

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOESFERAS DE *POLY*
(*L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE*) CONTENDO DOXICICLINA
2% COMO ADJUNTO AO TRATAMENTO DA
PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS
TIPO 2: ESTUDO CLÍNICO E IMUNOENZIMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Odontologia.

GIOVANA LECIO MIRANDA

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOESFERAS DE *POLY*
(*L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE*) CONTENDO DOXICICLINA
2% COMO ADJUNTO AO TRATAMENTO DA
PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS
TIPO 2: ESTUDO CLÍNICO E IMUNOENZIMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin.

GIOVANA LECIO MIRANDA

São Paulo

2015

Miranda, Giovana Lecio.

Avaliação do uso de nanoesferas de POLY (L-Lactide-Co-Glycolide) contendo doxiciclina 2% como adjunto ao tratamento da periodontite crônica em indivíduos diabéticos tipo 2, estudo clínico e imunoenzimático : Nanoesferas de doxiciclina como uma terapia adjunta ao tratamento da periodontite crônica em pacientes diabéticos / Giovana Lecio Miranda. - 2015.

14 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2015.

Área de Concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin.

1. Periodontite crônica. 2. Diabetes mellitus tipo 2. 3. Tratamento periodontal. 4. Doxiciclina. 5. Nanotecnologia. I. Casarin, Renato Corrêa Viana (orientador). II. Título.

**AVALIAÇÃO DO USO DE NANOESFERAS DE *POLY*
(*L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE*) CONTENDO DOXICICLINA
2% COMO ADJUNTO AO TRATAMENTO DA
PERIODONTITE CRÔNICA EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS
TIPO 2: ESTUDO CLÍNICO E IMUNOENZIMÁTICO**

GIOVANA LECIO MIRANDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin (Orientador)

Universidade Paulista – UNIP

Profª. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro

Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti

Universidade de São Paulo – FOU SP/SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amigo e melhor orientador que eu poderia ter tido, Renato, por ter confiado em mim desde sempre, me presenteado com esta pesquisa e com a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por colocar em meu caminho todas essas pessoas que abaixo estão.

Ao meu filho Pedro, só por existir! Também por aceitar minha ausência, por compreender que ficar no colo da mamãe enquanto ela estava tabulando dados ou escrevendo a tese era uma maneira possível de estar com ela!

Ao Paulinho, meu amor da vida inteira, por estar junto, acreditar, confiar e se orgulhar de mim. Você me faz acreditar que juntos conseguimos alcançar tudo que sonhamos!

Aos meus pais, Irineu e Ana, não só por serem os melhores pais, mas por terem desenvolvido em mim a crença de que somos reflexos dos sonhos e atitudes que temos! Pelo exemplo de honestidade, caridade, união e amor! E claro, por terem cuidado do Pedro tantas vezes para eu desenvolver este trabalho!

À minha irmã, Josi (a “minha” Tô), por continuar sendo meu espelho! Pela vida de sintonia e amor! Pela cumplicidade, otimismo, alegria e fé que compartilhamos!

À Maria, por cuidar do Pedro, de mim e do Paulinho com tanto carinho e amor! À Glenda e Dri, por estarem junto sempre!

Ao Re, por sua amizade verdadeira, por seu exemplo de professor e orientador! Me orgulho ainda mais de você e por ter sido VOCÊ meu orientador! Por mais que te fale sempre, não tenho palavras pra expressar minha gratidão!

À Fe, minha professora e amiga linda, por apoiar a ideia do Re em me orientar, por ser sempre tão disponível pra ajudar, por ser tão especial!

À Re, minha parceira, por dividir comigo esse período todo, pelas orações, ouvido, cumplicidade, companheirismo e tanta afinidade! À Bruninha, pela sinceridade, pelo exemplo de organização e dedicação, pela amizade e tantos momentos de risada! Vocês trouxeram leveza ao meu mestrado e são tão especiais pra mim!

Aos professores da Periodontia, Suzana, Márcio e Fabiano, pelo conhecimento, auxílio e exemplo de equipe e união! À Mônica, pelas sugestões sempre tão oportunas, pela sensibilidade e admiração que sinto por você!

À Michele, pela ajuda e execução das análises laboratoriais.

Aos pacientes e funcionários da UNIP, pois sem vocês esta pesquisa não seria possível.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.”

Clarice Lispector

RESUMO

Indivíduos diabéticos representam uma população com alta prevalência de periodontite crônica. Além disso, esses indivíduos apresentam pior resposta ao tratamento periodontal, sendo o uso de terapias adjuvantes uma possibilidade para aumentar a previsibilidade do tratamento periodontal. Dentre essas possibilidades, o uso de antimicrobianos locais se apresenta como uma alternativa segura e que pode auxiliar no controle do biofilme subgingival, em especial quando apresentados na forma de compostos de liberação lenta. Assim, este estudo avaliou os resultados clínicos, metabólicos e imunológicos do uso de nanoesferas de Poly (l-lactide-co-glycolide) (PLGA) contendo doxiciclina 2% no tratamento de pacientes diabéticos tipo 2 (DM-2) com periodontite crônica (PC). Métodos: foi realizado um estudo paralelo, duplo-cego, placebo controlado e randomizado em 40 indivíduos com DM-2 e PC que apresentassem pelo menos 8 sítios em dentes unirradiculares com profundidade à sondagem (PS) > 5 mm e sangramento (SS). Todos os pacientes receberam debridamento ultrassônico de boca toda (DUBT), durante 45 minutos, e foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos: Grupo PLGA+Placebo [PLGA+Plac (n = 20)] – aplicação local PLGA+Plac nos sítios selecionados; 2) Grupo PLGA+Doxiciclina [PLGA+Doxi (n = 20)] – aplicação de PLGA+Doxi nas bolsas periodontais selecionadas. Avaliações clínicas, metabólicas [glicemia e hemoglobina glicosilada (HbA1c)] e imunológicas foram realizadas no *baseline*, 1, 3 e 6 meses. Resultados: ambos os grupos apresentaram redução do SS e PS em 1, 3 e 6 meses comparado com o *baseline* ($p < 0,05$). O grupo PLGA+Doxi demonstrou diferença estatística com o *baseline* em todos períodos de reavaliação para ganho de NIC, enquanto o PLGA+Plac obteve este resultado aos 3 e 6 meses ($p < 0,05$). A análise intergrupo demonstrou que PLGA+Doxi apresentou maior diminuição no SS aos 6 meses ($p < 0,05$). Com relação a bolsas profundas, PLGA+Doxi demonstrou redução significativa de SS aos 3 e 6 meses, diminuição da PS aos 3 meses e ganho de NIC em 1 e 3 meses ($p < 0,05$). Além disso, a porcentagem de sítios que apresentaram redução de PS e ganho de NIC ≥ 2 mm foi maior no PLGA+Doxi do que em PLGA+Plac aos 3 meses ($p < 0,05$). Quanto aos resultados imunológicos, numa análise intragrupo, somente os indivíduos que receberam PLGA+Doxi tiveram aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-10 (aos 3 meses) e diminuição na concentração de IL-8 (aos 6 meses) ($p < 0,05$). Somado a tais fatores, numa análise intergrupo, houve uma melhor modulação inflamatória para o grupo que recebeu as nanoesferas de doxiciclina, sendo que houve diferença significativa na concentração das seguintes citocinas: interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF) – α em todos os tempos de reavaliação, redução dos níveis de IL-6 (aos 3 e 6 meses) e diminuição IL-17 (aos 6 meses) ($p < 0,05$). A análise metabólica demonstrou menor média de porcentagem HbA1C aos 3 meses para PLGA+Doxi ($p < 0,05$). Conclusão: Nanoesferas de PLGA contendo doxiciclina a 2% podem ser consideradas uma nova terapia adjunta ao tratamento da periodontite crônica em indivíduos diabéticos tipo 2, oferecendo benefícios adicionais na modulação de citocinas e nos parâmetros clínicos avaliados.

Palavras-chave: Periodontite crônica. Diabete mellitus tipo 2. Tratamento periodontal. Doxiciclina. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Background: This study evaluated clinical and immunological results of Poly (l-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanospheres containing 2% doxycycline (PLGA+Doxy) in the treatment of type 2 diabetic subjects (DM-2) with chronic periodontitis (CP). **Methods:** A parallel, double blind, randomized, placebo controlled clinical trial was conducted in DM-2 subjects with CP, presenting at least eight pockets [probing depth (PD) \geq 5mm with bleeding on probing (BoP)]. All patients received one stage full mouth ultrasonic debridement (FMUD) and they were randomly divided into 2 groups: 1) *PLGA+Plac Group* (n = 20)] local application of placebo PLGA nanospheres in at least 6 non-contiguous sites; 2) *PLGA+Doxy Group* (n = 20) - local application of PLGA+Doxy nanospheres in chosen sites.). At baseline, one, three and six months, clinical, metabolic [Fast Plasma Glucose level (FPG) and glycated hemoglobin (HbA1c)] and cytokine pattern (multiplexed bead immunoassay) evaluations were performed. **Results:** Both groups presented statistical difference in all clinical parameters after treatment ($p < 0.05$). However, an inter group analyses showed that PLGA+Doxy presented lower Bleeding on Probing (BoP) index at 6 months when compared to PLGA+Plac ($p < 0.05$). Regarding deep pockets, there was an additional decrease in BoP (3 and 6 months), Probing Depth reduction (at 3 months) and CAL gain (at 1 and 3 months) favoring PLGA+Doxy ($p < 0.05$). Besides that, the percentage of sites presenting PD reduction and CAL gain \geq 2 mm was higher in PLGA+Doxy than in PLGA+Plac at 3months ($p < 0.05$). In addition, only patients in the PLGA+Doxy exhibited significant augmented levels of anti-inflammatory interleukin (IL)-10 at 3 months and lower concentration of IL(8) at 6 months ($p < 0.05$). Inter-group analyses showed lower concentration of IFN- γ and transforming necrosis factor (TNF) $-\alpha$ at all periods of reevaluation, reduction of IL (6) and IL-17 levels at 3 and 6 months in the PLGA+Doxy when compared to PLGA+Placebo during follow-ups ($p < 0.05$). Metabolic analysis demonstrated lower mean percentage of HbA1C at 3 months for PLGA+Doxy ($p < 0.05$). **Conclusion:** PLGA+Doxy Nanospheres may be considered a potential adjunctive therapy to periodontal treatment in DM-2 individuals, offering additional benefits in the modulation of cytokines, metabolic and clinical parameters.

Key Words: Diabetes mellitus type 2. Chronic Periodontitis. Periodontal treatment. Doxycycline. Nanospheres.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
CONCLUSÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	13

INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, caracterizado pela utilização ou produção deficiente de insulina, resultando em hiperglicemia e subseqüentes complicações sistêmicas e bucais¹. Vários estudos demonstraram que o DM é um fator de risco para as doenças periodontais, influenciando negativamente o estabelecimento e a progressão das mesmas. A hiperglicemia e a formação do produto final resultante da glicolisação avançada parecem causar maior concentração de interleucinas, tais como IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-1 β , que estão associadas à reabsorção óssea, resultando em maiores danos ao periodonto²⁻⁴. Com uma relação bidirecional, a periodontite contribui, também, para a dificuldade dos diabéticos em controlar a glicemia⁵⁻¹¹, o que resulta em maior inflamação tecidual¹².

A terapia periodontal tem como objetivo tornar a superfície radicular compatível com a saúde através da remoção do biofilme, que permite a restauração do periodonto¹³. Ao mesmo tempo, indivíduos diabéticos possuem pior resposta ao tratamento periodontal. Faria-Almeida e colaboradores, em 2006¹⁴, relataram diferenças significativas ($p < 0,0207$) para PS entre os grupos controle e diabéticos no *baseline* e em 3 meses. No entanto, em outro estudo não se encontrou nenhuma diferença entre este distúrbio e os sistemicamente saudáveis¹⁵.

Além disso, o uso de agentes antimicrobianos, tanto sistêmicos quanto locais, tem sido sugerido como adjunto ao tratamento mecânico¹⁶. Sistemas de liberação controlada de fármacos têm atraído grande interesse dos pesquisadores, uma vez que oferecem inúmeras vantagens sobre o sistema convencional de dosagem da droga. Entre elas, podemos citar o aumento da substantividade da droga no local de ação desejado¹⁷.

A doxiciclina, um derivado de tetraciclina, é um antibiótico de amplo espectro contra anaeróbios gram-positivos e gram-negativos, incluindo os organismos implicados na etiologia da doença periodontal, que inibe a síntese de proteínas dos micro-organismos. Demonstra também algumas características importantes para o processo da doença periodontal, tais como a inibição de metaloproteinases (MMPs)^{18,19,20}, a inibição da degranulação de células polimorfonucleares (PMN)¹⁸ e o aumento da produção de TGF β 1²⁰, reduzindo a destruição do colágeno e a reabsorção óssea alveolar²².

Recentemente, foi desenvolvido um dispositivo de liberação que é capaz de liberar substâncias de forma lenta e controlada devido à inserção desses agentes antimicrobianos na

formulação durante o seu preparo. Esses dispositivos são chamados de nanoesferas. Estas são produzidas a partir de uma base de água-em-óleo-em-água (WOW) de polímero de poli PLGA (l-lactide-co-glycolide). Elas provaram ser capazes de atuar na liberação de substâncias de maneira controlada. Recentemente, Moura e colaboradores (2012)²³ avaliaram a utilização de nanoesferas de PLGA como um sistema para a liberação controlada de doxiciclina no tratamento não cirúrgico da peri-implantite. De acordo com os resultados, pode-se notar que as nanoesferas de PLGA demonstraram ser capazes de auxiliar na redução dos parâmetros clínicos inflamatórios, bem como na redução da profundidade à sondagem aos 15 meses.

No entanto, ainda não foram avaliadas as respostas clínicas e imunológicas (obtidas por meio da análise dos marcadores inflamatórios) de indivíduos suscetíveis à doença periodontal, como os diabéticos, com o uso das nanoesferas de PLGA para auxiliar no tratamento periodontal dos mesmos.

Assim, tendo em vista os pontos acima discutidos, este estudo tem por objetivo avaliar, pela primeira vez, a resposta clínica e imunológica da utilização de nanoesferas de PLGA contendo doxiciclina 2% no tratamento da periodontite crônica em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

CONCLUSÃO GERAL

A aplicação local das nanoesferas de PLGA contendo doxiciclina 2% apresentou benefícios adicionais ao tratamento da periodontite crônica por meio do debridamento periodontal de boca toda, em pacientes diabéticos tipo 2. Elas demonstraram atuar na modulação de citocinas, na melhora do estado metabólico e da condição clínica periodontal destes pacientes. O uso das nanoesferas de PLGA com doxiciclina 2% pode representar uma nova abordagem terapêutica auxiliar ao tratamento periodontal em pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

1. Brownlee M. Glycosylation and diabetic complication. *Diabetes*.1994; 43: 836-841.
2. Ribeiro FV, de Mendon A AC, Santos VR, Bastos MF, Figueiredo LC, Duarte PM. Cytokines and Bone-Related Factors in Systemically-Healthy and Type 2 Diabetic Subjects With Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2011;2:[Epub ahead of print].
3. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Napimoga MH, Bastos MF, Duarte PM. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2010; 37:1049-1058.
4. Shin DS, Park JW, Suh JY, Lee JM. The expressions of inflammatory factors and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in human chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Implant Sci* 2010; 40:33-38.
5. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62:123-131.
6. Løe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16:329-334.
7. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65: 260-267.
8. Firatli E, Yilmaz O, Onan U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 362-66.
9. Skrepcinski FB, Niendorff WJ. Periodontal disease in American Indians and Alaska Natives. *J Public Health Dent* 2000; 60: 261-266.
10. Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis* 2005; 11:293-298.
11. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996; 67:1085–1093.
12. Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2010; 33:421-427. 7

13. Waerhaug J. Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* 1978 Mar;49(3):119-34.
14. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006 Apr;77(4):591-8.
15. da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, et al. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol* 2008;79:1150-1157.
16. Soskolne WA¹, Chajek T, Flashner M, Landau I, Stabholtz A, Kolatch B, Lerner EI. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *J Clin Periodontol* 1998 Dec;25(12):1017-21.
17. Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol* 2005;76:1227-36.
18. Fiotti et al., 2007 Fiotti N, Altamura N, Moretti M, Wassermann S, Zacchigna S, Farra R, Dapas B, Consoloni L, Giacca M, Grassi G et al. Short term effects of doxycycline on matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23(2):153-9.
19. Gapski R, Hasturk H, Van Dyke TE, Oringer RJ, Wang S, Braun TM, Giannobile WV. Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36(2):149-56.
20. Agan S, Sonmez S, Serdar M. The effect of topical doxycycline usage on gingival crevicular fluid MMP-8 levels of chronic and aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Int. J. Dent. Hygiene* 2006;4:114-121.
21. Gurkan A, Emingil G, Cinarcik S, Berdeli A. Post-treatment effects of subantimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta1 in severe, generalized chronic periodontitis. *Int J Dent Hyg* 2008;6(2):84-92.
22. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, Sorsa T, Reinhardt RA, Wolff MS, Ryan ME, Nummikoski PV, Payne JB. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol* 2008;79(8):1409-18.
23. Moura LA, Oliveira Giorgetti Bossolan AP, de Rezende Duek EA, Sallum EA, Nociti FH Jr, Casati MZ, Sallum AW. Treatment of peri-implantitis using nonsurgical debridement with bioresorbable nanospheres for controlled release of doxycycline: a case report. *Compend Contin Educ Dent* 2012 Nov-Dec; 33(10): E145-9.