



MON
616.349 - 008.54
G533 n
TES/MEM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Níveis de IgA1 e expressão de ácido ribonucleico mensageiro para
interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, em saliva total de
pacientes com diabetes mellitus tipo II portadores de doença periodontal
crônica**

Márcio Alex Barros Gomes

SISBI/UFU



1000219520

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Níveis de IgA1 e expressão de ácido ribonucleico mensageiro para
interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, em saliva total de
pacientes com diabetes mellitus tipo II portadores de doença periodontal
crônica**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

Márcio Alex Barros Gomes

Uberlândia – MG
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Níveis de IgA1 e expressão de ácido ribonucléico mensageiro para
interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, em saliva total de
pacientes com diabetes mellitus tipo II portadores de doença periodontal
crônica**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Souza
Orientadora

Uberlândia – MG
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Níveis de IgA1 e expressão de ácido ribonucleico mensageiro para
interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, em saliva total de
pacientes com diabetes mellitus tipo II portadores de doença periodontal
crônica**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre

Márcio Alex Barros Gomes

Mestrando

Prof^ª Dr^ª Maria Aparecida de Souza

Orientadora

Uberlândia – MG

2005

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Maria Aparecida de Souza por ter aceitado orientar-me tão prontamente, e pelos valiosos conhecimentos e experiência adquiridos, além é claro, do valor inestimável de sua amizade.

Ao Prof. de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFU Antônio Mário Buso pela disposição incondicional em colaborar com esse projeto.

Aos meus pais João Gomes e Maria Helena, bem como aos meus irmãos, pelo apoio.

À Karina pela ajuda e compreensão nos momentos de dificuldade.

Ao Flávio Hercos pelas valiosas sugestões ao trabalho e pela edição das imagens.

À Sandra Regina pelos ensinamentos de biologia molecular, ELISA e utilização de lectinas.

Ao grupo do 6T (Biomol): Eneida, Carla, Cecília, Marta, Sandra, Flávio e Adriano pelos momentos compartilhados e pela amizade.

Ao Neto e Luceleide pela prestatividade, carisma e atenção.

Ao CNPq por financiar a execução desse trabalho.

DEDICATÓRIA

À minha avó Francisca Vieira Barros (*in memoriam*) que tanto contribuiu para essa conquista.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
1.RESUMO	2
2.ABSTRACT	3
3.INTRODUÇÃO.....	4
3.1. Doença periodontal (DP).....	4
3.2. Diabetes mellitus (DM).....	6
3.2.1. Diabetes mellitus tipo I.....	7
3.2.2. Diabetes mellitus Tipo II	7
3.2.3. Diabetes mellitus de outras causas específicas.....	8
3.2.4. Diabetes mellitus Gestacional	8
3.2.5. Complicações do diabetes mellitus	8
3.3. Interações entre doença periodontal e doenças sistêmicas	9
3.3.1. Doença periodontal e doença cardiovascular	9
3.3.2. Doença periodontal e desordens respiratórias	10
3.3.3. Doença periodontal e osteoporose.....	11
3.3.4. Doença periodontal e diabetes mellitus.....	12
3.4. Resposta imunológica na doença periodontal/diabetes mellitus	14
3.4.1. Citocinas	14
3.4.2. “Advanced glycation endproducts” (AGEs)	18
3.4.3. Resposta imune celular e alterações celulares.....	20
3.4.4. Resposta imune humoral	22
3.5. Utilização de saliva em diagnóstico	23
3.5.1. Enzimas	24
3.5.2. Imunoglobulinas	25
3.6. Lectina jacalina.....	26
4.OBJETIVOS.....	27
5.MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
5.1. Seleção dos pacientes	28
5.2. Obtenção das amostras de saliva	30
5.3. Ensaio para detecção de IgA1 por ELISA.....	30
5.3.1. Padronização do ELISA para detecção de IgA1	30
5.3.2. Titulação da IgA1 em amostras de saliva de pacientes DPCM e DPCS	31
5.4. Transcrição reversa-reação da cadeia polimerase (RT-PCR).....	32
5.5. Análise Estatística	33
6.RESULTADOS	34
6.1. Parâmetros da reação ELISA.....	34
6.2. Determinação dos títulos de IgA1	34
6.3. Análise da expressão mRNA de citocinas.....	37
6.4. Correlação entre os títulos de IgA1 e expressão de citocinas	39
7.DISSCUSSÃO	40
8.CONCLUSÕES.....	43
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
10.ANEXO I.....	54
11.ANEXO II	55

LISTA DE ABREVIATURAS

β -glicuronidase	Beta Glicuronidase
AGE	Advanced Glycation Endproducts
DM	Diabetes Mellitus
DP	Doença Periodontal
DPCM	Doença Periodontal Crônica Moderada
DPCS	Doença Periodontal Crônica Severa
DPOC	Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas
DPP IV	Dipeptidilpeptidase 4
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fc	Fragmento Cristalizável
FCG	Fluido Crevicular Gengival
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgA1	Imunoglobulina A1
IgA2	Imunoglobulina A2
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeos
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
MSR	Receptor Scavenger de Macrófagos
OPD	Orto-fenildiamina
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBST	Salina Tamponada com Fosfato Tween 20
PBSTG	Salina Tamponada com Fosfato Tween 20 + Gelatina
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
RAGE	Receptor para Advanced Glycation Endproducts
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa
sIgA	Imunoglobulina A Secretora
Th1	T auxiliador 1
Th2	T auxiliador 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

1.RESUMO

A doença periodontal (DP) é caracterizada como infecção oral que resulta em inflamação gengival, destruição de tecidos periodontais, perda óssea alveolar e algumas vezes perda dos dentes em casos severos. Diabetes mellitus (DM) consiste de um grupo de desordens que incluem redução ou ausência de insulina. A inter-relação entre DM e DP é bem discutida. Estudos mostram que pacientes diabéticos tipo II tiveram níveis de IgA séricos mais elevados (IgA1 parece contribuir para esse evento) e alteração na produção de citocinas. A severidade da doença periodontal pode sugerir alterações nos títulos de IgA1 e na expressão de citocinas. Neste trabalho foi testada a hipótese de que pacientes diabéticos tipo II com doença periodontal crônica moderada (DPCM) poderiam apresentar diferenças nos títulos salivares de IgA1 e expressão de citocinas quando comparados com pacientes com doença periodontal crônica severa (DPCS). Foi empregada a reatividade à Jacalina para se determinar os títulos de IgA1 por ELISA, e RT-PCR para expressão de citocinas em 13 amostras salivares de pacientes diabéticos com DPCM e 11 com DPCS. Os resultados demonstraram que os títulos de IgA1 em DPCM foram maiores do que em DPCS, com maior prevalência do título de IgA1 64 em DPCS e do título 512 em DPCM. Além disso, foi mostrado que a expressão de mRNA de IFN- γ foi maior no grupo DPS que no grupo DPM, e a expressão de TNF- α foi similar em ambos os grupos. Por outro lado, não foi detectada expressão de mRNA para as citocinas IL-13 e IL-4 em nenhum dos grupos. Portanto os dados do presente trabalho sugerem que a IgA1 pode estar exercendo parcial proteção ao grupo DPCM e que a expressão de mRNA para TNF- α não pode ser correlacionada ao grau de severidade da doença.

Palavras-chaves: IgA1, Doença Periodontal, Diabetes Mellitus, Jacalina, Citocinas.

2.ABSTRACT

The periodontal disease has been characterized as an oral infection that results in gingival inflammation, destruction of periodontal tissues, alveolar bone loss and sometimes lost of the teeth in severe cases. Diabetes mellitus consists in a group of disorders that include reduction or absence of insulin. The relationship between diabetes mellitus and periodontal disease is well discussed. Studies has been shown that diabetic patients type II have higher levels of serum IgA (IgA1 seems contribute for this event) and alteration in the cytokine production. The severity of periodontal disease could suggest some salivary differences in the IgA1 titers and in the cytokine expression. In this work was tested the hypothesis that the diabetic patients type II with moderate periodontal chronic disease (MPCD) could present difference between IgA1 salivary titers and cytokine expression when compared with the severe periodontal chronic disease (SPCD) cases. It was employed the reactivity to Jacalin to determine IgA1 titers by ELISA, and RT-PCR to detect the cytokines expression in saliva of 13 diabetic patients with MPCD and 11 with SPD. The results showed that the titers of IgA1 in MPCD were higher than SPCD, with a higher prevalence of the IgA 1 titer 64 in SPCD and IgA1 titer 512 in MPCD. Furthermore, was showed that IFN- γ mRNA was highly expressed in SPCD group than MPCD group and the expression of the TNF- α mRNA was similar in both groups. On the other hand, IL-13 mRNA and IL-4 mRNA did not detected in any saliva samples of the analyzed groups. Therefore the results of present work suggest that IgA1 could have a partial protection in MPCD group and mRNA expression for TNF- α and was not correlate to disease severity degree.

Key words: IgA1, Periodontal Disease, Diabetes Mellitus, Jacalin, Cytokines.

3.INTRODUÇÃO

3.1. Doença periodontal (DP)

A periodontite é uma doença inflamatória crônica caracterizada por infecção oral que leva à inflamação gengival, destruição de tecidos periodontais, perda de osso alveolar e eventual esfoliação dos dentes em casos severos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992). A forma mais branda da doença periodontal (DP) é a gengivite, caracterizada por inflamação nas papilas, edema, eritema e tendência ao sangramento (AMAR; HAN, 2003).

A DP pode ser crônica ou agressiva e ainda localizada ou generalizada (SLOTS, 2002). De acordo com a Academia Americana de Periodontia (1999) convencionou-se uma nova classificação baseada em critérios clínicos e radiográficos, em que se avalia, além da profundidade de bolsa, a perda de inserção como parâmetro de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico na doença periodontal (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das periodontites de acordo com a Academia Americana de Periodontia (1999).

Periodontite Crônica	Extensão	Severidade
Localizada	< 30% dos sítios	Leve: perda de inserção de 1 – 2 mm
Generalizada	> 30% dos sítios	Moderada: perda de inserção de 3 – 4 mm Severa: perda de inserção > 5mm

Evidências baseadas em estudos microbiológicos, imunológicos e clínicos têm mostrado que algumas formas de DP em adultos podem permanecer estáveis por muitos

anos sem oferecer riscos à dentição, enquanto outras necessitam tratamento intensivo, levando em último caso à perda óssea (SEYMOUR, 1987).

A DP é causada por bactérias na placa dental, com evidências de que patógenos periodontais específicos são responsáveis pela forma progressiva da doença (SEYMOUR; GEMMELL, 2001). A DP crônica severa está associada a uma complexa flora microbiana contendo aproximadamente 500 tipos diferentes de bactérias e muitos desses microrganismos possuem significativo papel virulento, sendo que, algumas dessas bactérias periodontopáticas específicas da cavidade oral como *Actinobacillus actinomicetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* podem, ainda, causar infecções crônicas e disseminar-se para a circulação sistêmica e afetar outros órgãos (KESAVALU et al., 2002).

Socransky et al. (1998) descreveram complexos bacterianos associados às formas avançadas da DP crônica. Dentre estes, o principal denominado complexo vermelho, é formado pelos microrganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Coerente com o conceito de que a presença da bactéria patogênica *per se* é insuficiente para causar a doença (SEYMOUR; TAYLOR, 2004), a susceptibilidade do paciente é de fundamental importância para o desenvolvimento da DP (SEYMOUR, 1991).

Os fatores periodontopatogênicos bacterianos associados à DP podem ser classificados em diretos e indiretos (LIÉBANA et al., 2004). A patogenicidade direta é devido à ação de elementos estruturais e metabólicos, exotoxinas e outros produtos produzidos pelas bactérias que exercem influência direta nos tecidos periodontais e têm como principais consequências: destruição tecidual, diminuição da proliferação do fibroblasto, progressão microbiana e penetração nas células epiteliais, aumento da apoptose e fenômenos citotóxicos (DARBY; CURTIS, 2001; EZZO; CUTLER, 2003;

YAMANO et al., 2003). Já a patogenicidade indireta, diminui a resistência do hospedeiro e pode interferir especialmente na fagocitose por diferentes mecanismos (HOLT et al., 1999; EZZO; CUTLER, 2003).

Em relação ao tratamento, geralmente a DP crônica moderada (DPCM) pode ser tratada com procedimentos não cirúrgicos, incluindo raspagem e alisamento radiculares. Para a DP crônica severa (DPCS), tratamentos cirúrgicos podem ser necessários, incluindo a eliminação de bolsas, reconstrução de papilas e até mesmo enxertos, de tecidos moles ou duros (ósseos) (AMAR; HAN, 2003).

3.2. Diabetes mellitus (DM)

O diabetes mellitus (DM) consiste em um grupo de desordens que são caracterizadas por redução ou falta de produção de insulina (YOON, 1991; TAYLOR et al., 1998). Ele é causado pelo mau funcionamento do metabolismo de lipídios e de glicose dependente de insulina e se apresenta como a tríade clássica de sintomas: polidipsia, poliúria, e polifagia que são freqüentemente acompanhadas por fadiga crônica e perda de peso (SOSKOLNE; KLINGER, 2001). O indivíduo pode possuir tolerância alterada à glicose, metabolismo prejudicado de carboidratos e lipídeos com aumento de açúcar no sangue ou hiperglicemia. A hiperglicemia que ocorre no diabético pode predispor o indivíduo a complicações como aterosclerose, doenças renais ou retineanas e comprometer a circulação nas extremidades (TAYLOR et al., 1998).

Os critérios para o diagnóstico da DM, segundo a American Diabetes Association 2003, para que o indivíduo seja considerado positivo são: níveis de glicose $\geq 200\text{mg/dL}$ medidos randomicamente em pessoas com sintomas como poliúria, polidipsia ou perda de peso; indivíduos com níveis de glicose sanguínea $\geq 126\text{mg/dL}$; e níveis de glicose sanguínea $\geq 200\text{ mg/dL}$, 2 horas após ingestão de 75g de glicose. A

classificação do DM reconhece diferentes formas da doença. Dentre elas pode-se ter: do tipo I (insulino-dependente); tipo II (não insulino-dependente); de outros tipos específicos; e diabetes mellitus gestacional.

3.2.1. Diabetes mellitus tipo I

É causada pela destruição das células β do pâncreas que produzem a insulina necessária para evitar a hiperglicemia. Essa destruição pode ser causada por reação auto-imune ou infecção viral (YOON, 1991; NISHIMURA et al., 1998) e essa destruição é acompanhada pela tendência desses pacientes em desenvolver cetoacidose, se a insulina não for administrada (SOSKOLNE; KLINGER, 2001).

A DM tipo I também é conhecida por diabetes juvenil por acometer mais freqüentemente indivíduos com menor faixa etária, e compreende de 2 a 5% de todos os casos de diabetes (MATTSON; CERUTIS, 2001).

3.2.2. Diabetes mellitus Tipo II

É resultado da combinação entre resistência à insulina pelas células e defeito na secreção da insulina (SOSKOLNE; KLINGER, 2001). No primeiro caso, podem ocorrer defeitos na molécula de insulina ou anormalidades nos receptores da membrana celular para insulina. Essa condição impede seu funcionamento e essa resistência é tão prejudicial quanto sua falta (TAYLOR et al., 1998; REES, 1994).

Devido à DM tipo II acometer mais tardiamente, ela é conhecida como DM do adulto. A DM tipo II pode ser freqüentemente controlada por dieta e perda de peso, e representa de 85 a 90% dos casos de DM (TAYLOR et al., 1998; REES, 1994). Esse tipo pode também requerer insulina em determinado estágio da doença.

3.2.3. Diabetes mellitus de outras causas específicas

Esse tipo está associado a doenças sistêmicas crônicas que resultam no mau funcionamento do pâncreas devido à inflamação ou infecção, alterando com isso a produção de insulina (Associação Americana de Diabetes, 1997).

3.2.4. Diabetes mellitus Gestacional

Esse tipo desenvolve-se durante o período gestacional, podendo ser reversível ou não, e possui etiologia hormonal (Associação Americana de Diabetes, 1997).

3.2.5. Complicações do diabetes mellitus

As principais complicações do DM incluem: retinopatia, nefropatia, neuropatia e anormalidades circulatórias resultantes da hiperglicemia (SOSKOLNE; KLINGER, 2001).

Dois possíveis mecanismos para explicar essas alterações têm sido propostos. O primeiro é a via Polyol em que a glicose é reduzida a sorbitol pela enzima aldolreductase. O sorbitol é considerado uma toxina tecidual e tem sido implicado na maioria das complicações do DM (ROBINSON et al., 1983). O segundo mecanismo está relacionado à produção de “Advanced Glycation Endproducts” (AGEs) devido à ação não enzimática das hexoses às proteínas. Esta alteração de muitas proteínas corpóreas que incluem o colágeno, a albumina plasmática, proteínas oculares e lipoproteínas, acaba comprometendo suas funções (BROWNLEE, 1992). AGEs são, portanto, produtos finais de reações não enzimáticas de proteínas, são encontrados no plasma, acumulam-se em tecidos, e com isso, propiciam o agravamento no quadro do DM (STERN et al., 2002).

O controle do DM está claramente relacionado à manutenção dos níveis sanguíneos de glicose em limites considerados normais e existem claras evidências de que as complicações podem ser evitadas pelo controle metódico da hiperglicemia (SOSKOLNE; KLINGER, 2001). O monitoramento da eficiência desse controle é feito pela medida dos níveis de proteínas séricas glicosiladas, especialmente a α -hemoglobina que, devido à sua incorporação nas hemácias, propicia indicação nos níveis de glicose sérica dos últimos 2 ou 3 meses (MATTSON; CERUTIS, 2001).

Tanto a DM tipo I quanto a tipo II são caracterizadas por hiperglicemia, hiperlipidemia e complicações associadas (GABIRRR et al., 2000).

3.3. Interações entre doença periodontal e doenças sistêmicas

Existem evidências de que as relações entre DP e doenças sistêmicas possam ser bidirecionais (AMAR; HAN, 2003). Segundo a USDoHaH (2000), não somente doenças sistêmicas podem ter manifestações bucais mas a DP pode também exacerbar certas condições sistêmicas. Estudos mostram níveis circulantes de componentes pró-inflamatórios bacterianos como endotoxinas em pacientes com DP crônica severa significativamente maiores quando comparados aos de pacientes com saúde periodontal (WILSON et al., 1996).

3.3.1. Doença periodontal e doença cardiovascular

Patógenos orais oriundos de lesões periodontais alcançam a corrente sanguínea, induzindo reações inflamatórias sistêmicas e efectoras contra estas bactérias periodontais. Além disso, a resposta inflamatória local crônica e intensa da periodontite resulta em mediadores da inflamação circulantes que poderiam iniciar ou exacerbar os componentes inflamatórios da aterosclerose (BECK, 1999).

Tem sido proposto que a infecção crônica bacteriana da periodontite pode provocar e modificar a aterosclerose por estabelecer uma carga sistêmica de patógenos, endotoxinas e citocinas inflamatórias, que podem contribuir para o progresso dos eventos aterogênicos e tromboembólicos (OFFENBACHER, et al., 1999).

Certas bactérias da placa dental podem causar endocardite e coagulação disseminada intravascular e têm sido frequentemente localizadas em ateromas humanos (STELZEL et al., 2002). Logo, esses patógenos possuem a capacidade de promover o desenvolvimento da aterosclerose e dar início à trombose coronária (AMAR; HAN, 2003).

3.3.2. Doença periodontal e desordens respiratórias

Infecções respiratórias como pneumonia e certas doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) envolvem a aspiração da bactéria da orofaringe para o trato respiratório (SETHI et al., 2000; BARNES, 2000). A aspiração dos conteúdos orais é provavelmente o maior responsável pela interação entre DP e infecções respiratórias. A relação entre pobre saúde bucal (doença periodontal) e doença respiratória (pneumonia ou DPOC) têm também sido sugerida por um número considerável de estudos epidemiológicos (SCANNAPIECO; HO, 2001). Vários patógenos orais têm sido identificados como presentes em infecções pulmonares como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides oralis*, e *A. Actinomyces* (SCANNAPIECO, 1999).

A DP pode ainda agir em conjunto com outros fatores (fumo, alergia, fatores genéticos, etc) para contribuir para a progressão e/ou exacerbação das doenças respiratórias. Entretanto, são necessários mais estudos para se determinar a relativa

influência das condições orais na patogênese das doenças respiratórias (AMAR; HAN, 2003).

Muitos casos têm sido descritos sobre o papel potencial dos microrganismos orais na patogênese das infecções respiratórias (SCANNAPIECO, 1999). Esses microrganismos poderiam ser aspirados diretamente para o interior das vias aéreas em altas concentrações, especialmente em pacientes com periodontite severa, e então causar infecção. É ainda possível que as bactérias orais, especialmente espécies anaeróbias, liberem produtos biologicamente ativos como lipopolissacarídeos (LPS) e enzimas bacterianas específicas que seriam capazes de modificar a via aérea mucosa por estimular liberação de citocinas inflamatórias pelas células epiteliais (AMAR; HAN, 2003).

3.3.3. Doença periodontal e osteoporose

A maioria dos estudos que correlacionam DP e osteoporose investigam o papel desta última no início e no progresso da periodontite e perda óssea (LUNDSTROM et al., 2001). Sabe-se que a etiologia e a patogênese da osteopenia oral e sistêmica são similares em vários aspectos, e têm ainda um caráter multifatorial (LOZA et al., 1996). O mecanismo de perda óssea é mais provável que seja pelo aumento da reabsorção óssea, devido ao aumento da atividade osteoclástica local/sistêmica. Somado a isso, tanto a perda óssea local quanto a sistêmica possuem fatores de risco como: idade (JEFFCOAT; CHESNUT, 1993), deficiência de estrógeno (GENCO; GROSSI, 1998), e fumo (PAYNE et al., 2000). Esse mecanismo de interação local/sistêmico deve ser melhor estudado para que se possa compreender melhor a interdependência dos dois processos.

3.3.4. Doença periodontal e diabetes mellitus

Existem amplas evidências na literatura que associam diabetes e doença periodontal (KATZ et al., 2005). Ambas as doenças têm uma incidência relativamente alta na população geral e caracterizam algum grau de disfunção do sistema imune (AMAR; HAN, 2003).

A infecção periodontal possui um efeito adverso no controle glicêmico (STEWART et al., 2001) e estudos demonstram que pacientes diabéticos com periodontite severa exibem mais complicações do DM e podem apresentar deficiências no controle metabólico quando comparados com diabéticos sem periodontites (TAYLOR et al., 1996; TERVONEN; KARJALAINEN, 1997; COLLIN et al., 1998). Um desses estudos mostrou que pacientes DM tipo II com periodontite severa foram aproximadamente seis vezes mais propensos a ter baixo controle glicêmico durante dois anos em avaliação que pacientes sem DP severa (TAYLOR et al., 1996). Isto sugere que algumas alterações metabólicas induzidas pelo DM servem para diminuir a resistência do hospedeiro e romper o equilíbrio periodontal, e que estas alterações induzidas pelo DM na resposta imune do hospedeiro podem não ser evitadas ou reversíveis com controle glicêmico (IACOPINO, 2001).

As cinco principais complicações do diabetes incluem: microangiopatias (estando a retinopatia entre elas); nefropatias; neuropatias; doença macrovascular e retardo na cicatrização de feridas – pode ser que sejam causadas pela hiperglicemia (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2003). À periodontite tem sido atribuído o status de sexta complicação do diabetes (LÖE, 1993).

Historicamente, estudos que relacionam diabetes e periodontite têm se focado nas mudanças vasculares nos tecidos periodontais como microangiopatia gengival (LISTGARNEN, 1974), hipofunção dos granulócitos (MANOUCHEHR-POUR et al.,

1981), aumento da labilidade do tecido resultando em diminuição da produção de colágeno ou aumento na atividade da collagenase gengival (SORSA et al., 1992) e mudanças na microflora oral (ZAMBON et al., 1988).

Os mecanismos biológicos importantes em DM também afetam a saúde periodontal e parecem ser multifatoriais. Mecanismos que contribuem para esse processo têm sido citados tais como: microangiopatias, alterações no Fluido Crevicular Gengival (FCG), alterações no metabolismo do colágeno, resposta inflamatória do hospedeiro, alterações na microflora subgengival e predisposição genética (SALVI et al., 1997).

Existem evidências substanciais para suportar que o diabetes seja fator de risco para a pobre saúde periodontal, e também há evidência para a infecção periodontal adversamente afetar o controle glicêmico no diabetes (TAYLOR, 2001). Evidências indiretas vêm de investigações de relações entre resistência à insulina e doenças inflamatórias de tecidos associados (SVENSON et al., 1987; HÄLLGREN; LUNDQUIST, 1983), outras doenças clínicas e infecção aguda (DROBNY et al., 1984; SAMMALKORPI, 1989).

Em relação a esse sinergismo entre DM e DP, Pickup e Crook (1998) sugeriram a hipótese de que a DM tipo II pode ser uma desordem do sistema imune inato e resulta em um processo crônico e de baixo nível inflamatório. Os agentes desencadeantes da inflamação são muitos e potencialmente incluem a infecção oral, que pode levar a uma cascata de eventos como o aumento na produção de citocinas (HOTAMISLIGIL, 1999), ativação da síntese de proteínas de fase aguda (PICKUP et al., 1997) e conseqüente resistência à insulina. Esses fatores produzem mudanças patogênicas resultando no DM tipo II (WINKLER et al., 1998).

Vários mecanismos têm sido propostos para o aumento da susceptibilidade à infecção em diabéticos, incluindo impedimento quimiotático, fagocítico, e eliminação bacteriana por células da resposta imune inata (PICKUP; CROOK, 1998). Interessantemente, diabéticos não são mais susceptíveis a todas as infecções, mas parecem ser particularmente mais vulneráveis às infecções gram-negativas (JOSHI et al., 1999).

O acúmulo de AGEs afeta a migração e atividade das células mononucleares e polimorfonucleares, resultando no estabelecimento de uma flora subgengival mais patogênica (GROSSI; GENCO, 1998). Esta pode ser a explicação para o maior grau de severidade periodontal, freqüentemente encontrado nos pacientes diabéticos. A maturação e gradual transformação dessa microflora essencialmente Gram-negativa iria, por sua vez, constituir via epitélio ulcerado da bolsa uma fonte crônica de desafio sistêmico (GROSSI; GENCO, 1998). Logo, o tratamento da DP em pessoas com DM é claramente um importante componente na manutenção da saúde bucal e também possui um papel fundamental na manutenção do controle glicêmico (AMAR; HAN, 2003).

3.4. Resposta imunológica na doença periodontal/diabetes mellitus

3.4.1. Citocinas

É aceito que muito da destruição tecidual periodontal observada na periodontite é mediada pelo hospedeiro através da liberação de citocinas inflamatórias por células do sistema imune e tecidos, em resposta à flora bacteriana e seus produtos/metabólitos, especialmente LPS (PAGE, 1991). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular, envolvidas no estágio efetor da imunidade e inflamação, que regulam a amplitude e duração da resposta (SEYMOUR; GEMMEL, 2001). As citocinas interagem entre si; primeiro por induzirem a si próprias; segundo por transmodularem os receptores de

superfície celular e terceiro por interações sinérgicas, aditivas ou antagonistas no funcionamento celular (BALKWILL; BURKE, 1989).

As citocinas têm sido estudadas em células *in situ*, células extraídas de tecidos gengivais, células mononucleares de sangue periférico, linhagens e clones de células T assim como populações de células purificadas. Várias técnicas têm sido empregadas incluindo citometria de fluxo, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), hibridização *in situ* e reação da cadeia polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR). Além disso, componentes bacterianos incluindo produtos de sonicados, e células mortas por formalina, outros componentes de membrana, e antígenos purificados têm sido utilizados para estimular células *in vitro* comparando os perfis de citocinas (ZADEH et al., 2000).

Fatores de virulência bacterianos resultam diretamente na degradação de tecidos ou causam a liberação de mediadores biológicos por parte de células do hospedeiro. Exemplos de mediadores envolvidos com essa destruição são proteinases, citocinas e prostaglandinas (OZMERIC, 2004).

As citocinas são sinalizadores intercelulares e representam um mecanismo fundamental pelo qual as células envolvidas na resposta imune se comunicam (SEYMOUR; TAYLOR, 2004). A produção de citocinas “apropriadas” é essencial para o desenvolvimento de imunidade protetora (SEYMOUR; GEMMELL, 2001), caso contrário, a doença pode adquirir caráter progressivo ou destrutivo (KELSO, 1990).

A forma pela qual o sistema imune seleciona a resposta frente a determinado patógeno não está bem esclarecida (MOSMANN; SAD, 1996). Entretanto, a determinação das características tanto do hospedeiro quanto do patógeno é que irá direcionar qual perfil de células produtoras de citocinas será ativado (Th1-resposta

celular ou Th2-resposta humoral). Isso é importante na compreensão não somente da patogenia da DP mas também de outras doenças infecciosas (KELSO, 1990).

As citocinas são reguladores celulares que possuem influência principal na produção e ativação de diferentes células efectoras. Células T e macrófagos são a principal fonte, embora, elas também possam ser produzidas por uma ampla variedade de células que desempenham importantes papéis em muitas respostas fisiológicas (SEYMOUR; GEMMELL, 2001).

Na DP, A alta vascularização do periodonto inflamado pode servir como fonte semelhante à endócrina, para fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e outros mediadores inflamatórios (GROSSI; GENCO, 1998; OFFENBACHER et al., 1996). O $\text{TNF-}\alpha$, a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-1 (IL-1), todos mediadores importantes na inflamação periodontal, têm sido mostrados por terem importantes efeitos no metabolismo da glicose e de lipídeos, particularmente seguido a uma infecção aguda ou trauma (FEINGOLD et al., 1989; LING et al., 1995). Tem sido relatado que o $\text{TNF-}\alpha$, a IL-6 e a IL-1 interferem com o metabolismo glicídico por serem antagonistas da insulina (LING et al., 1995; MICHIE, 1996; PICKUP et al., 1997; FEINGOLD; GRUNFELD, 1992; GRUNFELD et al., 1990).

A resistência induzida pela infecção, se crônica, serviria como precursor para ativar o DM. A destruição de células β pancreáticas pode resultar de um desequilíbrio pró-inflamatório criado por níveis elevados de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ (MOLLER, 2000). Diante disso, alguns pesquisadores têm especulado se citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, produzidas em resposta sistêmica à DP poderiam ser responsáveis pela resistência à insulina e subsequente baixo controle glicêmico nos pacientes com DP (LOSCHKE et al., 2000).

Localmente, os LPS bacterianos estimulam monócitos, leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e outras células a produzirem IL-1, TNF- α e prostaglandina E2 (PGE2). A IL-1 e o TNF- α parecem possuir importante papel na destruição tecidual e PGE2 parece ser parcialmente responsável pela perda óssea associada à DP (OZMERIC, 2004.). O LPS produzido por *Porphyromonas gingivalis* é um potente indutor de IL-1 β , TNF- α e PGE2, as mesmas citocinas pró-inflamatórias estimuladas pelos AGEs em DM (GROSSI, 2001). Níveis elevados de TNF- α estão presentes na obesidade, principal causa de resistência à insulina e bem conhecido fator de risco para o DM tipo II. É provável que os níveis mais elevados de TNF- α possam contribuir para o início do DM em indivíduos obesos (MEALEY; RETHMAN, 2003).

Células do tecido periodontal estimuladas por bactérias associadas à DP severa secretam citocinas incluindo IL-1 β , interleucina 8 (IL-8) e TNF- α . A IL-1 β , potente estimulador de reabsorção óssea, está relacionada à patogênese da destruição do tecido periodontal (GORE et al., 1998). A IL-1 β pode modular a reabsorção óssea por ativar osteoclastos e estimular a síntese de PGE2 (ALEXANDER et al., 1996).

De acordo com Gemmell e Seymour (1994), as similaridades entre a lesão periodontal inicial/estabelecida e o tipo de hipersensibilidade apresentada sugere que o perfil de citocinas T auxiliaadoras 1 (Th1) seja o principal mediador. Tal conceito é consistente com a proposta de que a forte resposta imune inata leva à produção de interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18) por monócitos e neutrófilos. A IL-18 foi descoberta em 1989 como um forte indutor de interferon gama (IFN- γ) e é estruturalmente homóloga à IL-1 β resultando em mecanismos de sinalização e transmodulação de sinais similares. A IL-18 é capaz de acelerar a maturação de células T virgens para células Th1 tendo como co-fator a IL-12 e conseqüentemente a produção de IFN- γ (SEYMOUR; TAYLOR, 2004). A produção de IFN- γ aumenta a atividade

fagocítica dos neutrófilos e macrófagos favorecendo a contenção da infecção. Entretanto, a lesão persiste devido à formação contínua do biofilme bacteriano (GEMMELL; SEYMOUR, 1994). Além disso, respostas T auxiliaadoras 2 (Th2) aumentadas também têm sido relatadas. Células T de sangue periférico de pacientes com DP e com altos títulos de anticorpos anti-*Porphyromonas gingivalis* produziram maiores quantidades de interleucina 4 (IL-4) que células de pacientes saudáveis, quando estimuladas *in vitro* com a bactéria (AOYAGI et al., 1995). A IL-13 mimetiza os efeitos da IL-4 em células não linfóides como os macrófagos, porém, parece ter um efeito menor que a IL-4 sobre os linfócitos T ou B. A principal ação da IL-13 é agir como antagonista de IFN- γ , inibindo sua ativação (ABBAS, 2003).

A interleucina 10 (IL-10) no DM, tem sua secreção significativamente aumentada em resposta ao LPS (STEIN et al., 1997), e na DP possui níveis detectáveis em FCG de bolsas em pacientes com periodontite, mas não detectável em controles (GAMONAL et al., 2000).

Diante desses achados, sugere-se que a desregulação na produção de citocinas associada ao DM pode explicar as seqüelas mais severas das infecções apresentadas em pacientes com DM quando comparadas aos indivíduos controle (NAGHIB et al., 2004).

3.4.2. “Advanced glycation endproducts” (AGEs)

Os AGEs são quimiotáticos para linhagens monócito-macrófago e são capturados por monócitos ou células endoteliais via receptores específicos conhecidos como receptores “Scavenger” de macrófagos (MSR) (HORIUCHI et al., 1986) ou receptores para “Advanced Glycation Endproducts” (RAGE) (NEEPER et al., 1992) estimulando os monócitos a proliferar (YUI et al., 1994).

Os AGEs são biologicamente ativos e podem iniciar uma série de respostas celulares incluindo estimulação da quimiotaxia de monócitos, reabsorção óssea induzida por osteoclastos, proliferação de células musculares vasculares, agregação plaquetária e estimulação da secreção de citocinas inflamatórias, collagenases e vários fatores de crescimento. Seu efeito é mediado pelo menos em parte pelos RAGEs (LI; SCHMIDT, 1997).

A formação de AGEs pode ser responsável pelo aumento da severidade da DP frequentemente encontrado em pacientes com DM (MATTSON; CERUTIS, 2001). Uma explicação biológica para esse processo é que o acúmulo de AGEs afeta a migração e a atividade fagocítica das células mononucleares e polimorfonucleares, resultando no estabelecimento de uma flora subgengival mais patogênica. A maturação e transformação gradual dessa microflora subgengival, essencialmente de bactérias Gram-negativas, constitui, através do epitélio ulcerado da bolsa, fonte de desafio sistêmico (GROSSI; GENCO, 1998). O modelo proposto por Grossi e Genco (1998) retrata ainda que a infecção periodontal aumenta a resistência à insulina e à hiperglicemia no diabético pelo aumento dos AGEs e sua adesão aos RAGEs nos monócitos. Esta ligação resulta em regulação positiva dos fagócitos, com aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios. O monócito produz citocinas catabólicas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α que, por sua vez, aumentariam a produção de PGE2, um metabólito do ácido araquidônico. Essa interação IL-1 β /PGE2 parece ser fundamental para o processo de reabsorção do osso alveolar.

Foi mostrado também que os RAGEs são induzidos por AGEs e TNF- α (TANAKA et al., 2000). Com isso, a ativação de RAGEs propaga o estado crônico inflamatório da doença e continua a gerar AGEs (ZHOU et al., 2003). Os RAGEs possuem algumas características biológicas que desempenham papel fundamental na

patogênese da DP (KATZ et al., 2005). Funcionam como um importante co-fator no aumento da expressão de receptores para moléculas de adesão sendo encontrado em células endoteliais de pacientes com DM (SCHMIDT et al., 1995), e estas moléculas também estão associadas ao grau da DP (JOE et al., 2001).

Estudos recentes demonstram pela primeira vez que os AGEs modulam a maturação e função das células dendríticas do sangue periférico e reduzem seu potencial estimulatório. Tais efeitos propiciam a ligação entre a formação dos AGEs em DM e algumas consequências imunológicas da doença (PRICE et al., 2004).

3.4.3. Resposta imune celular e alterações celulares

O colágeno, primeira barreira do periodonto, é produzido por fibroblastos gengivais ou do ligamento periodontal. A hiperglicemia reduz a proliferação e a maturação do fibroblasto. Os fibroblastos gengivais e os do ligamento periodontal obtidos a partir de pacientes diabéticos têm sido relacionados a uma menor síntese de colágeno, quando comparados a fibroblastos de pacientes não diabéticos (GOLUB et al., 1982;). Há homeostase contínua entre destruição e reparo nos tecidos periodontais. O aumento na destruição enzimática do colágeno ou a diminuição na formação do colágeno pelo fibroblasto irá resultar no balanço negativo na renovação do tecido com resultante perda do mesmo (MATTSON; CERUTIS, 2001). Essa destruição tecidual é mediada por várias enzimas conhecidas como proteinases e metaloproteinases (GOLUB et al., 1982), sendo as proteinases responsáveis pela ampla destruição do colágeno (MATTSON; CERUTIS, 2001).

A DP é uma infecção, e quando essa infecção atinge um nível crítico, isto irá iniciar uma resposta imune do hospedeiro (ROSENTHAL et al., 1988; OFFENBACHER, 1996). Os PMNs são elementos essenciais na defesa do hospedeiro

contra infecções por micróbios Gram-negativos (MEALEY, 1999). Defeitos que comprometam a função dos PMNs podem predispor qualquer indivíduo à doença periodontal mais severa. Para neutralizar efetivamente a infecção periodontal, os PMNs devem aderir à parede do vaso (marginação), atravessar o vaso (diapedese), se mover até o biofilme dental (quimiotaxia) e então internalizar e destruir as bactérias, fenômeno conhecido por fagocitose (OFFENBACHER, 1996). Há uma constante interação citotóxica entre os PMNs e a microflora subgingival. Qualquer defeito ou falha na função dos PMNs pode propiciar mudanças no balanço entre destruição e reparo com o início e progresso da doença periodontal. Isto é verdade tanto em indivíduos com DM quanto em não diabéticos (CIANCIOLA et al., 1982). Logo, o prejuízo na função dos PMNs em DM é multifatorial e está provavelmente relacionado aos níveis de glicose (LINN et. al., 1993) e à glicosilação das proteínas dos PMNs tais como nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenase (NADPH) oxidase e mieloperoxidase.

Estudos têm demonstrado diminuição na proporção de células T $CD4^+/CD8^+$ em lesões periodontais de adultos comparados aos do sangue periférico (COLE et al., 1986; TAUBMAN et al., 1984). Além disso, células T obtidas de tecidos periodontais doentes possuem menor habilidade para responder à reação de linfócitos autólogos, sugerindo supressão das respostas mediadas por células (COLE et al., 1987).

O modelo que inter-relaciona as citocinas e o perfil de resposta (GEMMELL; SEYMOUR, 1998, 1994; SEYMOUR et al., 1993) demonstra que a dominância de células B/plasmócitos na lesão avançada/progressiva sugere um papel decisivo para essas células Th2 nesses estágios. Logo, se a resposta imune inata é de baixa intensidade, baixos níveis de IL-12 são produzidos e por consequência a resposta Th1 pode não ser capaz de conter a infecção. Em um segundo momento, a ativação policlonal de células B e a produção subsequente de IL-4, irá favorecer a resposta Th2

com maior ativação de células B e maior produção de anticorpos. Se estes anticorpos são protetores e debelam a infecção, a doença não irá progredir, mas se por outro lado eles não são protetores, a lesão irá persistir e a ativação continuada de células B pode resultar em produção exacerbada de IL-1 e subsequente destruição tecidual.

3.4.4. Resposta imune humoral

O sistema complemento desempenha papel central em alterar a resposta imune e também influenciar a biossíntese de imunoglobulinas (ANIL et al., 1990). O papel do complemento na DP é provavelmente participar na proteção contra bactérias periodontais patogênicas (GENCO, 1992). Estudos também demonstram que baixos níveis de C4 e anormalidades de outros componentes como C1q e C3 estão associados à DM (REEVES; WILSON, 1992).

A ativação de linfócitos B localmente é dependente de células T. Se há depleção de células TCD4⁺, isto resulta em redução da atividade humoral e conseqüente redução na produção de anticorpos (GEMMELL; SEYMOUR, 1992).

Dependendo do estímulo antigênico, as células B podem ser ativadas policlonalmente ou suprimidas (TEW et al., 1989). Em tecidos gengivais inflamados, a produção de anticorpos específicos para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* está suprimida, porém, contra *Porphyromonas gingivalis* dos isotipos imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina A (IgA) está aumentada (SHENKER, 1987). Isotipos específicos para *P.gingivalis* contra fimbrias e LPS bacterianos estão aumentados com desenvolvimento da lesão; assim, células produtoras de anticorpos presentes na lesão periodontal progressiva estão em maior número que na lesão inicial ou moderada. De acordo com a especificidade antigênica, células produtoras de IgG e IgA isoladas de gengiva inflamada podem estar aumentadas na lesão avançada.

corroborando a hipótese de que a lesão progressiva ou severa deva ser caracterizada predominantemente por células B (SEYMOUR, 1993).

Altos níveis de IgA salivar contra bactérias na placa dental podem proteger contra o desenvolvimento da gengivite (SCHENK et al., 1993). Embora o infiltrado celular inflamatório nos tecidos periodontais seja composto principalmente por neutrófilos; as células B compreendem porção substancial do infiltrado de células mononucleares na DP. Estas células plasmáticas são produtoras essencialmente de IgG, com níveis baixos de IgA em tecidos de granulação de pacientes com periodontite (EBERSOLE, 2003).

3.5. Utilização de saliva em diagnóstico

Embora as bactérias sejam obviamente os agentes iniciadores da doença periodontal, a complexidade da microflora associada e o papel crítico do hospedeiro na determinação da resolução ou não da infecção bacteriana, torna difícil o estabelecimento de marcadores específicos em doença periodontal (OZMERIC, 2004).

Índices clínicos usados no diagnóstico das doenças periodontais são freqüentemente de uso limitado em indicar se a doença está latente ou ativa. Além disso, como são vários os mecanismos imunopatogênicos envolvidos, as combinações de indicadores são necessárias para otimizar o diagnóstico (OZMERIC, 2004).

Análises de saliva podem ser especialmente utilizadas na determinação do estágio periodontal. A determinação de constituintes salivares em pacientes diabéticos pode ser empregada na descrição e no entendimento de manifestações orais na DM, a partir de estudos que relatam que a composição das secreções das glândulas submandibulares e parótidas podem estar alteradas em pacientes com DM (MARDER et al., 1972).

Devido à natureza simples e não invasiva da coleta, a saliva pode ser utilizada nos processos de avaliação e monitoramento da resposta ao tratamento em periodontites. Indicadores salivares incluem enzimas, imunoglobulinas, marcadores fenotípicos, células do hospedeiro, hormônios, bactérias e seus produtos, íons e compostos voláteis (KAUFMAN; LAMSTER, 2000).

3.5.1. Enzimas

Enzimas, especialmente proteinases, desempenham um importante papel na destruição do periodonto, por exemplo, a dipeptidilpeptidase IV (DPP IV) que contribui para a ampla degradação do colágeno (GOSSRAU, 1979).

A análise de β -glicuronidase salivar é útil em predizer a presença de doença periodontal. Medidas do aumento no influxo de neutrófilos e mediadores associados com a β -glicuronidase na saliva podem propiciar a medida de risco para pacientes com DP (OZMERIC, 2004).

Outras enzimas que devem ser descritas são as proteases, especialmente as proteases de imunoglobulinas. Lappin et al. (2003) relatam que microrganismos orais possuem seletiva vantagem em colonizar e que eles possuem também a habilidade de inibir a imunidade mucosa e propiciar a degradação proteolítica da IgA. Esta reação específica das proteases bacterianas pode contribuir para o progresso da doença na periodontite agressiva (KILLIAN et al., 1989). A conseqüente liberação de fragmento cristalizável (Fc) de IgA no tecido periodontal pode aumentar a inflamação, já que esses fragmentos possuem atividade mitogênica sobre as células B (MORGAN et al., 1986). Desse modo, a degradação de IgA por proteases pode facilitar a penetração e disseminação de substâncias potencialmente tóxicas e de antígenos liberados pela flora

subgengival. Esse processo desempenha um importante papel na perpetuação das alterações inflamatórias associadas à doença periodontal destrutiva (HÄGEWALD et al., 2002).

3.5.2. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são os principais componentes solúveis de interações com antígenos do sistema imune. Nas secreções, a IgA é a imunoglobulina predominante, como consequência da resposta imune humoral induzida pela reatividade dos clones de linfócitos B, assim como da migração destas células com atividade secretória (HÄGEWALD et al., 2000).

A IgA exerce função protetora, antiinflamatória e regula negativamente a inflamação por inibir as funções moduladas pela IgG e IgM (HÄGEWALD et al., 2002). Há duas subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, que se diferem basicamente na porção Fc (DELACROIX, et. al., 1982), devido à deleção de 13 aminoácidos e 4 acetilglicosaminas na região de dobradiça da IgA2 (KILIAN et al., 1983), que torna a IgA1 mais susceptível à clivagem e à inativação por proteases que a IgA2 (FRANDSEN et al., 1995, LAPPIN et al., 2003). Além da porção Fc, as subclasses de IgA diferem devido às propriedades antigênicas, bioquímicas e biológicas (LOOMES et al., 1991). Aproximadamente de 40 a 50% da IgA das secreções são IgA1, ao passo que para IgA2 a porcentagem é de 50 a 60% (HANSON; BRANDTZAEG, 1980).

A resposta humoral da IgA em saliva de pacientes com periodontite agressiva, em que foram avaliadas subclasses de IgA reativas a microrganismos associados à DP, apresentou concentrações significativamente menores e índices de secreção mais baixos nesses pacientes (HÄGEWALD et al., 2002).

3.6. Lectina jacalina

As lectinas são proteínas que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos (VAN DAMME et al., 2002). As lectinas de plantas têm sido amplamente utilizadas em vários estudos imunológicos devido ao seu alto grau de especificidade por açúcares e poderem, em alguns casos, estimular células do sistema imune. A lectina extraída de *Artocarpus integrifolia*, a jacalina, inicialmente foi descoberta devido às suas propriedades mitogênicas (BUNN-MORENO; CAMPOS-NETO, 1981). Em função de observações que abordam como propriedades da jacalina, a sua capacidade de precipitar proteínas do soro e colostro humano, a purificação de IgA foi revolucionada, uma vez que se observou que essa propriedade era devido a ligação dessa lectina à resíduos de D-galactose presentes na região de dobradiça da IgA (ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985).

Trabalhos posteriores demonstraram que a Jacalina precipita IgA humana da subclasse IgA1 monomérica e dimérica porém, não IgA2, indicando que essa lectina pode ser usada para distinguir e isolar subclasses de IgA (KONDOH et al., 1986).

4.OBJETIVOS

- 1 - Avaliar por ELISA os títulos salivares totais de IgA1 no grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo II, portadores de doença periodontal crônica moderada (DPCM) e severa (DPCS).
- 2 - Analisar por RT-PCR a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-13 e IL-4 no grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo II portadores de DPCM e DPCS.
- 3 - Correlacionar os títulos de IgA1 e expressão de citocinas com o grau de severidade da doença periodontal em amostras de saliva de pacientes diabéticos tipo II.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Seleção dos pacientes

A utilização de amostras clínicas de pacientes foi registrada no comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia, Registro CEP: 053/04 e aprovada conforme parecer 085/04 em 16 de abril de 2004 (Anexo 1). Foi ainda assinado termo de consentimento (vide modelo - Anexo 2) por cada um dos pacientes submetidos ao estudo. Pacientes com diagnóstico prévio de diabetes tipo II e em tratamento, foram triados do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Especialidade Endocrinologia) e, posteriormente, submetidos ao exame clínico periodontal e anamnese. Foram excluídos do estudo: pacientes fumantes, pacientes que fizeram uso de terapia antimicrobiana nos últimos seis meses, bem como, aqueles que sofreram qualquer tipo de tratamento periodontal em igual período.

De acordo com os critérios convencionados pela Academia Americana de Periodontia em 2003 e que relacionam o grau de severidade da DP com a perda de inserção, foram selecionados 24 pacientes os quais foram agrupados em pacientes diabéticos portadores de doença periodontal crônica moderada (DPCM) e pacientes diabéticos portadores de doença periodontal crônica severa (DPCS). Foi realizada a completa documentação radiográfica periapical de todos os pacientes, complementar ao exame clínico dos grupos DPCM e DPCS (Fig. 1A e B, respectivamente). A sondagem foi realizada sempre pelo mesmo operador utilizando a sonda milimetrada periodontal Hu-Friedy™. Associado a isso, foram colhidas características clínicas dos pacientes envolvidos no estudo (Tabela 2). Todas as amostras foram colhidas e manipuladas de acordo com as normas de biossegurança (COSTA, 2002).

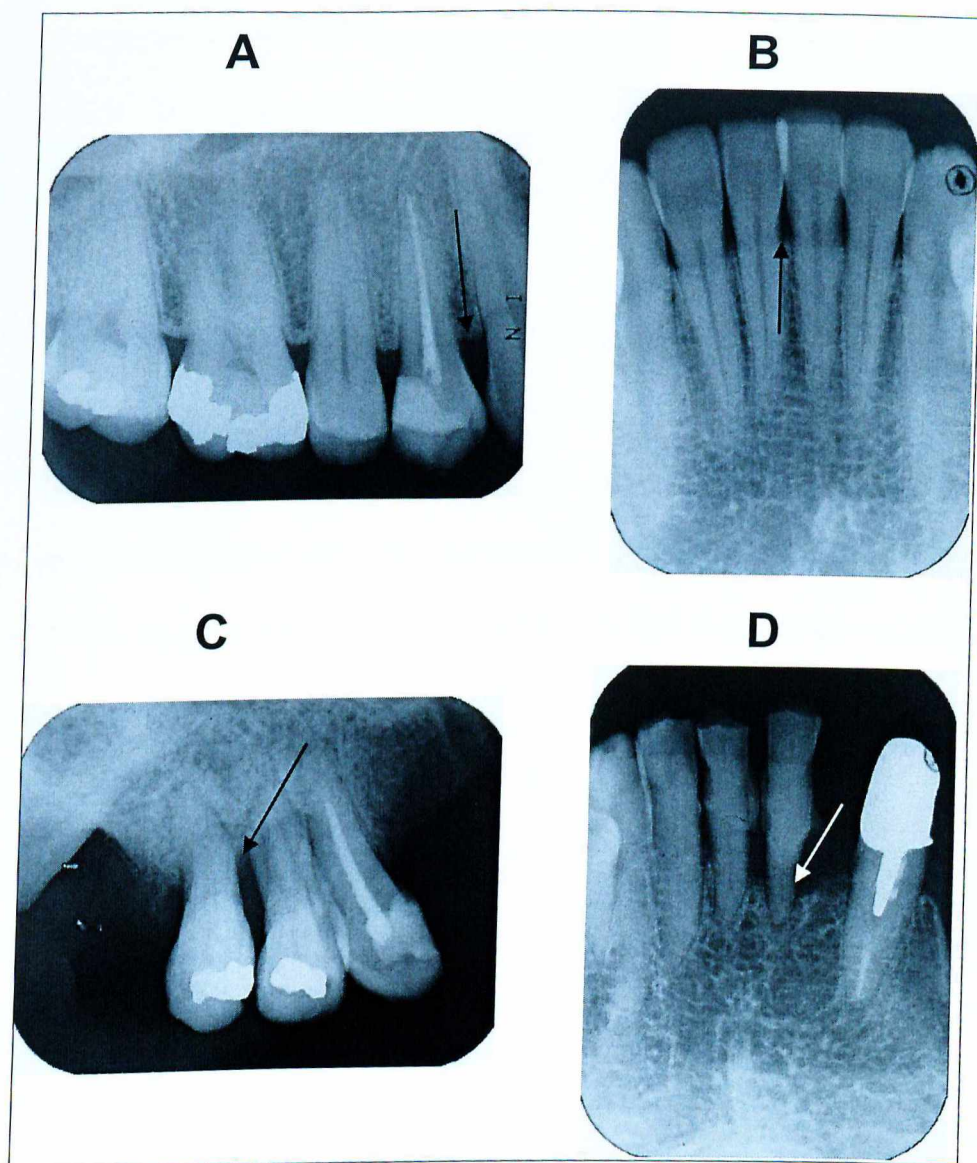


Figura 1. Alterações alveolares em pacientes com diabetes mellitus tipo II com doença periodontal crônica moderada (A e B) e severa (C e D). As setas nas figuras A e B indicam perda óssea moderada e em C e D perda óssea severa.

Tabela 2. Características Clínicas dos pacientes submetidos ao estudo.

Critérios	Moderada	Severa
Masculino	6	5
Feminino	7	6
Idade (anos)	54,46±9,47	53,63±14,23
Número de pacientes Insulino dependente	6/13	6/11

5.2. Obtenção das amostras de saliva

As amostras de saliva total foram coletadas sempre no período da manhã, entre 8:00 e 10:00 h, de forma não estimulada, na qual os pacientes depositaram em recipiente plástico, não reutilizável, um volume de 4mL de saliva e mantidos em gelo até seu processamento. Em seguida, as células e os sedimentos foram separados da parte solúvel por centrifugação a 1000 x g. O sobrenadante foi coletado, distribuído em alíquotas e congelado a -20°C para utilização na dosagem de IgA1 e, ao sedimento, foi adicionado 50 µL de *RNAlater*TM (Qiagen Inc., Valencia CA, USA) para conservação do RNA. O material foi congelado a -20°C até o momento do uso.

5.3. Ensaio para detecção de IgA1 por ELISA

5.3.1. Padronização do ELISA para detecção de IgA1

Placas de poliestireno (96 poços) de alta (Costar, Corning Inc. NY, USA) e baixa (Montegrotto Terme, Padova, Italy) afinidades, foram sensibilizadas com diferentes concentrações de Jacalina (Sigma Chemical CO. St. Louis, MO, USA) nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL de tampão carbonato/bicarbonato, 0,06 M, pH 9,6,

por 18 hs a 4°C. Diluições duplas das amostras de saliva de pacientes sadios diluídas a partir de 1:2 até 1:128 e de IgA humana de colostro (Sigma) diluída a partir de 200 até 0,10 µg/mL de salina tamponada com fosfatos (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) ou em PBST contendo 2% de gelatina (PBSTG, Difco) e incubados por 1 h a 37°C. Após lavagens, foi adicionado o conjugado imunoenzimático (IgG de cabra anti-IgA humana ligada à peroxidase, Sigma) nas diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000 em tampão PBST ou PBSTG. Em seguida, as placas foram lavadas, e, adicionado o substrato enzimático [(0,03% de peróxido de hidrogênio em tampão citrato-fosfato pH 5,0 contendo 0,1 µg de orto-fenileno de amino (OPD, Sigma)]. Após 15 min, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 2N (H₂SO₄) e a leitura efetuada em leitor de microplacas a 492 nm.

5.3.2. Titulação da IgA1 em amostras de saliva de pacientes DPCM e DPCS

Placas de poliestireno (96 poços) de alta afinidade (Costar) foram sensibilizadas (50 µL/poço) com Jacalina (Sigma) a 1 µg/mL e incubadas por 18 hs a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBST e adicionado 50 µL/poço das amostras de saliva em diluições duplas seriadas a partir de 1:8 até 1:1024 em PBSTG e incubadas por 1 h a 37°C. Após lavagens, foram adicionados 50 µL/poço do conjugado imunoenzimático diluído 1:1000 em PBSTG e incubadas por 1 h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionados 50 µL/poço do substrato enzimático. Após incubação por 15 min a reação foi interrompida com H₂SO₄ e a reatividade determinada pela leitura da absorbância a 492 nm. Os títulos de IgA1 em cada amostra foram estabelecidos pela recíproca da maior diluição em que a absorbância foi maior que o branco da reação (PBSTG).

5.4. Transcrição reversa-reação da cadeia polimerase (RT-PCR)

O RNA total do sedimento foi extraído utilizando o Kit de extração de RNA (Rneasy Mini Kit, Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. O produto obtido foi dissolvido em 50µL de H₂O bidestilada “RNase free”(Gibco · Life Technologies, Rockville, MD) estocado a – 70°C até o momento do uso. O cDNA foi obtido utilizando o iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA). Para a reação da PCR, 8 µL do “master mix” [(0,2 mM de dNTP, 1 µL de PCR buffer 10x, 0,2 µM de cada primer (senso e anti-senso de cada citocina analisada, IFN-γ 5’GTAAC TTTGACTTGAATGTCCAA-3’ e 5’GTAAC TGACTTGAATGTCCAA-3’, TNF-α 5’CTGGTAATGAGCCCATCTTATCTGG-3’ e 5’TTGGATGTTTCGTCCTCCCA-C-3’, IL-4 5’GGGTCTCACCTCCCAACTGC-3’ e 5’TGTCTGTTACGGTCAACTCGGT-3’, IL-13 5’TCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAA-3’ e 5’GAAAATGAGTCCACA-GCTCAGATG-3’), 4,4 µL de água, 1 unidade de Taq. Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA,USA)], foi misturado com 2 µL do cDNA de cada paciente. A mistura foi então colocada no termociclador (Applied Biosystems) programado para amplificação iniciando com denaturação por 3 min a 95°C, seguida por 37 ciclos de amplificação com denaturação de 30 seg a 95°C, anelamento de 30 seg a 57°C e extensão por 1 min a 72°C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) a 0,05 M pH 8,0 contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídio, a 127V durante 60 min. As bandas foram visualizadas em transiluminador (Hoefer Pharmacia Biotech Inc. San Francisco, CA. USA) e fotografada em câmara Polaroid filme tipo 667 (FisherBiotech, Cambridge. MA, USA).

5.5. Análise Estatística

A análise da variação dos títulos de IgA1 presentes nas amostras de saliva total de pacientes diabéticos nos grupos DPM e DPS foi realizada pelo teste ANOVA (GraphPad Prism, versão 3 para Windows), onde valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6.RESULTADOS

6.1. Parâmetros da reação ELISA

Observou-se maior discriminação entre as diluições das amostras de saliva assim como, a reatividade da IgA1 do colostro, com a jacalina na concentração a 1 µg/ml na sensibilização das placas, diluição do conjugado imunoenzimático a 1:1000 e a utilização de placas de alta afinidade (dados não mostrados). Sendo assim, esses parâmetros foram utilizados em todos os experimentos subseqüentes de titulação da IgA1 salivar, apresentadas no presente trabalho.

6.2. Determinação dos títulos de IgA1

Houve variação entre os títulos de IgA1 nas amostras de salivas nos diferentes pacientes com diabetes mellitus e doença periodontal (Fig. 2). Os títulos de IgA1 entre os pacientes diabéticos dos grupos DPCM e DPCS (Fig.3), mostraram-se estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste ANOVA. Observou-se que 61,5% dos pacientes diabéticos do grupo DPM apresentaram níveis de IgA1 ≥ 128 (Tabela 3). Por outro lado, em mais da metade dos pacientes diabéticos do grupo DPS (54,5%), os títulos de IgA1 observados foram ≤ 64 (Tabela 3). Em apenas 1 amostra de cada grupo de pacientes detectou-se o título de IgA1 16 e, o título 1024 não foi detectado em nenhuma das amostra de saliva analisadas (Figura 2).

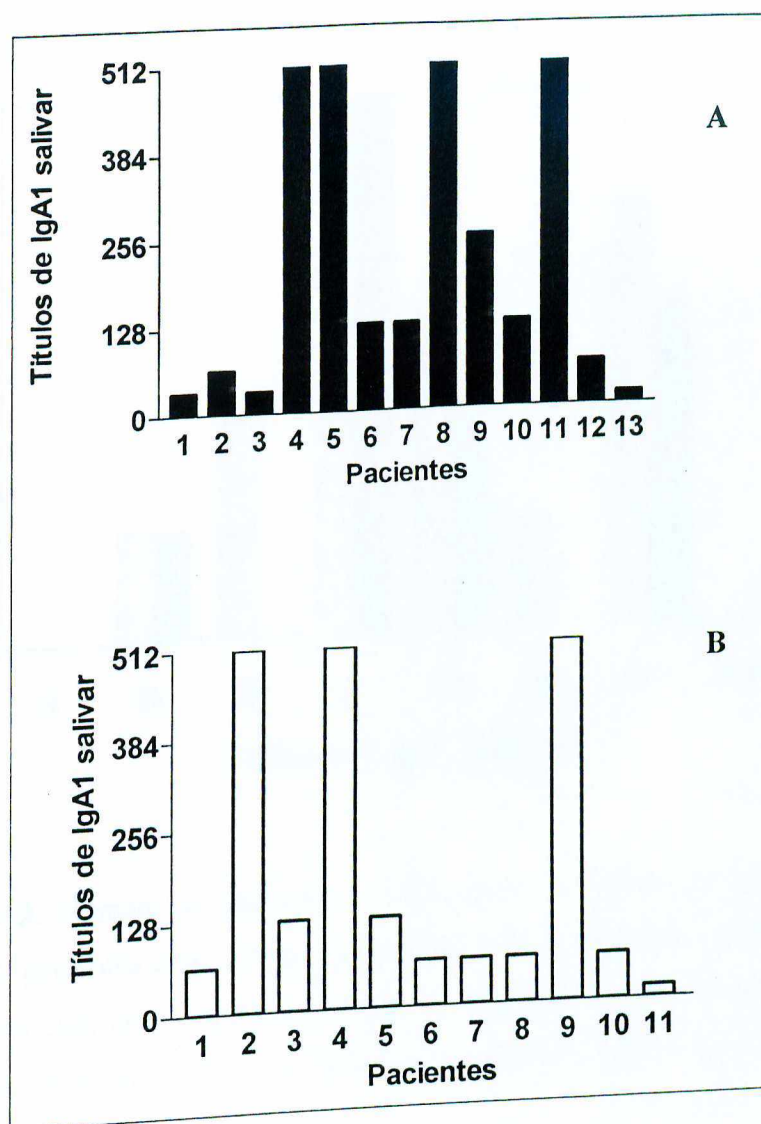


Figura 2. Títulos de IgA1 salivar em cada paciente diabético dos grupos (A) DPCM e (B) DPCS, determinados pela reatividade à jacalina pelo teste ELISA

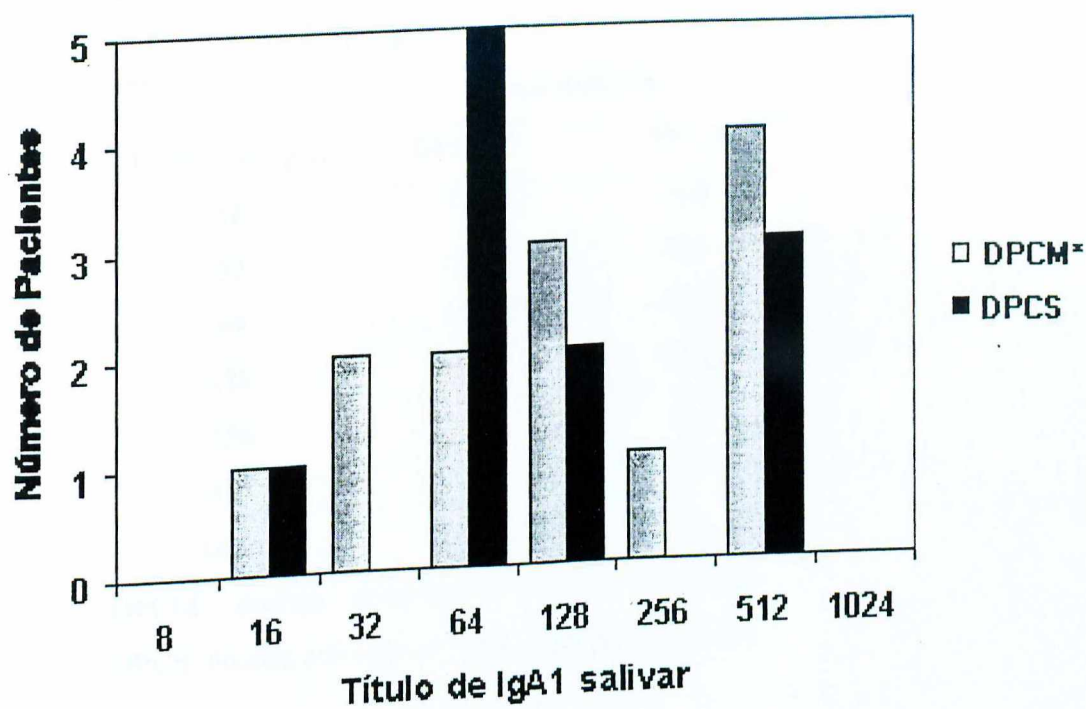


Figura 3. Número de pacientes de cada grupo por título de IgA1. DPCM, pacientes com doença periodontal crônica moderada; DPCS, pacientes com doença periodontal crônica severa. Os títulos de IgA1 foram determinados pela reatividade com jacalina por ELISA. * $P < 0,05$

Tabela 3. Porcentagem de pacientes nos respectivos títulos de IgA1

Títulos de IgA1	Pacientes (%)	
	DPCM*	DPCS
16	7,7	9,0
32	15,4	0,0
64	15,4	45,5
128	23,0	18,2
256	7,7	0,0
512	30,8	27,3
1024	0,0	0,0

DPCM: doença periodontal crônica moderada;

DPCS: doença periodontal crônica severa. * $P < 0,05$.

6.3. Análise da expressão mRNA de citocinas

Foi avaliada a expressão de mRNA por RT-PCR para as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-13. Observou-se que em apenas 2 dos 13 pacientes com diabetes mellitus e doença periodontal crônica moderada (DPCM) analisados, detectou-se a expressão de IFN- γ . No grupo de pacientes com diabetes mellitus e doença periodontal crônica severa (DPCS), em 5 dos 10 pacientes houve a expressão de IFN- γ (Fig.4 A e B, respectivamente). A expressão de TNF- α foi detectada em 8 pacientes do grupo DPCM e 6 do grupo DPCS (Fig.4 A e B, respectivamente). Houve a expressão de mRNA para a enzima GAPDH em ambos os grupos de pacientes (Fig.4), demonstrando a eficiência do RT-PCR. No entanto, não foi detectada a expressão de mRNA para as citocinas IL-4 ou IL-13 em todas as amostras de saliva de ambos os grupos analisados (dados não mostrados).

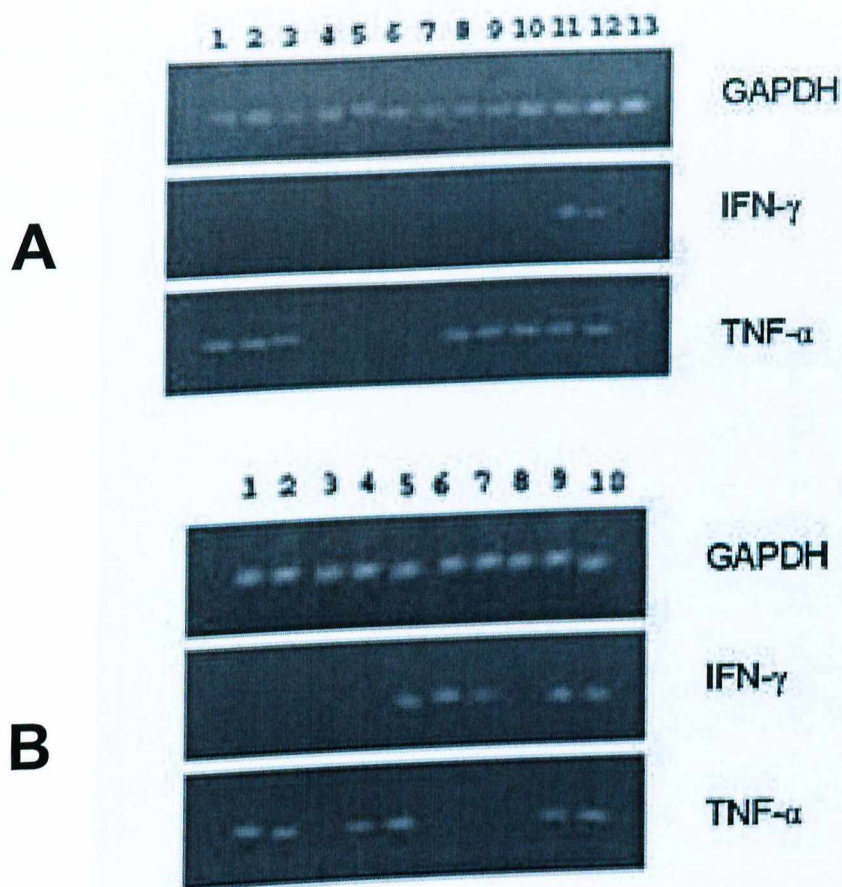


Figura 4. Expressão de mRNA para citocinas por RT-PCR. (A) amostras de saliva de pacientes diabéticos com doença periodontal crônica moderada (DPCM); (B) amostras de saliva de pacientes diabéticos com doença periodontal crônica severa (DPCS). Como controle interno da reação foi utilizada a análise da expressão de mRNA para enzima GAPDH em amostras de salivas de pacientes dos grupos DPCM e DPCS.

6.4. Correlação entre os títulos de IgA1 e expressão de citocinas

Houve detecção da expressão mRNA para TNF- α em pacientes tanto com altos quanto com baixos títulos de IgA1 em amostras de saliva de pacientes dos grupos DPCM ou DPCS (Tabela 4). A detecção da expressão mRNA para IFN- γ foi observada apenas em pacientes com títulos iguais ou superiores a 64, em amostras de saliva de ambos os grupos de pacientes analisados (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre os títulos de IgA1 e expressão de mRNA para citocinas em amostras de saliva de pacientes DPCM e DPCS.

Paciente No.	Títulos de IgA1		Expressão de mRNA para citocinas			
	DPCM	DPCS	DPCM		DPCS	
			IFN- γ	TNF- α	IFN- γ	TNF- α
1	32	64	ND	D	ND	D
2	64	512	ND	D	ND	D
3	32	128	ND	D	ND	ND
4	512	512	ND	ND	ND	D
5	512	128	ND	ND	D	D
6	128	64	ND	ND	D	ND
7	128	64	ND	ND	D	ND
8	512	64	ND	D	ND	ND
9	256	512	ND	D	D	D
10	128	64	ND	D	D	D
11	512	16	D	D	NR	NR
12	64	NR	D	D	NR	NR
13	16	NR	ND	ND	NR	NR

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro; DPCM: doença periodontal crônica moderada; DPCS: doença periodontal crônica severa; NR: não realizado, D: detectado; ND: não detectado.

7.DISSCUSSÃO

Na determinação de índices clínicos adequados ao diagnóstico da doença periodontal (DP), quanto ao estágio de atividade ou latência do processo inflamatório, devem ser considerados mecanismos imunológicos, microbiológicos e predisposição genética (OZMERIC, 2004; LIÉBANA et al., 2004). A diabetes mellitus (DM), devido às desordens no metabolismo endócrino, leva a efeitos variados nos tecidos orais, provavelmente como consequência da redução da resistência do indivíduo e alterações na resposta a injúrias. A interação entre DP e DM é sinérgica e apresenta resposta inflamatória mediada por diferentes fatores (MEALEY; RETHMAN, 2003)

O propósito do presente estudo foi avaliar os níveis de IgA1 e a expressão de mRNA para citocinas, em amostras de saliva de pacientes com diabetes mellitus apresentando doença periodontal crônica moderada (DPCM) e severa (DPCS), e desse modo contribuir para o esclarecimento da inter-relação entre essas patologias. A análise de níveis de anticorpos, proteínas, ou outros mediadores associados à resposta imunológica do paciente com DP tem sido descrita em amostras de saliva (HÄGEWALD et al., 2002), fluido crevicular gengival (BUCHMANN et al., 2002), soro (PRICE et al., 2004), biópsias de tecidos periodontais (KATZ et al., 2005; LAPPIN et al., 1999) e urina (OZMERIC et al., 2002).

MARDER et al. (1972) mostraram que em pacientes com DM há alterações na composição salivar das glândulas submandibulares e parótidas. No presente trabalho foi utilizada a saliva total sem estimulação, uma vez que, tem sido relatado que a indução pode alterar as concentrações das imunoglobulinas salivares (SHANNON et al., 1974, HÄGEWALD et al., 2002), bem como sua atividade específica contra microrganismos (HÄGEWALD et al., 2000).

A imunoglobulina A secretora (sIgA) é um dos principais componentes imunológicos contidos nas secreções salivares e possui a capacidade de inibir a adesão bacteriana à superfície mucosa, neutralização de enzimas microbianas, vírus e toxinas, e assim, controlar a microflora da cavidade oral (HÄGEWALD et al., 2002, WILLIAMS; GIBBONS, 1972). A IgA1 salivar constitui cerca de 40-50% dentre as subclasses de IgA (HANSON; BRANDTZAEG, 1980)

No presente trabalho, foram detectados títulos mais altos de IgA1 em amostras de saliva do grupo de pacientes DM com DPCM. Esses achados sugerem que esses anticorpos estejam exercendo uma parcial proteção contra os microrganismos periodontopáticos, já que, de acordo com Grossi e Genco (1998) a severidade na DP está intimamente relacionada à flora subgengival mais patogênica. Por outro lado, os níveis mais baixos de IgA1 detectados nos pacientes do grupo DM com DPCS, podem estar associados a diferentes fatores tais como, aos processos de síntese da imunoglobulina e à degradação proteolítica. (KESAVALU et al., 2002; HÄGEWALD et al., 2002; FRANDSEN et al., 1995).

Além das imunoglobulinas, outros mediadores solúveis também exercem papel importante nos processos inflamatórios. Na doença periodontal, tem sido relatado que danos ocorridos nos tecidos gengivais são mediados pela liberação de citocinas pró-inflamatórias no local, como por exemplo, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-4, IL-13 (OZMERIC, 2004; IACOPINO, 2001; SEYMOUR; GEMMELL, 2001). E, em pacientes com DM e periodontite a alta produção de TNF- α e IL-1 β leva ao agravamento da lesão no periodonto, bem como a disfunção no metabolismo glicídico (IACOPINO, 2001; NISHIMURA et al., 1998).

No presente trabalho, a detecção da expressão de mRNA para TNF- α em 62% dos pacientes DM com DPCM e de 60% com DPCS, sugere a participação dessa

citocina na manutenção da resposta inflamatória crônica. Stashenko et al. (1991) demonstraram que TNF- α e IL-1 estão aumentados em sítios de lesão ativa. Além disso, a alta vascularização do periodonto inflamado serve como fonte, semelhante à endócrina, para a produção de TNF- α e outros mediadores inflamatórios (MEALEY, RETHMAN, 2003; GROSSI, GENCO, 1998; OFFENBACHER et al., 1996), e está associado à apoptose celular e reabsorção óssea (IACOPINO, 2001).

A detecção de mRNA para IFN- γ em apenas 2/13 (15%) do pacientes DM com DPCM sugere que a resposta imune celular envolvida na periodontite crônica moderada seja predominantemente do perfil Th2. Sigusch et al. (1998) observaram que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com doença periodontal apresentavam baixa expressão de mRNA para IFN- γ , quando estimuladas por mitógeno, demonstrando a supressão da resposta Th1. Por outro lado, no grupo de pacientes DPCS houve detecção da expressão de mRNA para IFN- γ em maior número de amostras (50%) sugerindo que o perfil de resposta Th1 nesses pacientes esteja proporcionando maior destruição dos tecidos periodontais. Ebersole e Taubman (1994) também encontraram que a expressão de mRNA para IFN- γ predominantemente aumentada em células de tecido periodontal doente. Embora IL-4 e IL-13 sejam indicadores do perfil Th2 de resposta, no presente estudo não houve detecção dessas citocinas em nenhum dos grupos avaliados. A inabilidade na detecção de mRNA para IL-4 e IL-13 poderia ser atribuída à meia vida curta ou até mesmo à ausência das mesmas nas secreções salivares (SEYMOUR, GEMMELL, 2001).

8.CONCLUSÕES

- 1 – Pacientes diabéticos do grupo DPCM apresentaram níveis de IgA1 salivar total maiores que os pacientes do grupo DPCS.
- 2 – A expressão de mRNA para a citocina IFN- γ nos grupos DPCM e DPCS foi dependente dos títulos de IgA1.
- 3 – A expressão de mRNA para TNF- α não pôde ser correlacionada com o grau de severidade da doença periodontal e nem com os níveis de IgA1 na saliva total, em nenhum dos grupo analisados.
- 4 – A expressão de TNF- α foi independente dos níveis de IgA1.
- 5 – A IgA1 salivar pode estar exercendo parcial proteção ao grupo DPCM.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and Molecular Immunology. 5ed, Ed Saunders, 2003.
- ALEXANDER, D. C. C.; MARTIN, J. C.; KING, P.J.; POWELL, J. R.; CAVES, J.; COHEN, M. H. Interleukin 1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevice fluid in patients undergoing periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v.67, p.755-762, 1996.
- AMAR, S.; HAN, X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. **Med. Sci. Monit.**, v.9, n.12, p.291-299, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.20, n.11, p.1183-1197, 1997.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**, v.26, p.s5-s20, 2003. Suplemento 1.
- ANIL, S.; REMANI, P.; VIJAYAKUMAR,; PREETHI, A. J. Total hemolytic complement (CH50) and its fractions (C3 and C4) in the sera of diabetic patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, v.61, p.27-29, 1990.
- AOYAGI, T.; SUGAWARA-AOYAGI, M.; YAMAZAKI, K.; HARA, K. Interleukin 4 (IL-4) and IL-6 producing memory T-cells in peripheral blood and gingival tissues in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.10, p.304-310, 1995.
- BALKWILL, F. R.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol. Today**, v.9, p.299-304, 1989.
- BARNES, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.269-280, 2000.
- BECK, J. D.; PANKOW, J.; TYROLER, H. A.; OFFENBACHER, S. Dental infections and atherosclerosis. **Am. Heart J.**, v.138, p.S528-533, 1999.
- BROWNLEE, M. Glycation products and pathogenesis of diabetic complications. **Diabetes Care**, v.15, p.1835-1843, 1992.
- BUCHMANN, R.; HASILIK, A.; NUNN, M. E.; VAN DYKE, T. E.; LANGE, D. E. PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevice fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complexes. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.563-572, 2002.
- BUNN-MORENO, M. M; CAMPOS NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immun.**, v.127, p.427-429, 1981.

- CIANCIOLA, L. J. et al. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). **J. Am. Dent. Assoc.**, v.104, n.5, p.653-660, 1982.
- COLE, K. C.; SEYMOUR, G. J.; POWELL, R. N. The autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) using periodontal lymphocytes. **J. Dent. Res.**, v.65, p.473, 1986.
- COLE, K. C.; SEYMOUR, G. J.; POWELL, R. N. Phenotypic and functional analysis of T cells extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. **J. Periodontol.**, v.58, p.569-573, 1987.
- COLLIN, H. L.; UUSITUPA, M.; NISKANEN, L. et al. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, v.69, p.962-966, 1998.
- COSTA, M. A. F. Qualidade em biossegurança. Ed. Qualitywork, Rio de Janeiro, 2000. 176p.
- DARBY, I.; CURTIS, M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. **Periodontol. 2000**, v.26, p.33-53, 2001.
- DELACROIX, D. L.; DIVE, C.; RAMBAUD, J. C.; VAERMAN, J. P. IgA subclasses in various secretions and in the serum. **Immunology**, v.47, p.383-385, 1982.
- DROBNY, E. C.; ABRAMSON, E. C.; BAUMANN, G. Insulin receptors in acute infections: A study of factors conferring insulin resistance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.58, p.710-716, 1984.
- EBERSOLE, J. L. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. **Periodontology 2000**, v.31, p.135-166, 2003.
- EZZO, P.J.; CUTLER, C. W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. **Periodontol. 2000**, v.32, p.24-35, 2003.
- FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. **Diabetes**, v.41, p.s97-s101, 1992. suplemento 2.
- FEINGOLD, K. R.; SOUED, M.; SERIO, M. K. et al. Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo. **Endocrinology**, v.125, p.267-274, 1999.
- FRANDSEN, E. V.; REINHOLDT, J.; KJELDSE, M.; KILIAN, M. In vivo cleavage of immunoglobulin A1 by immunoglobulin A1 proteases from *Prevotella* and *Campylobacter* species. **Oral Microbiology and Immunology**, v.10, p.291-296, 1995.
- GABIRRI, M. M.; HANSON, R. L.; DABELEA, D. et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. **Diabetes Care**, v.23, p.1108-1112, 2000.

- GAMONAL, J.; ACEVEDO, A.; BASCONES, A.; JORGE, O.; SILVA, A. levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cells populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. **J. Periodontol.**, v.71, p.1535-1545, 2000.
- GEMMEL, E.; SEYMOUR, G. J. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. **J. Dent. Res.**, v.77, p.16-26, 1998.
- GEMMEL, E.; SEYMOUR, G. J. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. **Curr. Opin. Periodont.**, v.94, p.28-38, 1994.
- GEMMEL, E.; SEYMOUR, G. J. Different responses in B cell induced by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Arch. Oral Biol.**, v.37, p.565-573, 1992.
- GENCO, R. J. Host responses in periodontal disease, current concepts. **J. Periodontol.**, v.4 (suppl): p.338-355, 1992.
- GENCO, R. J.; GROSSI, S. G. Is estrogen deficiency a risk factor for periodontal disease? **Compend. Contin. Educ. Dent. Suppl.**, S23-29, 1998.
- GOLUB, L. M.; NICOLL, G. A.; IACONO, V.J.; et. al. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. **Infect. Immun.**, v.37, n.3, p.1013-1020, 1982
- GORE, E. A.; SANDERS, J. J.; PANDEY, J. P.; PALESH, Y.; GALBRAITH, G. M. P. Interleukin-1 beta allele 2: association with disease status in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.781-785, 1998.
- GOSSRAU, R. Peptidases II . Localization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). Histochemical and biochemical study. **Histochemistry**, v.60, p.231-248, 1979.
- GROSSI, S. G. Treatment of periodontal diseases and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. **Ann. Periodontol.**, v.6, p.138-145, 2001.
- GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Periodontal disease and diabetes mellitus: A two- way relationship. **Ann. Periodontol.**, v.3,n.1, p.51-61, 1998.
- GRUNFELD, C. et al. Evidence of two classes of cytokines that stimulate hepatic lipogenesis: Relationships among tumor necrosis factor, interleukin-1 and interferon-alpha. **Endocrinol.**, v.127, p.46-54, 1990.
- HÄGEWALD, S.; BERNIMOULIN, J. P.; KÖTTGEN, E.; KAGE, A. Salivary IgA subclasses and bacteria reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v.37, p.333-339, 2002.
- HÄGEWALD, S.; BERNIMOULIN, J. P.; KÖTTGEN, E.; KAGE, A. Total IgA *Porphyromonas gingivalis* reactive IgA in the saliva of patients with generalised early-onset periodontitis. **Eur. J. Oral Sci.**, v.108, p.147-153, 2000.

- HÄLLGREN, R.; LUNDQUIST, G. Elevated serum levels of pancreatic polypeptide are related to impaired glucose handling in inflammatory states. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.18, p.561-564, 1983.
- HANSON, L. A.; BRANDTZAEG, P. In: Immunologic disorders in infants and children (Saunders, Philadelphia, PA) p.137, 1980.
- HOLT, S. C.; KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENCO, C. A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol.** 2000, v.20, p.168-238, 1999.
- HORIUCHI, S. et al. Scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.4962-4966, 1986.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v.107, p.119-125, 1999.
- IACOPINO, A. M. Periodontitis and Diabetes interrelationships: Role of Inflammation. **Ann. Periodontol.**, v.6, n.1, p.125-137, dez. 2001.
- JEFFCOAT, M. K.; CHESNUT, C. H. 3RD Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.124, p.49-56, 1993.
- JOE, B. H.; BORKE, J. L.; KESKINTEPE, M.; HANES, P.J.; MAILHOT, J. M.; SINGH, B. B. Interleukin-1 beta regulation of adhesion molecules on human gingival and periodontal ligament fibroblasts. **Journal of Periodontology**, v.72, p.865-870, 2001.
- JOSHI, N.; CAPUTO, G.; WEITEKAMP, M.; KARCHMER, A. Infections in patients with diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v.341, p.1906-1912, 1999.
- KATZ, J.; BHATTACHARYYA, I.; FARKHONDEH-KISH, F.; PEREZ, F. M.; CAUDLE, R. M.; HEFT, M. W. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. **J. Clin. Periodontol.**, v.32, p.40-44, 2005.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.453-465, 2000.
- KELSO, A. Cytokines in infectious disease. **Aust. Microbiol.**, v.11, p.372-376, 1990.
- KESAVALU, L.; CHANDRASEKAR, B.; EBERSOLE, J. L. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Periodontology**, v.17, p.177-180, 2002.
- KILLIAN, M.; ELLEGARD, B.; MESTECKY, J. Distribution of immunoglobulin isotypes including IgA subclasses in adult, juvenile, and rapidly progressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.16, p.179-184, 1989.

- KILIAN, M.; THOMSEN, B.; PETERSON, T. E.; BLEEG, H. S. Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.409, p.612, 1983.
- KONDOH, H.; KOBAYASHI, K.; HAGIWARA, K.; KAJII, T. Jacalin, a jackfruit lectin, precipitates IgA1 but not IgA2 subclass on gel diffusion reaction. **J. Immun. Meth.**, v.88, p.171-173, 1986.
- LAPPIN, D. F.; MCGREGOR, A. M. P.; KINANE, D. F. The systemic immune response is more prominent than the mucosal immune response in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.30, p.778-786, 2003.
- LI, J.; SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation endproducts. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.16498-16506, 1997.
- LIÉBANA, J.; CASTILLO, A. M.; ÁLVAREZ, M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. **Méd. Oral Patol. Cir. Bucal**, v.9, Supl s75-91, 2004.
- LING, P.R. et al. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist in cytokine- and endotoxin-treated rats. **Am. J. Physiol.**, v.268 (2 Pt 1) : E255-E261, 1995.
- LINN, M. B. B. S. X.; CANDLISH, J. K.; THAI, A. C. Effects of glucose on respiratory burst of neutrophils from normal and diabetic subjects. **Clin. Lab. Haematol.**, v.15, p.203-210, 1993.
- LISTGARNEN, M. A.; RICKER, F. H. Jr.; LASTER, L.; SHAPIRO, J.; COHEN, D. H. Vascular basement lamina thickness in the normal and inflamed gingiva of diabetics and non-diabetics. **J. Periodontol.**, v.45, p.676-684, 1974.
- LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.16, p.329-334, 1993.
- LOOMES, L. M. et al. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IGA2 isotypes from serum. **J. Immunol. Meth.**, v.141, p.209-218, 1991.
- LOSCHKE, W.; KARAPETOW, F.; POHL, A. et. al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.537-541, 2000.
- LOZA, J. C.; CARPIO, L. C.; DZIAK, R. Osteoporosis and its relationship to oral bone loss. **Curr. Opin. Periodontol.**, v.3, p.27-33, 1996.
- LUNDSTROM, A.; JENDLE, J.; STENSTROM, B; et. al. Periodontal conditions in 70-years-old women with osteoporosis. **Swed. Dent. J.**, v.25, p.89-96, 2001.
- MANOUCHER-POUR, M.; SPGNUOLO, P.J.; RODMAN, H. M.; BISSADA, N.F. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. **J. Dent. Res.**, v.60, p.729-730, 1981.

- MARDER, M. Z.; WOTMAN, S.; MANDEL, I. D. Salivary electrolyte changes during pregnancy: 1. Normal pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.112, p.233-236, 1972.
- MATTSON, J. S.; CERUTIS, D. R. Diabetes Mellitus: a review of the literature and dental implications. **Compendium**, v.; 22, n.9, p.757-772, 2001.
- MEALEY, B. L.; RETHMAN, M. P. Periodontal Disease and Diabetes Mellitus-Bidirectional relationship. **Dentistry Today**, v.22, n.4, p.107-113, 2003.
- MEALEY, B. M. Diabetes and periodontal disease. **J. Periodontol.**, v.70, n.8, p.935-949, 1999.
- MICHIE, H. R. Metabolism of sepsis and multiple organ failure. **World J. Surg.**, v.20, p.460-464, 1996.
- MOLLER, D. E. Potencial role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.11, p.212-217, 2000.
- MORGAN, E. L.; HOBBS, M. V.; THOMAN, M. T.; WEIGLE, W. O. Lymphocyte activation by the Fc region of immunoglobulins. **Immunol. Invest.**, v.15, p.625-687, 1986.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v.17, p.138-146, 1996.
- NAGUIB, G.; AL-MASHAT, H.; DESTA, T.; GRAVES, D. T. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. **J. Invest. Dermatol.**, v.123, p.87-92, 2004.
- NEEPER, M. et al. Cloning and expression of RAGE: A cell surface receptor for advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.14998-15004, 1992.
- NISHIMURA, F. et al. Periodontal Disease as complication of Diabetes Mellitus. **Annals of Periodontology**, v.3, n.1, p.20-29, 1998.
- OFFENBACHER, S.; MADIANOS, P.N.; CHAMPAGNE, C. M. et. al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. **J. Periodontal. Res.**, v.34, p.346-352, 1999.
- OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: Pathogenesis. **Ann. Periodontol.**, v.1, p.821-878, 1996.
- OZMERIC, N. Advances in periodontal markers. **Clinica Chimica Acta**, v.343, p.1-16, 2004.
- PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v.26, p.230-242, 1991.

- PAYNE, J. B.; REINHARDT, R. A.; NUMMIKOSKI, P.V. Et. al. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.658-664, 2000.
- PICKUP, J.C.; CROOK, M.A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v.41, p.1241-1248, 1998.
- PICKUP J. C.; MATTOCK, M. B.; CHUSNEY, G. D.; BURT, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia**, v.40, p.1286-1292, 1997.
- PRICE, C. L.; SHARP, P.S.; NORTH, M. E.; RAINBOW, S. J.; KNIGHT, S. C. Advanced Glycation End Products modulate the maturation and function of peripheral blood dendritic cells. **Diabetes**, v.53, p.1452-1458, 2004.
- REES, T. D. The diabetic dental patient. **Dent. Clin. North Am.**, v.38, n.3, p.447-463, 1994.
- REEVES, W. G.; WILSON, R. M. Infection, immunity and diabetes, in Alberti, K. G. M. M.; Defronzo, R. A.; Keen, H.; Zimmet, p.(eds.), International Textbook of Diabetes Mellitus. John Wiley and Son, p.1165-1171, 1992.
- ROBISONN, W. G.; KADOR, P.F.; KINOSHITA, J. H. Retinal capillares: Basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. **Science**, v.221, p.1177-1179, 1983.
- ROQUE- BARREIRA, M. C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. **J. Immun.**, v.134, p.1740-1743, 1985.
- ROSENTHAL, I. M.; ABRAMS, H.; KOPCZYK, A. The relationship of inflammatory periodontal disease to diabetic status in insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J. Clin. Periodontol.**, v.15, n.7, p.425-429, 1988.
- SALVI, G. E.; LAWRENCE, H. P.; OFFENBACHER, S.; BECK, J. D. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol. 2000**, v.14, p.173-201, 1997.
- SAMMALKORPI, K. Glucose intolerance in acute infections. **J. Intern. Med.**, v.225, p.15-19, 1989.
- SCANNAPIECO, F. A. Role of oral bacteria in respiratory infection. **J. Periodontol.**, v.70, p.793-802, 1999.
- SCANNAPIECO, F. A.; HO, A. W. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. **J. Periodontol.**, v.72, p.50-56, 2001.
- SCHENCK, K.; POPPELSDORF, D.; DENIS, C.; TOLLEFSEN, T. Levels of salivary IgA antibodies reactive with bacteria from dental plaque are associated with susceptibility to experimental gingivitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.20, p.411-417, 1993.

SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; CHEN, J. X.; LI, J. F.; CRANDALL, J.; ZHANG, J. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v.96, p.1395-1403, 1995.

SETHI, S.; MUSCARELLA, K.; EVANS, N.; et. al. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. **Chest**, v.118, p.1557-1565, 2000.

SEYMOUR, G. J. et al. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. **J. Periodontal Res.**, v.28, 478-486, 1993.

SEYMOUR, G. J. Importance of host response in the periodontium. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p.421-426, 1991.

SEYMOUR, G. J. Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v.66, p.2-9, 1987.

SEYMOUR, G. J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontol. Scand.**, v.59, p.167-173, 2001.

SEYMOUR, G. J.; TAYLOR, J. J. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v.35, p.9-13, 2004.

SHANNON, I. L.; SUDDICK, R. P.; DOWED, F. J. Saliva composition and secretion. **Monogr. Oral Sci.**, v.2, p.1-13, 1974.

SHENKER, B. J. Immunologic dysfunction in the pathogenesis of periodontal disease. **J Clin. Periodontol.**, v.14, p.487-498, 1987.

SIGUSCH, B. et al.. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. **J. Periodontol.**, v.69, p.1098-1104, 1998.

SLOTS, J. Búsqueda Del tratamiento eficaz, seguro y de bajo coste. **Periodontol. 2000**, v.3, p.9-11, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. **J. Periodontol.**, v.63, p.322-331, 1992.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.134-144, 1998.

SORSA, T.; INGMAN, T.; SUOMALAINEN, K.; et. al. Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.146-149, 1992.

- SOSKOLNE, W. A.; KLINGER, A. Relationship between periodontitis and diabetes: overview. **Ann. Periodontol.**, v.6, n.1, p.91-98, 2001.
- STASHENKO, P. et al. Levels of interleukin-1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p.548-554, 1991.
- STEIN, S. H.; HART, T. E.; HOFFMAN, W. H.; HENDRIX, C. L.; GUSTKE, C. J.; WATSON, S. C. Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in type I diabetic peripheral B lymphocytes. **J. Periodont. Res.**, v.32, p.189-195, 1997.
- STELZEL, M.; CONRADS, G.; PANKUWEIT, S.; et. al. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR. **J. Periodontol.**, v.73, p.868-870, 2002.
- STERN, D. M.; YAN, S. H.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. **Aging Research Reviews**, v.1, p.1-15, 2002.
- STEWART, J. E.; WAGER, K. A.; FRIEDLANDER, A. H.; ZADEH, H. H. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, p.306-310, 2001.
- SVENSON, K. L. G. et al. Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: Relationship to the secretion of insulin and counter-regulatory hormones. **Metabolism**, v.36, p.940-943, 1987.
- TANAKA, N.; YONEKURA, H.; YAMAGISHI, S.; FUJIMORI, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation end products themselves and tumor necrosis alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17 beta estradiol through sp-1 human vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.25781-25790, 2000.
- TAUBMAN, M. A. et al. Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissue. **J. Periodontal Res.**, v.19, p.587-590, 1984.
- TAYLOR, G. W. Bidirectional Interrelationships Between Diabetes and Periodontal Diseases: An Epidemiologic Perspective. **Ann. Periodontol.**, v.6, n.1, p.99-112, dez. 2001.
- TAYLOR, G. W. et al. Glycemic control and alveolar bone loss progression in Type 2 diabetes. **Ann. Periodontol.**, v.3, n.1, p.30-39, 1998.
- TAYLOR, G. W.; BURT, B. A.; BECKER, M. P. et. al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, v.67, p.1085-1093, 1996.
- TERVONEN, T.; KARJALAINEN, K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, p.505-510, 1997.

TEW, J.; ENGEL, D.; MANGAN, D. Polyclonal B-cell activation in periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v.24, p.225-241, 1989.

USDoHaH: ORAL HEALTHY IN AMERICA. A Report of Surgeon General-Executive Summary. Rockville, MD: U. S. Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, 2000.

VAN DAMME, E. J. M.; HAUSE, B.; HU, J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PROOST, P.; PEUMANS, W. J. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity subcellular location are the major vegetable storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiology**, vol.30, p.757-769, october, 2002.

WILLIAMS, R. S.; GIBBONS, R. J. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. **Science**, v.177, p.697-699, 1972.

WILSON, M.; REDDI, K.; HENDERSON, B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. **J. Periodontal Res.**, v.31, p.393-407, 1996.

WINKLER, G.; SALAMON, F.; SALAMON, D. Et. Al. Elevates serum tumour necrosis factor-alpha levels can contribute to the insulin resistance in Type II (non-insulin-dependent) diabetes in obesity. **Diabetologia**, v.41, p.860-861, 1998.

YAMANO, R.; OHARA, M.; NISHIKUBO, S.; FUJIWARA, T.; KAWAMOTO, T.; VENO, Y. et. al. Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.1391-1398, 2003.

YOON, J. W. Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. **Ann. Med.**, v.23, n.4, p.437-445, 1991.

YUI, S. et al. Induction of macrophage growth by advanced glycation endproducts of the Maillard reaction. **J. Immunol.**, v.152, p.1943-1948, 1994.

ZADEH, H. H.; NICOLS, F. C.; MIYASAKI, K. T. The role of cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Periodontol.** 2000, v.20, p.239-288.

ZAMBON, J. J.; REYNOLDS, H.; FISHER, J. G.; SHLOSSMAN, M.; DUNFORD, R.; GENCO, R. J. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, v.59, p.23-31, 1988.

ZHOU, K. et. al. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. **Circulation**, v.107, p.2238-2243, 2003.

10. ANEXO I

Aprovação do comitê de ética em pesquisa



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 085/04

Registro CEP: 053/04

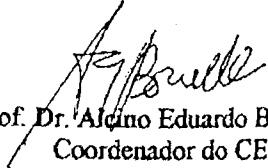
Projeto Pesquisa: *"Avaliação da resposta imune salivar de pacientes diabéticos portadores de doença periodontal"*.

Pesquisador Responsável: Maria Aparecida de Souza

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado

Uberlândia, 16 de abril de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

11.ANEXO II**Termo de Consentimento**

Eu, _____, portador do documento de identidade número _____ concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado **Avaliação da Resposta Imune Salivar de pacientes diabéticos portadores de Doença Periodontal**, que será realizado no Hospital de Clínicas da UFU, estando ciente dos seguintes aspectos:

- o objetivo da pesquisa é realizar análise da resposta imune em saliva de pacientes diabéticos com e sem Doença Periodontal, pela demonstração de níveis de IgA secretora por ELISA e perfil da expressão de citocinas contidas na saliva, por PCR.

- necessidade de coleta de amostra de saliva.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação.

Terei garantia de recusar a participar ou até retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem receber qualquer penalidade ou prejuízo no que se refere ao meu atendimento atual ou no futuro.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida minha identificação.

Uberlândia, ____ de _____ de _____.

Pesquisador responsável

Maria Aparecida de Souza
Laboratório de Imunologia – UFU
Av. Pará 1720, bloco 4C
Tel. (34) 3218 2195
E-mail: masouza@triang.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa UFU: (34) 3239 4131

FUC00023137-6