

Cuantificación de la quimiocina CCL5 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y/o periodontitis crónica: Estudio preliminar

Quantification of Chemokine CCL5 in Patients with Diabetes Mellitus Type 2 and/or Chronic Periodontitis: Preliminary Study

Luis Sansores-España DDS¹; Arely Carrillo-Avila DDS, MINE²; Eduardo Sauri-Esquivel DDS, MO²; Eugenia Guzmán-Marín MD, MSc, PhD³; Marcela Hernández DDS, MSc, PhD⁴; Amaury Pozos-Guillén DDS, MSc, PhD⁵; Víctor Martínez-Aguilar DDS, MIS^{2, 6}

1. Estudiante. Licenciatura en Cirujano Dentista, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
2. Profesor-Investigador. Especialización en Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
3. Profesor-Investigador. Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, México.
4. Profesor-Investigador. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Chile.
5. Profesor-Investigador. Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
6. Estudiante. Doctorado Institucional en Ingeniería y Ciencia de Materiales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

Autor para correspondencia: Dr. Víctor Martínez Aguilar - vmart81@gmail.com

Recibido: 13-II-2017

Aceptado: 20-II-2017

Publicado Online First: 24-II-2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.28052>

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue cuantificar la presencia de la quimiocina CCL5 (RANTES) en Líquido Crevicular Gingival (LCG) de pacientes con Periodontitis Crónica (PC) y/o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Se realizó un estudio comparativo, transversal en 40 pacientes. Se tomó LCG de bolsas periodontales y surcos gingivales de 4 grupos de pacientes (10 por grupo de estudio), se excluyó a los pacientes que recibieron tratamiento periodontal, antibiótico y antiinflamatorio 6 meses anteriores al estudio o cursaron con alguna enfermedad sistémica distinta a DM2. Las concentraciones de CCL5 se determinaron mediante ensayos LUMINEX de selección magnética. Se realizó estadística descriptiva, prueba ANOVA de una vía, T de student y correlación de Pearson. La cuantificación de CCL5 fue mayor en los pacientes que presentaron ambas enfermedades, seguidos del grupo con solo PC, los sanos y el grupo con solo DM2. No se encontró diferencia significativa entre los grupos y no hubo correlación entre las cuantificaciones y los indicadores glicémicos. A pesar de que las diferencias no fueron significativas, el grupo de pacientes con ambas enfermedades presentó la mayor cuantificación de CCL5. La expresión de CCL5 en LCG debe considerarse un potencial inductor de destrucción periodontal, su determinación podría ser útil para monitoreo de la salud/enfermedad de los tejidos periodontales.

PALABRAS CLAVE

CCL5; Ensayos LUMINEX®; Periodontitis; Perio papers.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to quantify the presence of chemokine CCL5 (RANTES) in gingival crevicular fluid (LCG) in patients with chronic periodontitis (PC) and / or type 2 diabetes mellitus (DM2). A comparative cross-sectional study was conducted in 40 patients. LCG was taken from periodontal pockets and gingival grooves from 4 patient groups (10 per study group); patients who received periodontal, antibiotic and anti-inflammatory treatment 6 months prior to the study or who had systemic disease other than DM2 were excluded. Concentrations of CCL5 were determined by LUMINEX® assays. Descriptive statistics, one-way ANOVA, Student's T, and Pearson's correlation were performed. The quantification of CCL5 was higher in the patients who presented both diseases, followed by the group with only PC, healthy and the group with only DM2. No significant difference was found between groups and there was no correlation between quantifications and glycemic indicators. Although the differences were not significant, the group of patients with both diseases had the highest CCL5 quantification. The expression of CCL5 in LGC should be considered as a potential inducer of periodontal destruction, its determination could be useful for monitoring the health/disease of periodontal tissues.

KEYWORDS

CCL5; LUMINEX® assays; Periodontitis; Perio papers.

INTRODUCCIÓN

La Periodontitis Crónica (PC) es una enfermedad inflamatoria progresiva que afecta los tejidos de soporte dentarios, causando reabsorción del hueso alveolar y una constante pérdida de colágeno y matriz extracelular (1, 2). Esta enfermedad es desencadenada por microorganismos específicos desarrollados en un biofilm subgingival desde donde se libera una gran cantidad de factores de virulencia que evaden la respuesta de defensa del huésped causando daño a las células y tejidos mediante la desregulación de las interacciones inflamatorias (3-5).

En presencia de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) se altera la adherencia de los neutrófilos, su quimiotaxia y fagocitosis y se induce a la generación de un fenotipo hipersensible de monocitos/macrófagos, favoreciendo la persistencia

bacteriana en la bolsa periodontal y el notable aumento en la producción de quimiocinas y otros mediadores proinflamatorios (6-8). El efecto de estas alteraciones inmunitarias en el huésped es un aumento de la inflamación periodontal, pérdida de inserción y disminución de la masa ósea (9-11).

CCL5 (RANTES) es una quimiocina de la subfamilia CC específica para tipos celulares que expresan receptores transmembrana de tipo CCR1, CCR3 y CCR5 presentes en linfocitos Th1, monocitos/macrófagos, células dendríticas, basófilos y eosinófilos, induciendo su activación, polarización, proliferación y quimiotaxis (12, 13). Mientras los linfocitos Th1 son considerados la mayor fuente de RANK-L, molécula potencialmente inductora para la activación de los osteoclastos en las patologías periodontales, las células dendríticas y macrófagos son potenciales precursores de osteoclastos, reforzando el rol de ésta en la pérdida ósea (14, 15).

CCL5 se ha encontrado específicamente en tejidos periodontales de sujetos periodontalmente comprometidos, comparados con controles, y su concentración disminuye en el líquido crevicular después de aplicada la terapéutica periodontal. *In vitro* se han obtenido diferentes respuestas dependiendo de su concentración, debajo de 100 nM RANTES ha presentado únicamente actividad quimiotáctica, mientras que concentraciones arriba de 100 nM inducen a la activación de células T, sugiriendo que ambos tipos de respuesta, dependientes de la concentración, pueden tener un importante rol en el establecimiento y progresión de la periodontitis (15).

El objetivo del presente estudio fue cuantificar la presencia de la quimiocina CCL5 (RANTES) en Líquido Crevicular Gingival (LCG) de pacientes con Periodontitis Crónica (PC) y/o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).

METODOLOGÍA

Los sujetos para el presente estudio fueron seleccionados del Servicio de Atención del Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán. Para la determinación de DM2 se siguieron los criterios establecidos por la American Diabetes Association en 2010 [16], utilizando pruebas de hemoglobina glucosilada (HbA1c) y glucosa en sangre, considerando valores de $\geq 6.5\%$ de HbA1c como diabetes y $\leq 5.6\%$ como parámetros normales, y valores de glucosa en ayunas (8 a 10 horas) ≥ 126 mg/dL como diabetes y ≤ 100 mg/dL como normales. Para la determinación de PC de moderada a severa se utilizaron los criterios establecidos por la American Academy of Periodontology 1999 [17], considerando al menos 5 a 6 dientes con bolsas periodontales ≥ 4 mm de profundidad, pérdida de inserción ≥ 3 mm, sangrado al sondeo y evidencia radiográfica de pérdida ósea. Para este fin se utilizó sonda periodontal North Carolina (Hu-Friedy) sondeando 6 sitios por diente de acuerdo

al 5° Taller Europeo de Periodontología (17), todos los dientes fueron sondeados con excepción de los terceros molares. Se excluyó a aquellos sujetos que recibieron tratamiento periodontal, antibiótico y/o antiinflamatorio 6 meses anteriores a la examinación o cursaron con alguna enfermedad sistémica distinta a DM2. Se evaluaron 4 grupos de estudio: Grupo 1 (pacientes con DM2 y PC), Grupo 2 (con solo PC), Grupo 3 (con solo DM2) y Grupo 4 (aparentemente sanos). Los sitios a muestrear fueron en los Grupos 1 y 2 una bolsa periodontal ≥ 4 mm con pérdida de inserción clínica ≥ 3 y en los Grupos 3 y 4 el surco gingival mesiovestibular del primer molar inferior. El LCG fue recolectado de acuerdo al siguiente protocolo: previo aislamiento del diente con un rodete de algodón se removió la placa supragingival utilizando curetas (Hu-friedy, Gracey), el sitio fue secado con aire para introducir tiras de Periopapers (OralFlow) en el surco o bolsa hasta resistencia dejando en el sitio por 30 segundos, las tiras contaminadas con saliva o sangre fueron excluidas de la muestra. Las tiras se colocaron inmediatamente en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Posteriormente, el LCG fue extraído a través elusiones de PBS-T al 0.05% por centrifugación a 12,000 revoluciones por 5 minutos a 4°C para alcanzar una elusión final de 80 μL , de los cuales 30 μL fueron sometidos a prueba Luminex de selección Magnética de la casa comercial R&D (No. De catalogo RD-LXSAHM-02) para determinar los niveles de RANTES en cantidad total (pg) y concentración de acuerdo a la fórmula RANTES (pg)/ volumen (μL).

Al determinar la normalidad de las variables a contrastar mediante prueba Shapiro-Wilk, se realizó ANOVA de una vía (Post Hoc DMS) para edad, HbA1c, glucosa en sangre, profundidad al sondeo y la cuantificación de CCL5 entre los 4 grupos de estudio y prueba T de student para pérdida de inserción entre los grupos con PC y la cuantificación de CCL5 entre cada uno de los grupos enfermos con los sanos. Adicionalmente, se

realizó correlación de Pearson entre el porcentaje de HbA1c y los niveles de CCL5, se consideró el nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se estudiaron 40 muestras de LCG de 40 sujetos, 62.5% (n=25) mujeres y 37.5% (n=15) hombres. Las características generales de la población de estudio se describen en la Tabla 1. El rango de edad de la muestra fue de 25 a 65 años, la media para mujeres fue de 46.28 ± 12.63 años y para hombres de 46.38 ± 15.42 años no encontrándose diferencia significativa en la edad entre sexos ($p = 0.975$), pero sí al comparar las edades entre los 4 grupos ($p < 0.001$).

El 50% de los participantes fueron clasificados con DM2, 4 (20%) de los cuales presentaron buen control según los marcadores glicémicos, 7 (35%) un control medio y 9 (45%) fueron no controlados. 70 % (n=14) fueron mujeres y 30% (n=6) hombres, encontrándose en ellas un peor control glicémico según las cifras de HbA1C. Se observó diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los niveles glicémicos reportados entre los cuatro grupos (Tabla 2).

Los individuos con PC, pertenecientes a los grupos 1 y 2, presentaron en conjunto una mayor frecuencia de PC generalizada moderada con un 80% (n=16,) y en menor escala de PC generalizada severa con un 20% (n=4,). Se observó una mayor experiencia de enfermedad periodontal de moderada a severa en el sexo femenino en la población de estudio. Los sitios periodontales, surco o bolsa, elegidos para recolección de LCG en cada grupo de estudio se describen en la Tabla 2.

Se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) al comparar la profundidad al sondeo periodontal

del surco/bolsa entre los 4 grupos. Por otra lado, al comparar la pérdida de inserción presentada en los grupos periodontalmente comprometidos (1 y 2), esta no fue estadísticamente significativa ($p = 0.413$).

La cuantificación de la expresión de CCL5 (RANTES) fue analizada en 20 muestras de LCG por grupo, 20 sitios periodontalmente enfermos y 20 sitios periodontalmente sanos fueron estudiados. Los valores encontrados en cada grupo se describen en la Tabla 3. Las cuantificaciones mayores fueron observadas en el grupo de sujetos con ambas enfermedades, seguidos de los que solo presentaron PC, los que solo presentaron DM2 y por los sanos que presentaron los menores niveles; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al contrastar los valores obtenidos en los 4 grupos ($p = 0.382$). De igual manera, al analizar las variaciones en la cuantificación entre los grupos con una o ambas enfermedades frente al grupo de pacientes sanos, las diferencias no fueron significativas para DM2/PC ($p = 0.182$), PC ($p = 0.882$) y DM2 ($p = 0.748$). No se encontraron diferencias significativas al comparar los valores de cuantificación entre los grupos con diabetes ($p = 0.121$), los grupos con periodontitis ($p = 0.361$) y por sexo ($p = 0.334$) teniendo en este caso medias de cuantificación total de RANTES de 47.68 ± 10.177 pg para mujeres y 45.84 ± 6.284 pg para hombres.

Adicionalmente, se realizó una correlación de Pearson entre los indicadores del estado glicémico utilizados y las cuantificaciones de CCL5, encontrándose que no existe correlación entre los valores de hemoglobina glucosilada y los niveles de RANTES, tanto de concentración (pg/ μ L) como en cantidad total (pg) en los 4 grupos de estudio: DM2/PC ($r = 0.019$, $p = 0.937$), PC ($r = -0.124$, $p = 0.602$), DM2 ($r = -0.068$, $p = 0.775$), sanos ($r = -0.001$, $p = 0.995$).

Table 1. Características generales de la población y su distribución por sexo en cada uno de los grupos.

	Grupo 1: DM2/PC	Grupo 2: PC	Grupo 3: DM2	Grupo 4: Sanos	Valor de P
Sexo	7M/3H	7 M/3H	7M/3H	4M/6H	
Edad (años)	50.7±10.6 (34-64)	45±10.349 (28-65)	54.5±11.6 (35-65)	28.4±5.45 (25-43)	<0.001*
HbA1C (%)	9.03±2.01 (5.9-12.0)	5.7±0.38 (5.1-6.2)	7.29±1.19 (6.1-10.4)	5.53±0.37 (4.9-6.1)	<0.001*
Glucosa en sangre (mg/dL)	232±88.7 (112-360)	93.2±7.40 (83-110)	126.70±30.64 (94-187)	87.5±8.73 (75-104)	<0.001*

* Se encontraron diferencias significativa ($p < 0.001$) mediante ANOVA de un factor.

Table 2. Profundidad en mm del surco/bolsa periodontales elegidos en cada uno de los grupos para recolección de LCG.

	Grupo 1: DM2/PC	Grupo 2: PC	Grupo 3: DM2	Grupo 4: Sanos	Valor de P
Media de profundidad de surco/bolsa (en mm)	5.20±1.39	8.20±2.82	2.90±0.31	2.70±0.48	<0.001*
Media de pérdida inserción (en mm)	6.90±2.55	7.80±1.87	0.00	0.00	0.381**

*ANOVA de un factor ** T de Student para grupos 1 y 2.

Table 3. Promedio de los valores obtenidos en la cuantificación de CCL5 en los grupos.

	Grupo 1: DM2/PC	Grupo 2: PC	Grupo 3: DM2	Grupo 4: Sanos	Valor de P
Concentración en pg/μL	1.372±0.347 (1.10-2.16)	1.240±0.360 (1.10-2.16)	1.150±0.060 (1.10-1.28)	1.104±0.065 (1.0-1.1.18)	0.382+
Valores totales en pg	54.880±13.913 (44.0-86.4)*	49.600±14.414 (44.0-90.4)**	46.0±2.422 (40.0-51.2)***	44.160±2.634 (40.0-47.2)	

+ANOVA de un factor. *T de Student para comparar valores entre pacientes grupo 1 y 4, $p=0.182$. **T de Student para comparar valores entre pacientes grupo 2 y 4, $p=0.882$. ***T de Student para comparar valores entre pacientes grupo 3 y 4, $p=0.748$.

DISCUSIÓN

Los datos del presente estudio sugieren que esta quimiocina se encuentra presente en LCG tanto de los sujetos comprometidos con una o ambas enfermedades como de los sanos con pobres variaciones.

Gamonal et al (14, 18) determinaron mayores niveles de CCL5 en sitios que presentaron actividad periodontal (47.02 pg/ 49.64 pg/ μ L) después de 2 meses de seguimiento comparados con sitios que no evidenciaron actividad en el mismo paciente (37.55 pg/47.53 pg/ μ L), datos que coinciden con el presente estudio para sitios periodontalmente comprometidos frente a sitios sanos. Sin embargo, los resultados discrepan con otros estudios (19-21) en cuanto a los niveles reportados para los sitios control, en los que se observó una cuantificación hasta 50% mayor en los niveles de CCL5.

Thunell et al (22) determinaron una reducción en los niveles de CCL5 después de instaurada la terapéutica periodontal, medias de 115 pg en sitios periodontalmente comprometidos y de 58 pg en sanos al inicio del estudio, y de 27 y 30 pg respectivamente al final del tratamiento. Las cuantificaciones obtenidas en el presente estudio para sitios enfermos fueron menores en pacientes diabéticos y no diabéticos, variación inherente a las diferencias en el diseño de los estudios; el curso de la enfermedad fue más grave en su grupo de pacientes muestra, determinaron sitios sanos y enfermos en el mismo paciente comprometido con PC, y los sitios a muestrear se determinaron después de un periodo de 2 meses de seguimiento. El incremento en los niveles de CCL5 en pacientes con periodontitis, en acuerdo con los resultados del presente reporte, también ha sido descrito por otros autores (13, 19, 20, 23).

No se encontraron estudios similares en los que se cuantifique la expresión de CCL5 en LCG de pacientes diabéticos. Sin embargo, niveles séricos mayores han sido reportados (28.29 ng/mL) en presencia de DM2 en comparación con pacientes normoglicémicos (19.23 ng/mL) (24). Se ha reportado que en LCG de sujetos con DM2 y PC existen niveles significativamente mayores de IL-1 β al compararlos con sujetos sanos en similar condición periodontal (25-27), misma situación es atribuida a los niveles de IL-6 y TNF- α cuando se han comparado pacientes portadores de ambas enfermedades con controles sanos (28, 29). Por otro lado, las diferencias entre los grupos con DM2 fueron muy pobres a diferencia de Kardesler et al (27), Viera Ribeiro et al (29), Navarro-Sanchez et al (28), que han encontrado niveles significativamente mayores de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MMP-8 y MMP-13 en pacientes con DM2 y PC.

Duarte et al (29) reportaron en sitios enfermos con periodontitis en presencia de DM2 no controlada niveles significativamente mayores de eotaxina, MIP-1 α , IL-6, TNF- α e IL-12 al compararlos con pacientes sanos, situación atribuible a CCL5 en el presente estudio. Sin embargo, en su grupo de estudio estos presentaron un mayor nivel en sitios sanos de pacientes diabéticos que en pacientes control, situación que discrepa con nuestros resultados para RANTES.

Se espera que los resultados del presente estudio sirvan como base para futuras investigaciones en el campo de biología celular aplicada al LCG. El uso de la tecnología LUMINEX® puede conducir a una mejor comprensión en el perfil que los principales mediadores inflamatorios pudieran presentar en pacientes con distinto tipo de compromiso tanto periodontal como sistémico. La expresión de CCL5 en LGC debe considerarse

un potencial inductor de destrucción periodontal, su determinación podría ser útil para monitoreo de la salud/enfermedad de los tejidos periodontales.

CONCLUSIONES

Se observó en los sujetos con ambas enfermedades la mayor cuantificación de CCL5, mayores niveles de glicemia en sangre y de igual manera una mayor frecuencia de periodontitis crónica severa y mayores niveles de pérdida de inserción en los sitios de muestreo. Las diferencias entre los 4 grupos de estudio no fueron significativas, misma situación al comparar los grupos con DM2 y los grupos con PC. Las mujeres presentaron una mayor cuantificación de CCL5 que los hombres una mayor experiencia de PC de moderada a severa, mayor experiencia de DM2 y un peor control en los niveles glicémicos. No se encontró correlación entre las cuantificaciones para CCL5 y los marcadores glicémicos.

REFERENCIAS

1. Carranza F., Newman M., Takei H. Periodontología clínica. 10ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
2. Lindhe J. Periodontología clínica e implantología oral. 4ª ed. Buenos aires: Panamericana; 2005.
3. Guerrero-Velázquez C. Perfiles de citocinas en periodontitis. *Odontología Actual*. 2009; 6 (61): 12-20.
4. Peña-Sisto M., Calzado-DaSilva M., Gonzalez-Peña M., Cordero-García S., Azahares-Arguello H. Patógenos Periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. *MEDISAN*. 2012; 16 (7): 1137-48.
5. Liébana J., Castillo A., Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 9 (suppl): 75-91.
6. Dana T., Liu R., Oates T. Inflamación y apoptosis potenciadas por la diabetes: impacto sobre la salud periodontal. *Periodontol* 2000. 2008; 20 (2): 80-6.
7. Shlossman M., Knowler W. C., Pettitt D. J., Genco R. J. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc*. 2008; 121 (4): 532-6.
8. Jansson H., Lindholm E. Type 2 diabetes and risk for periodontal disease: a role for dental health awareness. *J Int Acad Periodontol*. 2009; 8 (4): 20-4.
9. Taylor G. W., Burt B. A., Becker M. P., Genco R. J., Shlossman M., Knowler W. C., Pettitt D. J. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 2007; 69 (1): 76-83.
10. Pickup J. C., Crook M. A. Is type 2 diabetes mellitus a disease of the innate immune system. *Diabetologia*. 2007; 41(10): 1241-8.
11. Nishimura F., Soga Y., Iwamoto Y., Kudo C., Murayama Y. Periodontal disease as part of the insulin resistance syndrome in diabetic patients. *J Int Acad Periodontol*. 2009; 7 (1): 16-20.
12. Ferreira S., Repeke C., Ávila M. CCR5 mediates pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. *J Dent Res*. 2011; 90 (5): 632-7.
13. Emingil G., Atilla G., Huseyinov A. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008; 31 (10): 829-34.
14. Gamonal J., Acevedo A., Bascones A., Jorge O., Silva A. Levels of interleukin 1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2007; 71 (10): 1535-45.
15. Levy J. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. *J Immunol*. 2009; 182 (7): 345-6.

16. Standard of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33 (suppl 1) s11-61.
17. Kinane D. Causas y patogenia de la enfermedad periodontal. *Periodontol 2000 (Ed Esp)* 2009; 1 (25): 8-20.
18. Gamonal J., Bascones A., Jorge O., Silva A.. Chemokine RANTES in gingival crevicular fluid of Adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27 (9): 675-81.
19. Savario L., Donati M., Carr C. Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associate with chronic adult periodontitis. *J Periodontol Res*. 2006; 42 (2): 152-8.
20. Gamonal J., Acevedo A., Bascones A., Jorge O., Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 2001; 36 (3): 194-203.
21. Emingil G., Atilla G., Huseyinov A. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008; 31 (10): 829-34.
22. Thunell D., Tymkiw K., Johnson G., Joly S. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontol Res*. 2010; 45 (1): 148-52.
23. Kabashima H., Yoneda M., Nagata K. The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1 alpha, MIP-1beta, IP10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine*. 2002; 20 (2): 70-7.
24. Herder C., Thomas I., Jens B., Muller M., Klop N. RANTES/CCL5 polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158 (5): 253-60.
25. Bulut U., Develioglu H., Taner I. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J Oral Sci*. 2001; 43 (3): 171-7.
26. Cutler C., Machen R., Jotwani R. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hiperlipidemia. *J Periodontol*. 1999;70 (11): 1313-21.
27. Kardesler L., Buduneli N., Biyikoglu B. Gingival crevicular fluid PGE2, IL-1 beta, t-PA, PAI-2 levels in type 2 diabetes and relationship with periodontal disease. *Clin Biochem*. 2008; 41 (10-11): 863-8.
28. Navarro-Sanchez A., Faria-Almeida R., Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34 (10): 835-43.
29. Vieira-Ribeiro F., de Mendoca A., Santos V., Bastos M. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011; 82 (8): 1187-96.
30. Atieh M., Faggion C., Seymour G. Cytokines in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 104 (2): 38-45.
31. Duarte P., Bezerra J., Miranda T., Chambrone L. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014; 41 (1): 11-8.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.