

Caroline Cristina Gomes Toledo

Avaliação periodontal clínica, expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6  
e dos níveis de colesterol e triglicérides em pacientes  
com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite.

Brasília  
2021



Caroline Cristina Gomes Toledo

Avaliação periodontal clínica, expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e dos níveis de colesterol e triglicerídeos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães

Co-orientador: Ms. Mariana Caldas de Oliveira Mattos

Brasília  
2021



## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a graça de cursar Odontologia e por ter me dado força para enfrentar os obstáculos no caminho.

A Virgem Santíssima por ter me dado consolo e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis durante essa trajetória.

Aos meus pais por terem me educado, me ensinado a ser forte e sempre perseverar e lutar pelos meus objetivos. E também por terem proporcionado todas as oportunidades para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

Ao meu irmão, Paulo Victor, por ter me apoiado e me ajudado a tornar mais leve essa jornada acadêmica.

Aos meus colegas de curso que me proporcionaram tantos momentos felizes e por terem compartilhado momentos únicos comigo.

A professora Maria do Carmo, por ter sido uma orientadora atenciosa, além de ter partilhado tantos ensinamentos e conselhos importantíssimos para minha vida acadêmica e pessoal.

A Universidade de Brasília e ao departamento de Odontologia pela oferta de um curso de excelência.



## EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin





## RESUMO

Toledo, Caroline Cristina Gomes. Avaliação periodontal clínica, expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e dos níveis de colesterol e triglicerídeos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Objetivos:** analisar a expressão de citocinas pró-inflamatórias na saliva e plasma, relacionar com níveis de colesterol e triglicerídeos e associar aos parâmetros clínicos periodontais de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite, comparando esses dados com os demais grupos: controle, periodontite e DMT2.

**Metodologia:** Após aprovação do Comitê de Ética, 46 pacientes foram avaliados nos grupos: controle-CT (10), diabetes-DM (09), diabetes e periodontite-DMP (16) e periodontite-P (11). Após coleta de saliva e hemograma completo, IL-6 e TNF- $\alpha$  presentes na saliva foram dosadas pelo método CBA.

**Resultados:** O grupo DMP, apresentou porcentagem expressiva de alteração dos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL em comparação aos controles. Sobre a expressão de IL-6, no plasma, foi significativa, no grupo DMP. Enquanto, no grupo DM, a expressão de TNF- $\alpha$  foi considerável comparada aos outros grupos. O grupo P teve expressão de IL-6, na saliva, superior a DMP. As médias PS, ISS, IPV e NIC do grupo P foram superiores ao DMP.

**Conclusão:** Verificou-se que alterações na expressão de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 na saliva e no plasma podem afetar lipidograma, sugerindo possível associação entre a gravidade da periodontite e do diabetes. No entanto, mais estudos são necessários.

**Palavras-Chaves:** Periodontite, Diabetes, Hiperlipidemia.



## ABSTRACT

Toledo, Caroline Cristina Gomes. Clinical periodontal evaluation, expression of TNF –  $\alpha$ , IL-6 and cholesterol and triglyceride levels in patients with type 2 diabetes mellitus with periodontitis. 2021. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

**Objectives:** to analyze the expression of pro-inflammatory cytokines in saliva and plasma, to relate to cholesterol and triglyceride levels and to associate with periodontal clinical parameters of patients with type 2 diabetes mellitus and periodontitis, comparing these data with the other groups: control, periodontitis and DMT2.

**Methodology:** After approval by the Ethics Committee, 46 patients were evaluated in the following groups: control-CT (10), diabetes-DM (09), diabetes and periodontitis-DMP (16) and periodontitis-P (11). After saliva collection and complete blood count, IL-6 and TNF- $\alpha$  present in the saliva were measured by the CBA method.

**Results:** The DMP group showed a significant percentage of altered levels of triglycerides and LDL cholesterol compared to controls. On the expression of IL-6 in plasma, it was significant in the DMP group. While, in the DM group, the expression of TNF- $\alpha$  was considerable compared to the other groups. Group P had an IL-6 expression in the saliva higher than DMP. The PD, CAL, BOP and VPI means of group P were higher than the DMP.

**Conclusion:** It was found that alterations in the expression of pro-inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 in saliva and plasma, can affect lipid profile, suggesting a possible association between the severity of periodontitis and diabetes. However, more studies are needed.

**Keywords:** Periodontitis, Diabetes, Hyperlipidemia.



## SUMÁRIO

Artigo Científico .....	15
Folha de Título .....	38
Resumo .....	40
Abstract .....	42
Introdução.....	44
Material e métodos.....	46
Resultados.....	50
Discussão .....	58
Conclusão.....	62
Referências .....	64
Anexos.....	69
Normas da Revista.....	69



## ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

Toledo, Caroline Cristina Gomes. Guimarães, Maria do Carmo Machado. Mattos, Mariana Caldas de Oliveira. Avaliação periodontal clínica, expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e dos níveis de colesterol e triglicerídeos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite. 2021. Apresentado sob as normas de publicação do Revista Journal of Clinical Periodontology.

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada a biofilmes de placa disbiótica e caracterizada por destruição do aparelho de suporte dentário. Suas características principais incluem a perda de suporte do tecido periodontal, manifestada através de perda de inserção clínica e alveolar avaliada radiograficamente pela perda óssea, presença de bolsa periodontal e sangramento gengival. (Papanou NP. et al., 2018) Eventualmente, a perda de suporte dentário leva à mobilidade e perda dentária. Diversos fatores sistêmicos são conhecidos por serem fatores agravantes da doença periodontal e, entre esses, o Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) é o prevalente. (Lindhe J. et al., 2018)

O Diabetes Mellitus tipo 2 e a doença periodontal mantêm estreita relação biológica e fisiológica, uma vez que, ambas as condições compartilham mecanismos comuns de patogênese relacionados a respostas imunoinflamatórias alteradas em níveis locais e/ou sistêmicos. Desse modo, diversos estudos indicaram que indivíduos com controle glicêmico pobre, conseqüentemente apresentam maior destruição dos tecidos periodontais. (Bazyar H. et al. 2020). Devido a isso, trabalhos recentes concluíram que o tratamento periodontal está relacionado à redução da carga inflamatória em pacientes com periodontite e DMT2, resultando em benefícios no controle glicêmico. (Artese HP. et al. 2014).

Visando a melhor compreensão dos fatores etiológicos imunológicos da doença periodontal e seu vínculo com o diabetes, é essencial entender a atuação dos mediadores inflamatórios nessas condições. A expressão de mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e o Fator Tumoral de Necrose alfa – TNF- $\alpha$ , dentre outros, produzidos nos tecidos gengivais, pode se propagar pelo sistema circulatório. (Leite ACE.



et al. 2015). Deste modo, é possível que a terapia mecânica periodontal em nível local seja refletida em nível sistêmico.

Além disso, os níveis de mediadores inflamatórios como: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em pacientes com DMT2 e periodontite, apresentam-se elevados quando comparados a pacientes diabéticos sem doença periodontal, podendo afetar adversamente a glicemia e o metabolismo lipídico desses pacientes. (Bazyar H. et al. 2020).

Nos últimos anos, surgiram muitos estudos que associam DMT2 e periodontite à hiperlipidemia. Essa associação com a diabetes mellitus tipo 2 pode ser compreendida, pois indivíduos com resistência à insulina, a lipase é inibida e, isto parece explicar os altos níveis de triglicerídeos neles observados (Howard B.V., 1999). Já a associação com a doença periodontal, por sua vez, ocorre como consequência dos desafios infecciosos causados por bactérias Gram-negativas, patógenos da periodontite, que induzem quadros de bacteremia e endotoxemia e elevam a produção de citocinas pró-inflamatórias séricas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Tal elevação inibe a ação da lipase e provoca alterações no perfil lipídico. (Siddharth G. et al. 2019). Em outras palavras, os indivíduos com DMT2 e periodontite, provavelmente apresentarão distúrbios no metabolismo lipídico, incluindo quantidades aumentadas de colesterol sérico e LDL. (Feingold, K.R et al. 1992).

Ademais, as citocinas são mediadores inflamatórios e possuem diversas funções relatadas no metabolismo da periodontite, do diabetes e dos lipídios: Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periodontais são associados com o risco de periodontite devido aos efeitos destrutivos teciduais e com a resistência à insulina e o risco de diabetes. Além disso, exercem efeitos no metabolismo dos lipídios afetando a produção de

outras citocinas, resultando em elevados níveis de ácidos graxos livres, LDL e triglicerídeos. (Zhou X. et al. 2014).

Com a finalidade de avaliar o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico, que consiste em raspagem, alisamento radicular, instrução de higiene oral e remoção de fatores retentores de biofilme, em pacientes com DMT2, periodontite e distúrbios no metabolismo lipídico, Siddharth G. et al. 2019, desenvolveram uma revisão sistemática e concluíram que os pacientes submetidos ao tratamento periodontal apresentaram redução dos níveis séricos de colesterol, LDL e HDL além da diminuição das taxas glicêmicas e dos parâmetros periodontais. D’Aiuto, et al., 2018, observaram que, sem terapia de suporte periodontal, houve recolonização pela microbiota subgingival patogênica e inflamação subsequente; e o estudo de Sbordone L. et al., 1990, demonstrou a importância de um programa regular de manutenção periodontal, com o objetivo de minimizar a recolonização das superfícies dentárias com patógenos periodontais e, conseqüentemente, manter o controle da glicemia e do perfil lipídico desses pacientes.

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de citocinas pró-inflamatórias na saliva e no plasma, relacionar com níveis de colesterol e triglicerídeos, associar aos parâmetros clínicos periodontais de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite e comparar esses dados com os demais grupos: controle, periodontite e DMT2.

## MATERIAL E MÉTODOS

O atendimento clínico e coleta de amostras dos participantes da pesquisa foi realizado na Clínica Odontológica do Hospital Universitário de Brasília, UnB. A fase laboratorial do projeto foi realizada no laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Medicina – FM e o ensaio de citometria de fluxo ou de ensaios imunoenzimáticos para dosagem de IL-6 e TNF-  $\alpha$  foi feita no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina de Brasília.

Os indivíduos foram informados, verbalmente e por escrito, sobre o objetivo do estudo e, após a concordância em participar, foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O número de registro para ensaios clínicos foi obtido no *sítio* de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos do Ministério da Saúde (DECIT/MS). Após a aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE 46609515.7.0000.0030), em conformidade com as leis brasileiras e com a Declaração de Helsinki, a pesquisa foi iniciada. O tipo de amostragem se deu por conveniência e, deste modo, a amostra do estudo (n=46) foi dividida em quatro grupos: grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP=16); grupo de pacientes com apenas diabetes mellitus (DM=9); grupo de pacientes com apenas periodontite (P=11) e grupo controle (CT=10).

Os critérios de inclusão para pacientes com periodontite foram: presença de, no mínimo, doze dentes; diagnóstico clínico e radiográfico de periodontite em dois ou mais dentes não adjacentes, além de idade maior ou igual a 30 anos. O grupo controle foi composto de indivíduos com idade superior ou igual a 30 anos, saudáveis sistemicamente, com o periodonto saudável clínica e radiograficamente e com presença de, no mínimo, 20 dentes (com profundidade de sondagem clínica igual ou menor a 3mm, nível de inserção clínico igual ou menor a 3mm, <10% dos sítios com sangramento à sondagem. Para participantes do grupo diabetes, o diagnóstico clínico do diabetes tipo 2 foi efetuado por médico especialista. É importante ressaltar que, na época da seleção dos pacientes, a doença periodontal foi classificada de acordo com a classificação das doenças periodontais publicada em 1999 (Armitage GC., 1999) tendo em vista que a avaliação periodontal da amostra foi feita antes de 2018. No entanto, os parâmetros periodontais utilizados se encaixaram em:  $\geq$  estágio III, graus A, B ou C, de acordo com os níveis de hemoglobina glicada, e profundidade de sondagem  $\geq$  4mm), conforme os critérios estabelecidos na nova classificação das doenças periodontais. (Tonetti MS. et al., 2018).

Os critérios de exclusão consistiram em tratamento periodontal prévio nos últimos 12 meses; uso continuado de medicamentos como antimicrobianos, imunomoduladores ou anti-inflamatórios nos últimos 12 meses; doenças sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, com exceção do diabetes para o grupo teste, como HIV, desordens imunológicas, obesidade mórbida [IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>] ou abaixo do peso [mal nutridos IMC < 18,5 kg/m<sup>2</sup>] gestantes ou lactantes, tabagista; indivíduos com idade < 30 anos e etnias indígenas (Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, 1998). Todos os participantes foram submetidos à entrevista com a finalidade de coletar informações

médicas e demográficas, como idade, sexo e uso de tabaco. Foi considerado não fumante, o indivíduo que nunca tivesse fumado ou que tivesse parado de fumar há mais de cinco anos. Examinadores experientes e calibrados conduziram o exame clínico e registraram seis sítios por dente (vestibular, méso-vestibular, disto-vestibular, lingual, méso-lingual e disto-lingual) com o auxílio de uma sonda periodontal Michigan O com marcações de Williams (Millenium, Brasil). Os parâmetros periodontais coletados foram profundidade de sondagem, nível de inserção, índice de placa visível e índice de sangramento gengival proposto por Ainamo e Bay (Ainamo, Bay, 1975).

Os participantes foram examinados clinicamente e radiograficamente no momento inicial. O exame radiográfico foi executado pela técnica do paralelismo. Todas as medidas de biossegurança exigidas para o atendimento odontológico foram tomadas, a saber: uso de luvas, óculos de proteção, gorros, máscaras, aventais, material esterilizado ou descartável, bem como as medidas de radioproteção (filmes sensíveis, aventais de chumbo nos pacientes e biombos de chumbo). Em todos os indivíduos, foi feita coleta de 40 mL de sangue periférico no laboratório de análises clínicas do HUB para hemograma completo, níveis de colesterol LDL, HDL e triglicerídeos. Em parte da coleta do sangue venoso, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo ou ensaios imunoenzimáticos para dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Foi utilizado o *Kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* da *BD Biosciense (BD™ Cytometric Bead Array-CBA, USA)*, de acordo com o manual de instrução. As amostras de soro foram diluídas em série e depois encubadas com os *capture beads* do *Kit CBA*, após serem processados na centrífuga e utilizadas no método de citometria de fluxo para mensurar quantitativamente a dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$  através de intensidades de fluorescência distintas. Para a análise dos dados do citômetro de fluxo *BD FACS Verse* foi

utilizado o programa *FCAP Array software* de acordo com o guia *Guide to Analyzing Data from BD CBA Kits Using FCAP Array Software*.

O perfil lipídico foi analisado pelo método soro/esterase – oxidase, homogêneo direto, oxidase – peroxidase e Fórmula de Friedevald, no qual o colesterol LDL teve limite inferior a 100 mg/dL, o HDL superior a 60 mg/dL e os triglicerídeos abaixo de 150 mg/dL.

A análise estatística foi realizada por meio do *software Prism® 8.4.2* (GraphPad, USA). A normalidade das amostras foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre as amostras foi feita por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon e Mann-Whitney, após a verificação da normalidade ou anormalidade, além disso, foi realizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância foi pré-determinado em 05% ( $p < 0,05$ ). As variáveis, quando possível, foram apresentadas em média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os seguintes critérios foram analisados: 1) Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros clínicos periodontais, expressão de IL-6 e TNF-  $\alpha$  e as características hematológicas (níveis de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos) dos quatro grupos.

Os recursos para o kit de citocinas foram obtidos pelo Processo CNPq, Chamada: Universal 01/2016 - Faixa B proposta 422070/2016-5.

## RESULTADOS

### ▪ **Análise do perfil demográfico dos pacientes:**

A tabela 1 apresenta a número de homens e de mulheres em cada grupo analisado e a também a média de idade dos grupos.

	<b>Periodontite(P)</b>	<b>Controle (CT)</b>	<b>Diabetes Mellitus (DM)</b>	<b>Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP)</b>
<b>Homens/Mulheres</b>	5/6	2/8	2/7	10/6
<b>Média de idade</b>	45,4	42,0	49,0	51,9

Tabela 1 – Análise do perfil demográfico dos pacientes .

▪ **Expressão de mediadores pró-inflamatórios na saliva:**

A média da expressão do fator tumoral de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ) encontradas na saliva do grupo controle (CT) foi de 1,84 pg/ml; grupo periodontite (P) - 2,48 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM) - 7,22 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP) - 2,58 pg/ml.

As médias da expressão de interleucina 6 (IL-6) na saliva foram: grupo controle (CT) - 21,08 pg/ml; grupo periodontite (P)- 38,01 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 69,21 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 32,60 pg/ml.

As médias das expressões do TNF- $\alpha$  e da IL-6 na saliva estão descritas no gráfico 1.

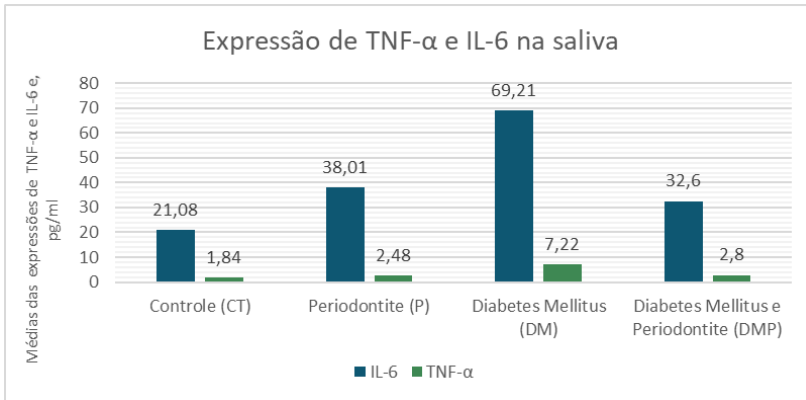


Gráfico 1 – Média das expressões da interleucina 6 (IL-6) e do Fator tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) dos grupos: controle (CT), diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP) na saliva.

#### ▪ Expressão de mediadores pró-inflamatórios no plasma

A média da expressão do fator tumoral de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ) encontradas no plasma do grupo controle (CT) foi 0,04 pg/ml; grupo periodontite (P)- 0,29 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 0,15 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 0,44 pg/ml.

A média da expressão de interleucina 6 (IL-6) no plasma foi: grupo controle (CT)-1,24 pg/ml; grupo periodontite (P)- 0,59 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 0 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 1,26 pg/ml.

A média de expressão do TNF- $\alpha$  e da IL-6 no plasma estão descritas no gráfico 2.



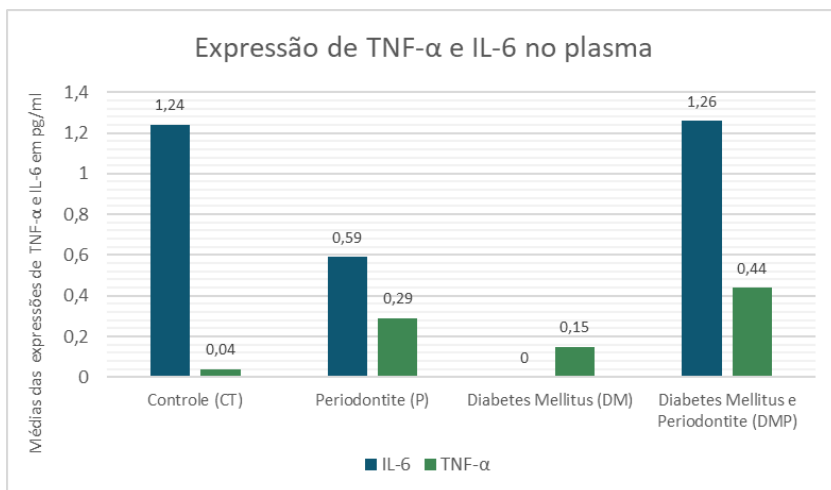


Gráfico 2 - Média das expressões da interleucina 6 (IL-6) e do Fator tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) dos grupos: controle (CT), diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP) no plasma.

A análise dos resultados das amostras coletadas de plasma e de saliva dos pacientes possibilitou algumas constatações.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, na saliva, entre os grupos analisados. Entretanto, os grupos periodontite (P) e Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP) apresentaram diferença estatística entre si, na análise salivar, no qual o grupo P apresentou a maior expressão de IL-6 na saliva.

Similarmente, não houve diferença estatística entre as amostras examinadas de TNF- $\alpha$  no plasma. Contudo, existiu diferença estatística significativa nas amostras de IL-6, no plasma, entre os grupos periodontite (P) e Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP), em que o grupo DMP apresentou a maior expressão.

## ▪ Análise do perfil lipídico

### - Triglicerídeos

A média dos níveis de triglicerídeos nos grupos foi: grupo controle (CT) – 93,0 mg/dL; Diabetes Mellitus (DM) – 129mg/dL; Periodontite (P) – 117 mg/dL; Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP) – 198,5 mg/dL.

### - Colesterol total

A média dos níveis de colesterol total nos grupos foi: CT – 188,5 mg/dL; DM – 174,8 mg/dL; P – 185,3 mg/dL e grupo DMP – 194,6 mg/dL.

### - Colesterol HDL

A média do colesterol HDL nos grupos foi: CT – 52,80 mg/dL; DM – 48,11 mg/dL; P – 52,55 mg/dL e DMP – 46,53 mg/dL.

### - Colesterol LDL

A média de colesterol LDL nos grupos foi: CT – 114,9 mg/dL; DM – 89,33 mg/dL; P – 108,2 mg/dL e DMP – 106,8 mg/dL.

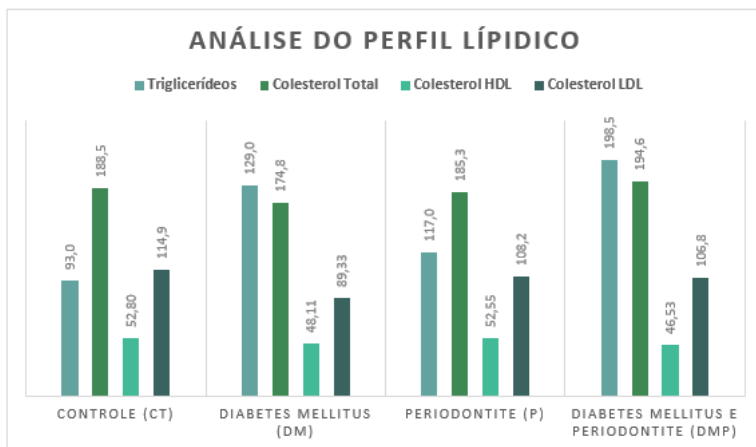


Gráfico 3 – Análise dos níveis de triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL em mg/ dL dos grupos controle (CT),

diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP).

Analisando os níveis de triglicérides entre os grupos, foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ao comparar a expressão de triglicérides entre os grupos diabetes mellitus e periodontite (DMP) e o grupo periodontite (P), observou-se diferença estatística, na qual o grupo DMP apresentou a maior expressão. Também se observou diferença estatística entre os grupos controle (CT) e diabetes mellitus e periodontite (DMP), em que DMP apresentou níveis elevados de triglicérides.

Sobre as análises de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

- **Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF-  $\alpha$**

Observou-se correlação positiva na avaliação plasmática dos grupos P e DMP entre o TNF-  $\alpha$  e o HDL e na avaliação salivar do grupo P entre o TNF-  $\alpha$  e o colesterol HDL. (Ver nos Gráficos 4 e 5)

### XY data: Correlation of ANÁLISE DE IL- GRUPO P (S)

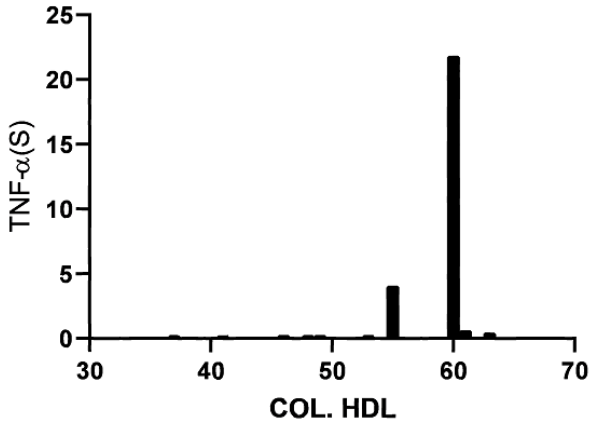


Gráfico 4 – Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF-  $\alpha$  na avaliação salivar do grupo periodontite (P).

### XY data: Correlation of ANÁLISE DE IL- GRUPO DMP (P)

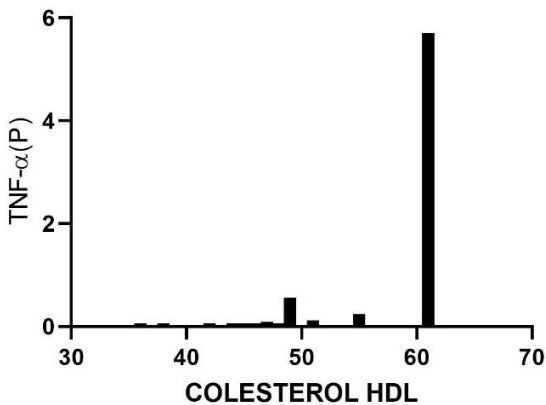


Gráfico 5 – Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF- $\alpha$  na avaliação plasmática do grupo Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP).

### ▪ Avaliação clínica periodontal

Sobre a avaliação clínica periodontal foram calculadas as médias dos seguintes parâmetros clínicos periodontais: índice de sangramento a sondagem (ISS), índice de placa visível (IPV) e número de dentes ausentes.

- **Média do índice de sangramento a sondagem (ISS):** P – 43,22% e DMP – 31,55%.

- **Média do índice de placa visível (IPV):** P – 80,13% e DMP – 51,23%.

- **Média de dentes ausentes:** P – 8,9; CT – 5,7; DM – 11 e DMP – 7,25.

	Periodontite(P)	Controle (CT)	Diabetes Mellitus (DM)	Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP)
<b>Índice de sangramento a sondagem</b>	43,22%	-	-	31,55%
<b>Índice de Placa Visível</b>	80,13%	-	-	51,23%
<b>Dentes ausentes</b>	8,9	5,7	11	7,25

Tabela 2 – Média dos parâmetros clínicos avaliados nos grupos.

Observa-se que o grupo periodontite apresentou níveis de ISS e IPV superiores ao grupo DMP. Além disso, o grupo diabetes mellitus teve uma maior média de dentes ausentes quando comparadas aos demais grupos.

Com relação à análise das médias dos parâmetros clínicos periodontais, dos grupos diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP) e periodontite (P), obteve-se os respectivos valores: profundidade de sondagem (PS): 2,31 mm e 2,7mm; nível de inserção clínica (NIC): 3,3 mm e 3,67 mm; recessão gengival (REC): 2,2 mm e 2,14 mm.

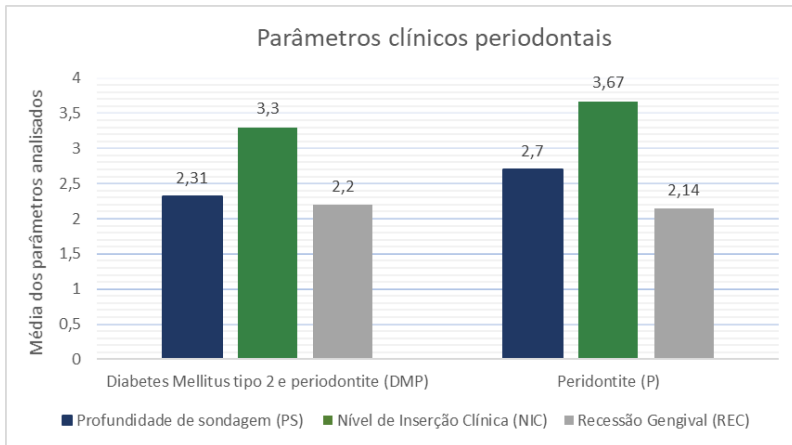


Gráfico 6 – Análise dos parâmetros clínicos periodontais dos grupos diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP) e periodontite (P).

Ao analisar os parâmetros cínicos periodontais, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, o grupo periodontite apresentou médias de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) maiores quando comparado ao grupo DMP. Relacionando isso à expressão de IL-6 na saliva, notou-se que o grupo periodontite exibiu níveis superiores aos do grupo DMP. A piora dos parâmetros periodontais no grupo P poderia ser justificada pela maior expressão da IL-6 na saliva nesse mesmo grupo, contudo, é importante ressaltar que não houve diferença estatística entre os parâmetros periodontais entre os grupos relacionados.

Nenhuma variação foi encontrada entre os níveis de TNF-  $\alpha$  na saliva, na presença de apenas periodontite ou na presença DMT2 com periodontite, sugerindo ausência de qualquer relação direta entre essas doenças e os níveis de TNF- $\alpha$ .

## DISCUSSÃO

A interleucina 6, citocina pró-inflamatória, desempenha papel crítico na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e localmente na doença periodontal. Estudos de biomarcadores mostram associações de níveis sistêmicos elevados de IL-6 com maior incidência de doença cardiovascular (Clarke R. et al., 2018). Além disso, a liberação excessiva de IL-6 localmente, na cavidade bucal, provoca a destruição do tecido ósseo por amplificação da cascata pró-inflamatória por meio da estimulação da atividade osteoclástica e o crescimento de bactérias periodontopatogênicas (Bennermo M. et al., 2004). Diante disso, observa-se que níveis elevados de interleucina 6 na saliva estão relacionados com aspecto clínico periodontal mais agravado.

De acordo com os resultados, houve diferença estatística significativa nas amostras de saliva de IL-6 entre os grupos periodontite (P) e o grupo Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP), sendo que o grupo periodontite apresentou a maior expressão. A maior expressão de IL-6 em pacientes com apenas periodontite, é compreensível, pois, essa citocina apresenta papel fundamental como mediadora pró-inflamatória nos tecidos gengivais durante o processo infeccioso decorrente da doença periodontal. (Leite ACE et al. 2015).

Além do presente estudo, outros estudos também observaram que pacientes com diabetes mellitus tipo 2, apresentam altos níveis de mediadores inflamatórios sistêmicos. E condições

inflamatórias elevadas como a hiperglicemia levam a complicações microvasculares e macrovasculares podem potencializar a gênese do estresse oxidativo, apoptose celular e inflamação. No diabetes e na obesidade, demonstram níveis aumentados de IL-6 e TNF- $\alpha$ . A IL-6 e o TNF- $\alpha$  são importantes indutores de proteínas de fase aguda e têm a capacidade de prejudicar a sinalização intracelular da insulina, contribuindo predominantemente para a resistência à insulina.(Jain, P. Et al., 2021). A periodontite também está associada a níveis elevados de PCR e IL-6 com níveis variáveis de IL-6 acompanhados com progressão da doença. (Nguyen, A.T.M. et al., 2020). Assim, a inflamação sistêmica associada à periodontite agrava o estado diabético.

Ao avaliar os níveis de triglicerídeos entre os grupos foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Comparando os grupos DMP e P, constatou-se diferença estatística, sendo que o grupo DMP apresentou maior expressão. Também foi observada diferença estatística entre os grupos CT e DMP, sendo observados maiores níveis de triglicerídeos no grupo DMP. Estudos mostraram que, em humanos, condições inflamatórias agudas e aumento dos níveis circulantes de interleucinas levam à hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia. Tendo em vista que, tanto a periodontite quanto o Diabetes Mellitus são condições inflamatórias, os dados encontrados nesse estudo em que os grupos DM, DMP e P apresentaram níveis elevados de triglicerídeos são justificados.

O colesterol HDL possui efeito protetor atribuído principalmente ao seu papel no transporte reverso do colesterol, removendo o excesso de colesterol dos tecidos e células com o intuito de reduzir os níveis séricos de LDL (Woudberg NJ et al., 2017). Além de seus efeitos antioxidantes, o HDL também regula negativamente a expressão de moléculas de adesão endotelial



para exercer seu efeito anti-inflamatório (Woudberg NJ. et al., 2016). De acordo com Xu et al.,2020, a disfunção do colesterol HDL pode representar um novo mecanismo que relaciona a inflação com a progressão da doença periodontal. E isto, indicou potenciais estratégias diagnósticas e terapêuticas envolvendo a modificação de HDL que pode beneficiar os pacientes com doença periodontal (Xu et al.,2020).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foi descoberto, em 1975, por Carswell et al. e, é considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos constitui o principal estímulo para que seja secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos. (Vitale RF. et al., 2007). Desse modo, está diretamente relacionado com a periodontite, por ser decorrente de uma infecção local por bactérias Gram-negativas associada à resposta exacerbada do hospedeiro. (Yong-Wei Fu et al. 2015).

A partir das análises de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). No entanto, observou-se correlação positiva no grupo de avaliação salivar entre TNF- $\alpha$  e o colesterol HDL no grupo periodontite e, no grupo DMP, na análise do plasma.

Adicionalmente, as partículas de colesterol HDL possuem propriedades protetoras e anti-inflamatórias contra microrganismos por diversas vias bioquímicas. (Bernardi S. et al. 2018) Fentoğlu et al, 2011 demonstraram correlação positiva entre a taxa de colesterol total/HDL e o índice gengival e sugeriram que a hipercolesterolemia é um sinal patognomônico para a doença periodontal. Os mesmos autores reportam que citocinas como o TNF- $\alpha$  induzem rápido aumento nos níveis séricos de colesterol, entretanto, o mecanismo que rege esse

aumento é desconhecido. É possível inferir que o aumento que de TNF-  $\alpha$  e de colesterol HDL em pacientes com apenas periodontite é compreendido diante da atuação de ambos durante o processo infeccioso, TNF-  $\alpha$  como mediador pró-inflamatório e o colesterol HDL, agente anti-inflamatório.

Estudos mostram que esses mediadores alteram a atividade de leucócitos e osteoblastos-osteoclastos e promovem a remodelação tecidual local e sistêmica. (Martínez-Aguilar et al. 2019). Relacionando essa constatação aos parâmetros periodontais e à expressão da interleucina 6 (IL-6), citocina pró-inflamatória, na saliva, percebeu-se que o grupo periodontite também teve expressão aumentada desse mediador pró-inflamatório. Assim, foi possível inferir que a manifestação clínica agravada dos pacientes do grupo P, pode ser justificada pelos elevados níveis de IL-6 na saliva.

A respeito da expressão de TNF-  $\alpha$ , na saliva, nos pacientes com apenas periodontite e periodontite com DMT2, não foram encontradas alterações, sugerindo que há ausência de qualquer relação direta entre a progressão dessas doenças e os níveis de TNF- $\alpha$ . (Martínez-Aguilar VM. et al. 2019).

Ao analisar os parâmetros clínicos periodontais, observou-se que, apesar de não se observar diferença estatística entre os grupos periodontite e DMP, o grupo P apresentou médias de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) superiores ao grupo DMP.

Diante disso, ainda é intrigante a relação bidirecional entre periodontite e diabetes. Embora haja evidências substanciais para apoiar o fato de que a periodontite é uma complicação do diabetes, similarmente, há também evidências clínicas para apoiar o inverso, ou seja, a infecção periodontal afeta

adversamente o controle glicêmico em indivíduos com diabetes. O periodonto inflamado altamente vascular pode atuar como reservatório ou como fonte endócrina de TNF- $\alpha$  e outros mediadores da inflamação. Além disso, a predominância de patógenos periodontais Gram-negativos no epitélio de bolsa ulcerado serve como uma fonte crônica de produtos bacterianos e mediadores inflamatórios produzidos localmente (Pérez-Losada, F.D.L. et al., 2020). Com isso, foi demonstrado que, particularmente após um trauma infeccioso agudo, importantes mediadores da inflamação periodontal, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, alteram o metabolismo da glicose e dos lipídeos.

Algumas evidências sugerem ainda que o TNF- $\alpha$  interfere no metabolismo lipídico e atua como um antagonista da insulina. Além disso, estudos relataram também que IL-6 e IL-1 antagonizam a ação da insulina. (Wu, C. Et al., 2020) Surpreendentemente, todos os relatos de funções endocrinológicas alteradas sugerem a presença de condições infecciosas agudas. (Jain, P. Et al., 2021).

## CONCLUSÃO

Os resultados do estudo demonstraram que as alterações na expressão de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e de IL-6 na saliva e no plasma, podem afetar o metabolismo lipídico e as taxas glicêmicas dos pacientes sugerindo possível associação entre a gravidade da periodontite e do diabetes. Porém, não foram encontradas alterações nos níveis de TNF- $\alpha$ , na saliva, nos grupos periodontite e periodontite com diabetes mellitus tipo 2. Por outro lado, observou-se que aumento na expressão de IL-6 na saliva, pode estar relacionada a uma manifestação clínica mais agravada nos pacientes com apenas periodontite. Além disso, foi possível verificar também que o colesterol HDL em níveis elevados possui função protetora e anti-inflamatória em

pacientes com periodontite. A amostra reduzida pode ter papel influenciador nos resultados apresentados, por isso, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos inflamatórios em pacientes com diabetes tipo 2 e periodontite.



## FOLHA DE TÍTULO

Avaliação periodontal clínica, expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e dos níveis de colesterol e triglicérides em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite.

Clinical periodontal evaluation, expression of TNF -  $\alpha$ , IL-6 and cholesterol and triglyceride levels in patients with type 2 diabetes mellitus with periodontitis.

Caroline Cristina Gomes Toledo<sup>1</sup>

Maria do Carmo Machado Guimarães<sup>2</sup>

Mariana Caldas de Oliveira Mattos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

<sup>2</sup> Professor Adjunto de Periodontia da Universidade de Brasília (UnB).

<sup>3</sup> Mestre em Odontologia - Universidade de Brasília.

Correspondência: Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães

Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF

E-mail: mmgcarmo@gmail.com / Telefone: (61) 31071849



## RESUMO

**Objetivos:** analisar a expressão de citocinas pró-inflamatórias na saliva e plasma, relacionar com níveis de colesterol e triglicerídeos e associar aos parâmetros clínicos periodontais de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite, comparando esses dados com os demais grupos: controle, periodontite e DMT2.

**Metodologia:** Após aprovação do Comitê de Ética, 46 pacientes foram avaliados nos grupos: controle-CT (10), diabetes-DM (09), diabetes e periodontite-DMP (16) e periodontite-P (11). Após coleta de saliva e hemograma completo, IL-6 e TNF- $\alpha$  presentes na saliva foram dosadas pelo método CBA.

**Resultados:** O grupo DMP, apresentou porcentagem expressiva de alteração dos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL em comparação aos controles. Sobre a expressão de IL-6, no plasma, foi significativa, no grupo DMP. Enquanto, no grupo DM, a expressão de TNF- $\alpha$  foi considerável comparada aos outros grupos. O grupo P teve expressão de IL-6, na saliva, superior a DMP. As médias PS, ISS, IPV e NIC do grupo P foram superiores ao DMP.

**Conclusão:** Verificou-se que alterações na expressão de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 na saliva e no plasma podem afetar lipidograma, sugerindo possível associação entre a gravidade da periodontite e do diabetes. No entanto, mais estudos são necessários.

**Palavras-Chaves:** Periodontite, Diabetes, Hiperlipidemia.

### Relevância Clínica

Alterações no perfil lipídico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e doença periodontal crônica, pode afetar a expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Ocasionalmente manifestações clínicas mais graves dessas condições.





## ABSTRACT

**Objectives:** to analyze the expression of pro-inflammatory cytokines in saliva and plasma, to relate to cholesterol and triglyceride levels and to associate with periodontal clinical parameters of patients with type 2 diabetes mellitus and periodontitis, comparing these data with the other groups: control, periodontitis and DMT2.

**Methodology:** After approval by the Ethics Committee, 46 patients were evaluated in the following groups: control-CT (10), diabetes-DM (09), diabetes and periodontitis-DMP (16) and periodontitis-P (11). After saliva collection and complete blood count, IL-6 and TNF- $\alpha$  present in the saliva were measured by the CBA method.

**Results:** The DMP group showed a significant percentage of altered levels of triglycerides and LDL cholesterol compared to controls. On the expression of IL-6 in plasma, it was significant in the DMP group. While, in the DM group, the expression of TNF- $\alpha$  was considerable compared to the other groups. Group P had an IL-6 expression in the saliva higher than DMP. The PD, CAL, BOP and VPI means of group P were higher than the DMP.

**Conclusion** It was found that alterations in the expression of pro-inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 in saliva and plasma, can affect lipid profile, suggesting a possible association between the severity of periodontitis and diabetes. However, more studies are needed.

**Keywords:** Periodontitis, Diabetes, Hyperlipidemia.



## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada a biofilmes de placa disbiótica e caracterizada por destruição do aparelho de suporte dentário. Suas características principais incluem a perda de suporte do tecido periodontal, manifestada através de perda de inserção clínica e alveolar avaliada radiograficamente pela perda óssea, presença de bolsa periodontal e sangramento gengival. (Papanou NP. et al., 2018) Eventualmente, a perda de suporte dentário leva à mobilidade e perda dentária. Diversos fatores sistêmicos são conhecidos por serem fatores agravantes da doença periodontal e, entre esses, o Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) é o prevalente. (Lindhe J. et al., 2018)

O Diabetes Mellitus tipo 2 e a doença periodontal mantêm estreita relação biológica e fisiológica, uma vez que, ambas as condições compartilham mecanismos comuns de patogênese relacionados a respostas imunoinflamatórias alteradas em níveis locais e/ou sistêmicos. Desse modo, diversos estudos indicaram que indivíduos com controle glicêmico pobre, conseqüentemente apresentam maior destruição dos tecidos periodontais. (Bazyar H. et al. 2020). Devido a isso, trabalhos recentes concluíram que o tratamento periodontal está relacionado à redução da carga inflamatória em pacientes com periodontite e DMT2, resultando em benefícios no controle glicêmico. (Artese HP. et al. 2014).

Visando a melhor compreensão dos fatores etiológicos imunológicos da doença periodontal e seu vínculo com o diabetes, é essencial entender a atuação dos mediadores inflamatórios nessas condições. A expressão de mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e o Fator Tumoral de Necrose alfa – TNF- $\alpha$ , dentre outros, produzidos nos tecidos gengivais, pode se propagar pelo sistema circulatório. (Leite ACE.

et al. 2015). Deste modo, é possível que a intervenção periodontal em nível local seja refletida em nível sistêmico.

Além disso, os níveis de mediadores inflamatórios como: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em pacientes com DMT2 e periodontite, apresentam-se elevados quando comparados a pacientes diabéticos sem doença periodontal, podendo afetar adversamente a glicemia e o metabolismo lipídico desses pacientes. (Bazyar H. et al. 2020).

Ademais, as citocinas são mediadores inflamatórios e possuem diversas funções relatadas no metabolismo da periodontite, do diabetes e dos lipídios: Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periodontais são associados com o risco de periodontite devido aos efeitos destrutivos teciduais e com a resistência à insulina e o risco de diabetes. Além disso, exercem efeitos no metabolismo dos lipídios afetando a produção de outras citocinas, resultando em elevados níveis de ácidos graxos livres, LDL e triglicérides. (Zhou X. et al. 2014).

Nos últimos anos, surgiram muitos estudos que associam DMT2 e periodontite à hiperlipidemia. Essa associação com a diabetes mellitus tipo 2 pode ser compreendida, pois indivíduos com resistência à insulina, a lipase é inibida e, isto parece explicar os altos níveis de triglicérides neles observados (Howard B.V., 1999). Já a associação com a doença periodontal, por sua vez, ocorre como consequência dos desafios infecciosos causados por bactérias Gram-negativas, patógenos da periodontite, que induzem quadros de bacteremia e endotoxemia e elevam a produção de citocinas pró-inflamatórias séricas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Tal elevação inibe a ação da lipase e provoca alterações no perfil lipídico. (Siddharth G. et al. 2019). Em outras palavras, os indivíduos com DMT2 e periodontite, provavelmente apresentarão distúrbios no metabolismo lipídico, incluindo

quantidades aumentadas de colesterol sérico e LDL. (Feingold, K.R et al. 1992).

Com a finalidade de avaliar o efeito do tratamento periodontal, que consiste em raspagem e alisamento radicular, em pacientes com DMT2, periodontite e distúrbios no metabolismo lipídico, Siddharth G. et al. 2019, desenvolveram uma revisão sistemática e concluíram que os pacientes submetidos ao tratamento periodontal apresentaram redução dos níveis séricos de colesterol, LDL e HDL além da diminuição das taxas glicêmicas e dos parâmetros periodontais. D’Aiuto, et al., 2018, observaram que, sem terapia de suporte periodontal, houve recolonização pela microbiota subgingival patogênica e inflamação subsequente; e o estudo de Sbordone L. et al., 1990, demonstrou a importância de um programa regular de manutenção periodontal, com o objetivo de minimizar a recolonização das superfícies dentárias com patógenos periodontais e, conseqüentemente, manter o controle da glicemia e do perfil lipídico desses pacientes.

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de citocinas pró-inflamatórias na saliva e no plasma, relacionar com níveis de colesterol e triglicerídeos, associar aos parâmetros clínicos periodontais de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite e comparar esses dados com os demais grupos: controle, periodontite e DMT2.

## MATERIAL E MÉTODOS

O atendimento clínico e coleta de amostras dos participantes da pesquisa foi realizado na Clínica Odontológica do Hospital Universitário de Brasília, UnB. A fase laboratorial do projeto foi realizada no laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade

de Medicina – FM e o ensaio de citometria de fluxo ou de ensaios imunoenzimáticos para dosagem de IL-6 e TNF-  $\alpha$  foi feita no laboratório de Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina de Brasília.

Os indivíduos foram informados, verbalmente e por escrito, sobre o objetivo do estudo e, após a concordância em participar, foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O número de registro para ensaios clínicos foi obtido no *sítio* de Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos do Ministério da Saúde (DECIT/MS). Após a aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE 46609515.7.0000.0030), em conformidade com as leis brasileiras e com a Declaração de Helsinki, a pesquisa foi iniciada. O tipo de amostragem se deu por conveniência e, deste modo, a amostra do estudo (n=46) foi dividida em quatro grupos: grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP=16); grupo de pacientes com apenas diabetes mellitus (DM=9); grupo de pacientes com apenas periodontite (P=11) e grupo controle (CT=10).

Os critérios de inclusão para pacientes com periodontite foram: presença de, no mínimo, doze dentes; diagnóstico clínico e radiográfico de periodontite em dois ou mais dentes não adjacentes, além de idade maior ou igual a 30 anos. O grupo controle foi composto de indivíduos com idade superior ou igual a 30 anos, saudáveis sistemicamente, com o periodonto saudável clínica e radiograficamente e com presença de, no mínimo, 20 dentes (com profundidade de sondagem clínica igual ou maior a 3mm, nível de inserção clínico igual ou maior a 3mm, <10% dos sítios com sangramento à sondagem. Para participantes do grupo diabetes, o diagnóstico clínico do diabetes tipo 2 foi efetuado por médico especialista. É importante ressaltar que, na época da seleção dos pacientes, a doença periodontal foi classificada de acordo com a classificação das doenças

periodontais publicada em 1999 (Armitage GC., 1999) tendo em vista que a avaliação periodontal da amostra foi feita antes de 2018. No entanto, os parâmetros periodontais utilizados se encaixaram em:  $\geq$  estágio III, graus A, B ou C, de acordo com os níveis de hemoglobina glicada, e profundidade de sondagem  $\geq$  4mm), conforme os critérios estabelecidos na nova classificação das doenças periodontais. (Tonetti MS. et al., 2018).

Os critérios de exclusão consistiram em tratamento periodontal prévio nos últimos 12 meses; uso continuado de medicamentos como antimicrobianos, imunomoduladores ou anti-inflamatórios nos últimos 12 meses; doenças sistêmicas que pudessem interferir na condição periodontal, com exceção do diabetes para o grupo teste, como HIV, desordens imunológicas, obesidade mórbida [IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>] ou abaixo do peso [mal nutridos IMC < 18,5 kg/m<sup>2</sup>] gestantes ou lactantes, tabagista; indivíduos com idade < 30 anos e etnias indígenas (Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, 1998). Todos os participantes foram submetidos à entrevista com a finalidade de coletar informações médicas e demográficas, como idade, sexo e uso de tabaco. Foi considerado não fumante, o indivíduo que nunca tivesse fumado ou que tivesse parado de fumar há mais de cinco anos. Examinadores experientes e calibrados conduziram o exame clínico e registraram seis sítios por dente (vestibular, méso-vestibular, disto-vestibular, lingual, méso-lingual e disto-lingual) com o auxílio de uma sonda periodontal Michigan O com marcações de Williams (Millenium, Brasil). Os parâmetros periodontais coletados foram profundidade de sondagem, nível de inserção, índice de placa visível e índice de sangramento gengival proposto por Ainamo e Bay (Ainamo, Bay, 1975).

Os participantes foram examinados clinicamente no momento inicial. Quando necessário, o exame radiográfico foi executado



pela técnica do paralelismo. Todas as medidas de biossegurança exigidas para o atendimento odontológico foram tomadas, a saber: uso de luvas, óculos de proteção, gorros, máscaras, aventais, material esterilizado ou descartável, bem como as medidas de radioproteção (filmes sensíveis, aventais de chumbo nos pacientes e biombos de chumbo). Em todos os indivíduos, foi feita coleta de 40 mL de sangue periférico no laboratório de análises clínicas do HUB para hemograma completo, níveis de colesterol LDL, HDL e triglicerídeos. Em parte da coleta do sangue venoso, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo ou ensaios imunoenzimáticos para dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Foi utilizado o *Kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* da *BD Biosciense (BD™ Cytometric Bead Array-CBA, USA)*, de acordo com o manual de instrução. As amostras de soro foram diluídas em série e depois encubadas com os *capture beads* do *Kit CBA*, após serem processados na centrífuga e utilizadas no método de citometria de fluxo para mensurar quantitativamente a dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$  através de intensidades de fluorescência distintas. Para a análise dos dados do citômetro de fluxo *BD FACS Verse* foi utilizado o programa *FCAP Array software* de acordo com o guia *Guide to Analyzing Data from BD CBA Kits Using FCAP Array Software*.

O perfil lipídico foi analisado pelo método soro/esterase – oxidase, homogêneo direto, oxidase – peroxidase e Fórmula de Friedevald, no qual o colesterol LDL teve limite inferior a 100 mg/dL, o HDL superior a 60 mg/dL e os triglicerídeos abaixo de 150 mg/dL.

A análise estatística foi realizada por meio do *software Prism® 8.4.2* (GraphPad, USA). A normalidade das amostras foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre as amostras foi feita por meio dos testes de Kruskal-Wallis

e Wilcoxon e Mann-Whitney, após a verificação da normalidade ou anormalidade, além disso, foi realizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância foi pré-determinado em 05% ( $p < 0,05$ ). As variáveis, quando possível, foram apresentadas em média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os seguintes critérios foram analisados: 1) Média  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros clínicos periodontais, expressão de IL-6 e TNF-  $\alpha$  e as características hematológicas (níveis de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos) dos quatro grupos.

Os recursos para o kit de citocinas foram obtidos pelo Processo CNPq, Chamada: Universal 01/2016 - Faixa B proposta 422070/2016-5.

## RESULTADOS

### ▪ Análise do perfil demográfico dos pacientes:

A tabela 1 apresenta a número de homens e de mulheres em cada grupo analisado e a também a média de idade dos grupos.

	Periodontite(P)	Controle (CT)	Diabetes Mellitus (DM)	Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP)
<b>Homens/Mulheres</b>	5/6	2/8	2/7	10/6
<b>Média de idade</b>	45,4	42,0	49,0	51,9

Tabela 1 – Análise do perfil demográfico dos pacientes .

### ▪ Expressão de mediadores pró-inflamatórios na saliva:

A média da expressão do fator tumoral de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ) encontradas na saliva do grupo controle (CT) foi de 1,84 pg/ml; grupo periodontite (P) - 2,48 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM) - 7,22 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP) - 2,58 pg/ml.

As médias da expressão de interleucina 6 (IL-6) na saliva foram: grupo controle (CT) - 21,08 pg/ml; grupo periodontite (P)- 38,01 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 69,21 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 32,60 pg/ml.

As médias das expressões do TNF- $\alpha$  e da IL-6 na saliva estão descritas no gráfico 1.

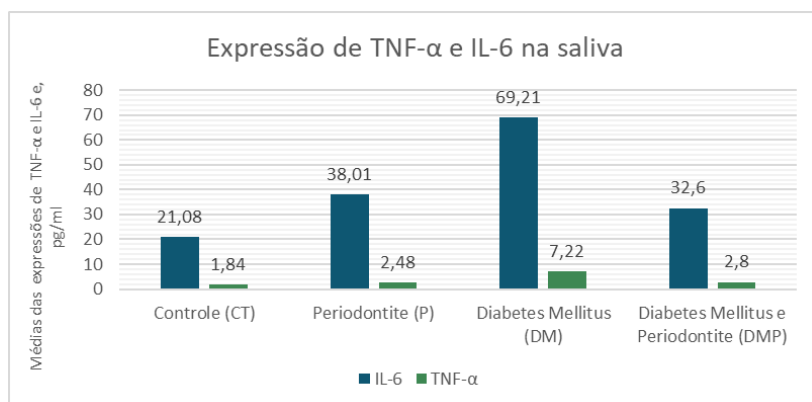


Gráfico 1 – Média das expressões da interleucina 6 (IL-6) e do Fator tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) dos grupos: controle (CT), diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP) na saliva.

### ▪ Expressão de mediadores pró-inflamatórios no plasma

A média da expressão do fator tumoral de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ) encontradas no plasma do grupo controle (CT) foi 0,04 pg/ml;

grupo periodontite (P)- 0,29 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 0,15 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 0,44 pg/ml.

A média da expressão de interleucina 6 (IL-6) no plasma foi: grupo controle (CT)-1,24 pg/ml; grupo periodontite (P)- 0,59 pg/ml; grupo diabetes mellitus (DM)- 0 pg/ml; e grupo diabetes mellitus e periodontite (DMP)- 1,26 pg/ml.

A média de expressão do TNF- $\alpha$  e da IL-6 no plasma estão descritas no gráfico 2.

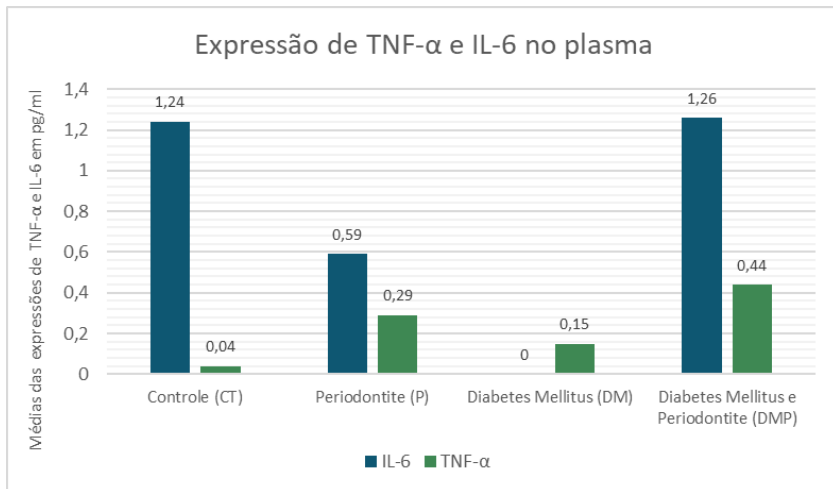


Gráfico 2 - Média das expressões da interleucina 6 (IL-6) e do Fator tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) dos grupos: controle (CT), diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP) no plasma.

A análise dos resultados das amostras coletadas de plasma e de saliva dos pacientes possibilitou algumas constatações.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os níveis de TNF-  $\alpha$  e IL-6, na saliva, entre os grupos analisados. Entretanto, os grupos periodontite (P) e Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP) apresentaram diferença estatística entre si, na análise salivar, no qual o grupo P apresentou a maior expressão de IL-6 na saliva.

Similarmente, não houve diferença estatística entre as amostras examinadas de TNF-  $\alpha$  no plasma. Contudo, existiu diferença estatística significativa nas amostras de IL-6, no plasma, entre os grupos periodontite (P) e Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP), em que o grupo DMP apresentou a maior expressão.

#### ▪ **Análise do perfil lípidico**

##### **- Triglicerídeos**

A média dos níveis de triglicerídeos nos grupos foi: grupo controle (CT) – 93,0 mg/dL; Diabetes Mellitus (DM) – 129mg/dL; Periodontite (P) – 117 mg/dL; Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP) – 198,5 mg/dL.

##### **- Colesterol total**

A média dos níveis de colesterol total nos grupos foi: CT – 188,5 mg/dL; DM – 174,8 mg/dL; P – 185,3 mg/dL e grupo DMP – 194,6 mg/dL.

##### **- Colesterol HDL**

A média do colesterol HDL nos grupos foi: CT – 52,80 mg/dL; DM – 48,11 mg/dL; P – 52,55 mg/dL e DMP – 46,53 mg/dL.

##### **- Colesterol LDL**

A média de colesterol LDL nos grupos foi: CT – 114,9 mg/dL; DM – 89,33 mg/dL; P – 108,2 mg/dL e DMP – 106,8 mg/dL.

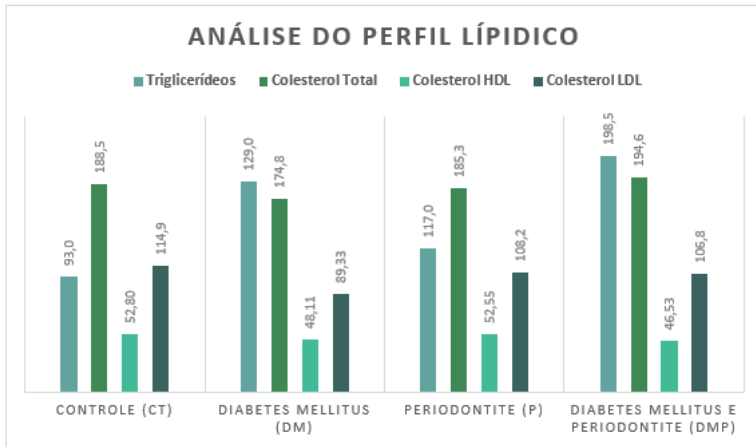


Gráfico 3 – Análise dos níveis de triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL em mg/ dL dos grupos controle (CT), diabetes mellitus (DM), periodontite (P) e diabetes mellitus e periodontite (DMP).

Analisando os níveis de triglicerídeos entre os grupos, foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ao comparar a expressão de triglicerídeos entre os grupos diabetes mellitus e periodontite (DMP) e o grupo periodontite (P), observou-se diferença estatística, na qual o grupo DMP apresentou a maior expressão. Também se observou diferença estatística entre os grupos controle (CT) e diabetes mellitus e periodontite (DMP), em que DMP apresentou níveis elevados de triglicerídeos.

Sobre as análises de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

#### ▪ **Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF- $\alpha$**

Observou-se correlação positiva na avaliação plasmática dos grupos P e DMP entre o TNF-  $\alpha$  e o HDL e na avaliação salivar

do grupo P entre o TNF-  $\alpha$  e o colesterol HDL. (Ver nos Gráficos 4 e 5)

### XY data: Correlation of ANÁLISE DE IL- GRUPO P (S)

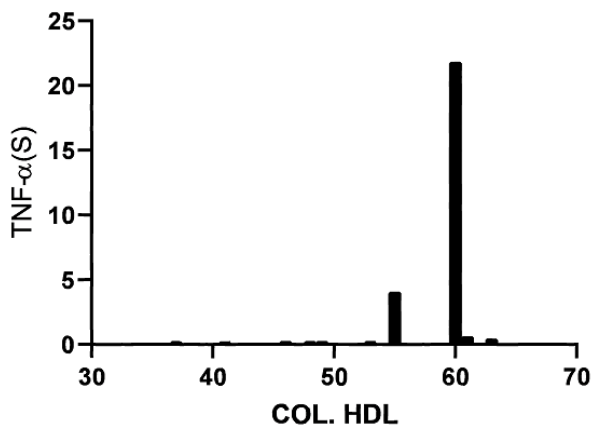


Gráfico 4 – Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF-  $\alpha$  na avaliação salivar do grupo periodontite (P).

### XY data: Correlation of ANÁLISE DE IL- GRUPO DMP (P)

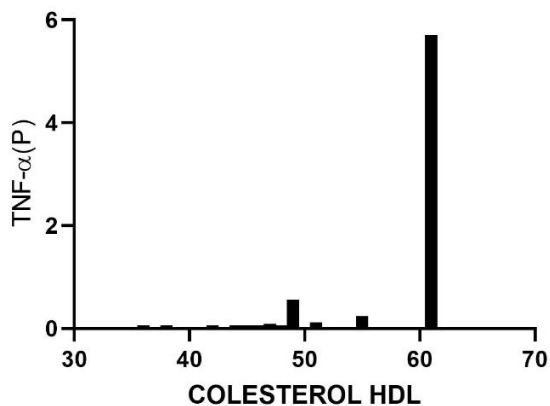


Gráfico 5 – Correlação positiva entre o colesterol HDL e o TNF- $\alpha$  na avaliação plasmática do grupo Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP).

### ▪ Avaliação clínica periodontal

Sobre a avaliação clínica periodontal foram calculadas as médias dos seguintes parâmetros clínicos periodontais: índice de sangramento a sondagem (ISS), índice de placa visível (IPV) e número de dentes ausentes.

- **Média do índice de sangramento a sondagem (ISS):** P – 43,22% e DMP – 31,55%.

- **Média do índice de placa visível (IPV):** P – 80,13% e DMP – 51,23%.

- **Média de dentes ausentes:** P – 8,9; CT – 5,7; DM – 11 e DMP – 7,25.

	Periodontite(P)	Controle (CT)	Diabetes Mellitus (DM)	Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP)
<b>Índice de sangramento a sondagem</b>	43,22%	-	-	31,55%
<b>Índice de Placa Visível</b>	80,13%	-	-	51,23%
<b>Dentes ausentes</b>	8,9	5,7	11	7,25

Tabela 2 – Média dos parâmetros clínicos avaliados nos grupos.

Observa-se que o grupo periodontite apresentou níveis de ISS e IPV superiores ao grupo DMP. Além disso, o grupo diabetes mellitus teve uma maior média de dentes ausentes quando comparadas aos demais grupos.



Com relação à análise das médias profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC), dos grupos diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP) e periodontite (P), obteve-se os respectivos valores: profundidade de sondagem (PS): 2,31 mm e 2,7mm; nível de inserção clínica (NIC): 3,3 mm e 3,67 mm; recessão gengival (REC): 2,2 mm e 2,14 mm.

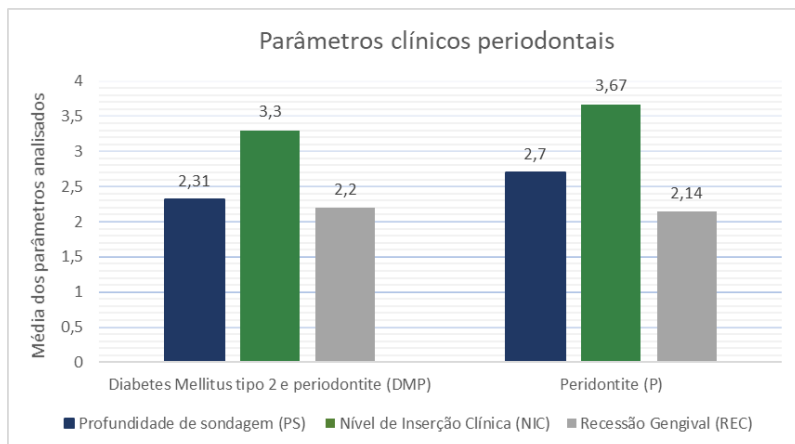


Gráfico 6 – Análise dos parâmetros clínicos periodontais dos grupos diabetes mellitus tipo 2 e periodontite (DMP) e periodontite (P).

Ao analisar os parâmetros clínicos periodontais, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, o grupo periodontite apresentou médias de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) maiores quando comparado ao grupo DMP. Relacionando isso à expressão de IL-6 na saliva, notou-se que o grupo periodontite exibiu níveis superiores aos do grupo DMP. A piora dos parâmetros periodontais no grupo P poderia ser justificada pela maior expressão da IL-6 na saliva nesse mesmo grupo, contudo, é importante ressaltar que não houve diferença estatística entre os parâmetros periodontais entre os grupos relatados.

Nenhuma variação foi encontrada entre os níveis de TNF-  $\alpha$  na saliva, na presença de apenas periodontite ou na presença DMT2 com periodontite, sugerindo ausência de qualquer relação direta entre essas doenças e os níveis de TNF- $\alpha$ .

## DISCUSSÃO

A interleucina 6, citocina pró-inflamatória, desempenha papel crítico na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e localmente na doença periodontal. Estudos de biomarcadores mostram associações de níveis sistêmicos elevados de IL-6 com maior incidência de doença cardiovascular (Clarke R. et al., 2018). Além disso, a liberação excessiva de IL-6 localmente, na cavidade bucal, provoca a destruição do tecido ósseo por amplificação da cascata pró-inflamatória por meio da estimulação da atividade osteoclástica e o crescimento de bactérias periodontopatogênicas (Bennermo M. et al., 2004). Diante disso, observa-se que níveis elevados de interleucina 6 na saliva estão relacionados com aspecto clínico periodontal mais agravado.

De acordo com os resultados, houve diferença estatística significativa nas amostras de saliva de IL-6 entre os grupos periodontite (P) e o grupo Diabetes Mellitus e Periodontite (DMP), sendo que o grupo periodontite apresentou a maior expressão. A maior expressão de IL-6 em pacientes com apenas periodontite, é compreensível, pois, essa citocina apresenta papel fundamental como mediadora pró-inflamatória nos tecidos gengivais durante o processo infeccioso decorrente da doença periodontal. (Leite ACE et al. 2015).

Além do presente estudo, outros estudos também observaram que pacientes com diabetes mellitus tipo 2, apresentam altos

níveis de mediadores inflamatórios sistêmicos. E condições inflamatórias elevadas como a hiperglicemia levam a complicações microvasculares e macrovasculares podem potencializar a gênese do estresse oxidativo, apoptose celular e inflamação. No diabetes e na obesidade, demonstram níveis aumentados de IL-6 e TNF- $\alpha$ . A IL-6 e o TNF- $\alpha$  são importantes indutores de proteínas de fase aguda e têm a capacidade de prejudicar a sinalização intracelular da insulina, contribuindo predominantemente para a resistência à insulina.(Jain, P. Et al., 2021). A periodontite também está associada a níveis elevados de PCR e IL-6 com níveis variáveis de IL-6 acompanhados com progressão da doença. (Nguyen, A.T.M. et al., 2020). Assim, a inflamação sistêmica associada à periodontite agrava o estado diabético.

Ao avaliar os níveis de triglicerídeos entre os grupos foi encontrada diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Comparando os grupos DMP e P, constatou-se diferença estatística, sendo que o grupo DMP apresentou maior expressão. Também foi observada diferença estatística entre os grupos CT e DMP, sendo observados maiores níveis de triglicerídeos no grupo DMP. Estudos mostraram que, em humanos, condições inflamatórias agudas e aumento dos níveis circulantes de interleucinas levam à hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia. Tendo em vista que, tanto a periodontite quanto o Diabetes Mellitus são condições inflamatórias, os dados encontrados nesse estudo em que os grupos DM, DMP e P apresentaram níveis elevados de triglicerídeos são justificados.

O colesterol HDL possui efeito protetor atribuído principalmente ao seu papel no transporte reverso do colesterol, removendo o excesso de colesterol dos tecidos e células com o intuito de reduzir os níveis séricos de LDL (Woudberg NJ et al., 2017). Além de seus efeitos antioxidantes, o HDL também regula

negativamente a expressão de moléculas de adesão endotelial para exercer seu efeito anti-inflamatório (Woudberg NJ. et al., 2016). De acordo com Xu et al.,2020, a disfunção do colesterol HDL pode representar um novo mecanismo que relaciona a inflamação com a progressão da doença periodontal. E isto, indicou potenciais estratégias diagnósticas e terapêuticas envolvendo a modificação de HDL que pode beneficiar os pacientes com doença periodontal (Xu et al.,2020).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foi descoberto, em 1975, por Carswell et al. e, é considerado uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos constitui o principal estímulo para que seja secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos. (Vitale RF. et al., 2007). Desse modo, está diretamente relacionado com a periodontite, por ser decorrente de uma infecção local por bactérias Gram-negativas associada à resposta exacerbada do hospedeiro. (Yong-Wei Fu et al. 2015).

A partir das análises de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). No entanto, observou-se correlação positiva no grupo de avaliação salivar entre TNF- $\alpha$  e o colesterol HDL no grupo periodontite e, no grupo DMP, na análise do plasma.

Adicionalmente, as partículas de colesterol HDL possuem propriedades protetoras e anti-inflamatórias contra microrganismos por diversas vias bioquímicas. (Bernardi S. et al. 2018) Fentoğlu et al, 2011 demonstraram correlação positiva entre a taxa de colesterol total/HDL e o índice gengival e sugeriram que a hipercolesterolemia é um sinal patognomônico para a doença periodontal. Os mesmos autores reportam que citocinas como o TNF- $\alpha$  induzem rápido aumento nos níveis

séricos de colesterol, entretanto, o mecanismo que rege esse aumento é desconhecido. É possível inferir que o aumento que de TNF-  $\alpha$  e de colesterol HDL em pacientes com apenas periodontite é compreendido diante da atuação de ambos durante o processo infeccioso, TNF-  $\alpha$  como mediador pró-inflamatório e o colesterol HDL, agente anti-inflamatório.

Estudos mostram que esses mediadores alteram a atividade de leucócitos e osteoblastos-osteoclastos e promovem a remodelação tecidual local e sistêmica. (Martínez-Aguilar et al. 2019). Relacionando essa constatação aos parâmetros periodontais e à expressão da interleucina 6 (IL-6), citocina pró-inflamatória, na saliva, percebeu-se que o grupo periodontite também teve expressão aumentada desse mediador pró-inflamatório. Assim, foi possível inferir que a manifestação clínica agravada dos pacientes do grupo P, pode ser justificada pelos elevados níveis de IL-6 na saliva.

A respeito da expressão de TNF-  $\alpha$ , na saliva, nos pacientes com apenas periodontite e periodontite com DMT2, não foram encontradas alterações, sugerindo que há ausência de qualquer relação direta entre a progressão dessas doenças e os níveis de TNF- $\alpha$ . (Martínez-Aguilar VM. et al. 2019).

Ao analisar os parâmetros clínicos periodontais, observou-se que, apesar de não se observar diferença estatística entre os grupos periodontite e DMP, o grupo P apresentou médias de profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) superiores ao grupo DMP.

Diante disso, ainda é intrigante a relação bidirecional entre periodontite e diabetes. Embora haja evidências substanciais para apoiar o fato de que a periodontite é uma complicação do diabetes, similarmemente, há também evidências clínicas para

apoiar o inverso, ou seja, a infecção periodontal afeta adversamente o controle glicêmico em indivíduos com diabetes. O periodonto inflamado altamente vascular pode atuar como reservatório ou como fonte endócrina de TNF- $\alpha$  e outros mediadores da inflamação. Além disso, a predominância de patógenos periodontais gram-negativos no epitélio de bolsa ulcerado serve como uma fonte crônica de produtos bacterianos e mediadores inflamatórios produzidos localmente.( Pérez-Losada, F.D.L. et al., 2020). Com isso, foi demonstrado que, particularmente após um trauma infeccioso agudo, importantes mediadores da inflamação periodontal, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, alteram o metabolismo da glicose e dos lipídeos.

Algumas evidências sugerem ainda que o TNF- $\alpha$  interfere no metabolismo lipídico e atua como um antagonista da insulina. Além disso, estudos relataram também que IL-6 e IL-1 antagonizam a ação da insulina. (Wu,C. Et al., 2020) Surpreendentemente, todos os relatos de funções endocrinológicas alteradas sugerem a presença de condições infecciosas agudas. (Jain, P. Et al., 2021).

## CONCLUSÃO

Os resultados do estudo demonstraram que as alterações na expressão de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e de IL-6 na saliva e no plasma, podem afetar o metabolismo lipídico e as taxas glicêmicas dos pacientes sugerindo possível associação entre a gravidade da periodontite e do diabetes. Porém, não foram encontradas alterações nos níveis de TNF- $\alpha$ , na saliva, nos grupos periodontite e periodontite com diabetes mellitus tipo

2. Por outro lado, observou-se que aumento na expressão de IL-6 na saliva, pode estar relacionada a uma manifestação clínica mais agravada nos pacientes com apenas periodontite. Além disso, foi possível verificar também que o colesterol HDL em níveis elevados possui função protetora e anti-inflamatória em pacientes com periodontite. A amostra reduzida pode ter papel influenciador nos resultados apresentados, por isso, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos inflamatórios em pacientes com diabetes tipo 2 e periodontite.

## REFERÊNCIAS

1. Papapanou PN, Sanz M, et al. Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S162–S170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
2. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil, 6th edition, 2018.
3. Bazayar H, Maghsoumi-Norouzabad L, Yarahmadi M, et al. The Impacts of Synbiotic Supplementation on Periodontal Indices and Biomarkers of Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Chronic Periodontitis Under Non-Surgical Periodontal Therapy. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:19-29. Published 2020 Jan 6. doi:10.2147/DMSO.S230060
4. Artese HP, Foz AM et al. Periodontal Therapy and Systemic Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus : a Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0128344. doi: 10.1371/journal.pone.0128344. eCollection 2015
5. Leite ACE, Guimarães MCM, Carneiro VMA et al. Role of Cytokines and Transcription Factors in Periodontitis: A Review of Cellular and Molecular Mechanisms. *American Journal of Immunology*. November 2015.
6. Zhou X, Zhang W, Liu X et al. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. *Arch Oral Biology* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.008>.
7. Howard, B. V. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am. J. Cardiol.*, v. 84, n. 1A, p. 28-32, 1999.



8. Siddharth Garde, Rahena Akhter et al. Periodontal Therapy for Improving Lipid Profiles in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2019. *International Journal of Molecular Science*. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 3826; doi:10.3390/ijms20153826
9. Feingold, K.R.; Staprans, I.; Memon, R.; Moser, A.; Shigenaga, J.; Doerrler, W.; Dinarello, C.; Grunfeld, C. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J. Lipid Res.* 1992, 33, 1765-1776.
10. D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. *Am Heart J.* 2006;151(5):977-84.
11. Sbordone, L.; Ramaglia, L.; Gulletta, E.; Iacono, V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J. Periodontol.* 1990, 61, 579-584. [CrossRef]
12. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
13. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006. Erratum in: *J Periodontol.* 2018 Dec;89(12):1475. PMID: 29926952.
14. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res.* 1998;6 Suppl 2:S1S-209S.
15. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229-35.
16. Jain, P.; Hassan, N.; Khatoon, K.; Mirza, M.A.; Naseef, P.P.; Kuruniyan, M.S.; Iqbal, Z. Periodontitis and Systemic Disorder—An Overview of Relation and Novel Treatment Modalities.

Pharmaceutics 2021, 13, 1175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081175>

17. Nguyen, A.T.M.; Akhter, R.; Garde, S.; Scott, C.; Twigg, S.M.; Colagiuri, S.; Ajwani, S.; Eberhard, J. The Association of Periodontal Disease with the Complications of Diabetes Mellitus. A Systematic Review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020, 165, 108244. [CrossRef]
18. Clarke R., Valdes-Marquez E., Hill M., Gordon J., Farrall M., Hamsten A. Plasma cytokines and risk of coronary heart disease in the PROCARDIS study. *Open Hear.* 2018;5 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list] .
19. Bennermo, M., Held, C., Stemme, S., Ericsson, C. G., Silveira, A., Green, F., ... Tornvall, P. (2004). Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: Implications for a variety of major diseases? *Clinical Chemistry*, 50(11), 2136–2140.
20. Nicholas J. Woudberg, Sarah Pedretti, et al. Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target? *Front Pharmacol.* 2017; 8: 989.
21. Woudberg NJ, Goedecke JH, Blackhurst D, et al. Association between ethnicity and obesity with high-density lipoprotein (HDL) function and subclass distribution. *Lipids Health Dis.* 2016;15:92.
22. Xu J, Duan X. Association between periodontitis and hyperlipidaemia: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2020 Nov;47(11):1861-1873. doi: 10.1111/1440-1681.13372. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32623762.
23. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666.
24. Vitale, Rodrigo Faller e Ribeiro, Fernando de Andrade Quintanilha O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* [online]. 2007, v. 73, n. 1 [Acessado 24 Setembro 2021] , pp. 123-127. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>>. Epub 16 Maio 2007. ISSN 0034-7299. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100020>.

25. Bernardi S, Marcuzzi A, Piscianz E, Tommasini A, Fabris B. The Complex Interplay between Lipids, Immune System and Interleukins in Cardio-Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 14;19(12):4058. doi: 10.3390/ijms19124058. PMID: 30558209; PMCID: PMC6321433.
26. Fentoğlu Ö, Koroğlu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Özdem M, Sütçü R, Tamer MN, Orhan H, Ay ZY, Öztürk Tonguç M, Kırzioğlu FY. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol*. 2011 Jan;38(1):8-16. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01644.x. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21062339.
27. Martínez-Aguilar VM., Carrillo-Ávila BA.,Sauri-Esquivel EA. Quantification of TNF- $\alpha$  in Patients with Periodontitis and Type 2 Diabetes. 2019. Hindawi BioMed Research International Volume 2019, Article ID 7984891, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2019/7984891>
28. Pérez-Losada, F.D.L.; Estrugo-Devesa, A.; Castellanos-Cosano, L.; Segura-Egea, J.J.; López-López, J.; Velasco-Ortega, E. Apical Periodontitis and Diabetes Mellitus Type 2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 540. [CrossRef] [PubMed]
29. Wu,C.;Yuan, Y.; Liu, H.; Li, S.; Zhang, B.; Chen, W.; An, Z.; Chen, S.; Wu, Y.; Han, B.; et al. Epidemiologic Relationship between Periodontitis and Type 2 Diabetes Mellitus. *BMC Oral Health* 2020, 20, 204. [CrossRef]



## ANEXOS

### NORMAS DA REVISTA

Journal of Clinical Periodontology publica artigos originais de pesquisa, revisões, relatórios de inovação clínica e relatos de casos. Estes últimos serão publicados apenas se fornecerem novos conhecimentos fundamentais e se usarem uma linguagem compreensível para o clínico. Espera-se que qualquer manuscrito submetido represente pesquisa original não publicada.

#### i. Artigos de pesquisa originais

Os artigos originais de pesquisa devem descrever observações experimentais significativas e originais e fornecer detalhes suficientes para que as observações possam ser avaliadas criticamente e, se necessário, repetidas. Os artigos originais serão publicados sob o título de periodontologia clínica, implantodontia ou ciências pré-clínicas e devem estar em conformidade com os mais elevados padrões internacionais na área.

Limite de palavras: máximo de 3.500 palavras, excluindo referências.

Resumo: máximo de 200 palavras; deve ser estruturada, sob os subtítulos: Objetivo (s), Materiais e métodos, Resultados, Conclusão (ões).

Figuras / Tabelas: Total de não mais de 7 figuras e tabelas.

Introdução: deve ser focada, delineando as origens históricas ou lógicas do estudo e não resumindo os resultados; revisões

exaustivas da literatura não são apropriadas. Deve terminar com a declaração explícita dos objetivos específicos da investigação.

**Material e Métodos:** devem conter detalhes suficientes para que, em combinação com as referências citadas, todos os ensaios clínicos e experimentos relatados possam ser reproduzidos na íntegra. Como condição de publicação, os autores são obrigados a disponibilizar gratuitamente aos pesquisadores acadêmicos materiais e métodos usados para seu próprio uso. Isso inclui anticorpos e as construções usadas para fazer animais transgênicos, embora não os próprios animais.

**Resultados:** devem apresentar as observações com o mínimo de referência à literatura anterior ou a possíveis interpretações.

**Discussão:** pode ser útil começar com um breve resumo dos principais achados, mas deve-se evitar a repetição de partes do resumo ou da seção de resultados. A seção de discussão deve terminar com uma breve conclusão e um comentário sobre a relevância clínica potencial dos achados. As declarações e a interpretação dos dados devem ser devidamente apoiadas por referências originais.

A discussão pode ser proveitosamente estruturada com os seguintes pontos em mente (modificado da proposta de Richard Horton (2002), *The Hidden Research Paper*, *The Journal of the American Medical Association*, 287, 2775-2778). Nem todos os pontos se aplicam a todos os estudos e seu uso é opcional, mas acreditamos que melhorará a seção de discussão manter esses pontos em mente.