1, 7(6): 433-9.
39. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod.* 2008; 34(10): 1211-4.
40. Leonardo MR. *Endodontia, tratamento de canais radiculares, princípios técnicos e biológicos.* 1ª ed, vol. 1. Artes Médicas, 2005.
41. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod.* 2011; 37(5): 598-601.
42. Manfredi, McCullough, Vescovi, Al-Kaarawi, Porter. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10(4):187-200.
43. Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes D, Araújo MS, Napimoga MH, Pereira SAL, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues Junior V, Rodrigues DBR. T-Helper Cell Type 17/Regulatory T-Cell Immunoregulatory Balance in Human Radicular Cysts and Periapical Granulomas. *J Endod.* 2010; (36): 995–9.
44. Marigo L, Cerreto R, Giuliani M, Somma F, Lajolo C, Cordaro M. Diabetes mellitus: biochemical, histological and microbiological aspects in periodontal disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;

- 15(7): 751-8.
45. Marotta, Fontes, Armada, Lima, Rocas, Siqueira. Type 2 Diabetes Mellitus and the Prevalence of Apical Periodontitis and Endodontic Treatment in an Adult Brazilian Population. *J Endod.* 2012; 38(3): 297-300.
  46. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, Xu L, Priatel JJ, Levings MK, Tan R. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010 1, 185 (7): 3814-8.
  47. Mealey & Ocampo. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007; (44): 127-53.
  48. Mendonça AC, Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Miranda TS, Feres M, Duarte PM. Surgical and non-surgical therapy with systemic antimicrobials for residual pockets in type 2 diabetics with chronic periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(4): 368-76.
  49. Mindiola MJ, Mickel AK, Sami C, Jones JJ, Lalumandier JA, Nelson SS. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. *J Endod.* 2006; 32(9): 828-32.
  50. Moeintaghavi A, Arab HR, Bozorgnia Y, Klanoush K, Alizadeh M. Non-surgical periodontal therapy affects metabolic control in diabetics: a randomized controlled clinical trial. *Aust Dent J.* 2012; 57(1): 31-7.
  51. Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, Kanamura N, Iwakura Y, Imanishi J, Kita M. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol Immunol.* 2009; 53(5): 287-94.
  52. Paes S.R.F.L, Ordinola-Zapata R, Húngaro Duarte M, Alvares Capelozza A. Prevalence of apical periodontitis detected in cone beam CT images of a Brazilian subpopulation. *Dentomaxillofac Radiol.* 2012.
  53. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J.* 1997; 47(2): 61-87.
  54. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetol.* 2012; 55(1): 21-31.
  55. Russell BG. The dental pulp in diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol*

- Scand. 1967; (70): 319–20.
56. 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.
  57. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(3): 369-74.
  58. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, López-López J, Martín-González J, Velasco-Ortega E, Sánchez-Domínguez B, López-Frías FJ. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Mar 1;17(2):e356-61.
  59. Segura-Egea JJ, Jiménez-Pinzón A, Ríos-Santos JV, Velasco-Ortega E, Cisneros-Cabello R, Poyato-Ferrera M. High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. *Inter Endodon J.* 2005; 38(8): 564–9.
  60. Serreze DV, Leiter EH. Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6 (6): 900-6.
  61. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89(9):943-7.
  62. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(1):4-14.
  63. Shimoe M, Yamamoto T, Iwamoto Y, Shiomi N, Maeda H, Nishimura F, Takashiba S. Chronic periodontitis with multiple risk factor syndrome: a case report. *J Int Acad Periodontol.* 2011; 13(2): 40-7.
  64. Silva JA, Ferrucci DL, Peroni LA, Abrahão PG, Salamene AF, Rossa-Junior C, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Sequential IL-23 and IL-17 and increased Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an experimental model of periodontal disease in type 1

- diabetes. *J Cell Physiol.* 2012; 227(6): 2441-50.
65. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J D Res.* 2007; (86): 306-19.
  66. Simoni Y, Gautron AS, Beaudoin L, Bui LC, Michel ML, Coumoul X, Eberl G, Leite-De-Moraes M, Lehuen A. NOD mice contain an elevated frequency of iNKT17 cells that exacerbate diabetes. *Eur J Immunol.* 2011; 41 (12): 3574-85.
  67. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ, Qin GM. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Intern Med.* 2011; 50(15): 1569-74.
  68. Surendar J, Mohan V, Pavankumar N, Babu S, Aravindhan V. Increased levels of serum granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with activated peripheral dendritic cells in type 2 diabetes subjects (CURES-99). *Diabetes Technol Ther.* 2012; 14(4): 344-9.
  69. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008; 14(3): 191-203.
  70. Triñanes J, Salido E, Fernández J, M Rufino, González-Posada JM, Torres A, Hernández D. Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation. *Diabetes Care* . 2012; 35 (2): 427-33.
  71. Tsai PH, Yeh CL, Liu JJ, Chiu WC, Yeh SL. Effects of dietary glutamine on inflammatory mediator gene expressions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutrition.* 2012; 28(3): 288-93.
  72. Turk J, Corbett JA, Ramanadham s, Bohrer A, Mcdaniel ML. . Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Resear Com.* 1993; 197 (3): 1458-1464.
  73. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP.

- Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod.* 2011; 37(1): 1-5.
74. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod.* 2009; 35(2): 216-20.
  75. Yamamoto H, Y Uchigata, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature.* 1981; 294(5838): 284-6.
  76. Yu X, Ibrahim SM. Evidence of a role for Th17 cells in the breach of immune tolerance in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011; 31, 13(5): 132.
  77. Yuji Inagaki, Yoshida, Ohba, Seto, Kido, Haneji, Nagata. High Glucose Levels Increase Osteopontin Production and Pathologic Calcification in Rat Dental Pulp Tissues. *J Endod.* 2010; 36(6): 1014–20.
  78. Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, Zhao Y. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl).* 2011.
  79. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(6): 509-16.
  80. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 2010; 20:4–12.