Juliana Kowalesky Cardoso

**Mensuração sérica de Interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10
e Fator de Necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica**

São Paulo

2012

Juliana Kowalesky Cardoso

**Mensuração sérica de Interleucina-1 β , Interleucina-6,
Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral α em cães
com doença periodontal crônica**

Tese apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Marco Antonio Gioso

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2682
FMVZ

Cardoso, Juliana Kowalesky

Mensuração sérica de Interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica / Juliana Kowalesky Cardoso. -- 2012.
118 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientadora: Prof. Dr. Marco Antonio Gioso.

1. Cão. 2. Inflamação. 3. Interleucina. 4. Doença periodontal. 5. Citocina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Marcadores sistêmicos da inflamação na doença periodontal crônica em cães", protocolado sob o nº 2304/2011, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marco Antonio Gioso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Systemic markers of inflammation in chronic periodontitis in dogs", protocol number 2304/2011, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Marco Antonio Gioso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 3 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KOWALESKY-CARDOSO, Juliana

Título: Mensuração sérica de Interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica

Tese apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Dedico

À minha família,

***Ao meu marido Leonardo Cardoso pelo companheirismo, pela compreensão
da minha ausência, e pelo amor.***

Aos meus pais, Herbert Kowalesky e Yara Lúcia Amaral Kowalesky pelo amor e apoio incondicional de toda a vida.

À minha irmã Karina Kowalesky pela amizade, sinceridade. Pelo carinho e pela coragem! Ao meu cunhado Luis Antonio Gabarra e minha sobrinha Amanda Kowalesky Gabarra pelas alegrias.

Ao meu irmão Adriano Kowalesky e minha cunhada Cristina Kitazono Kowalesky pelo apoio e carinho. Aos meus sobrinhos Herbert Kitazono Kowalesky e Pedro Kitazono Kowalesky pelas alegrias.

***Aos meus sogros Elder Alves Cardoso e Teresa Cristina de Oliveira e à minha
cunhada Letícia de Oliveira Alves Cardoso pelo incentivo, apoio e carinho.***

Aos animais,

aos “nossos” que se foram: Potyra, Tomie, Teddy, Uly, Bilu e aos que estão conosco Fly, Lua e Sol.

Aos cães do estudo e todos os demais.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Marco Antonio Gioso pela confiança em mais um trabalho realizado. São 12 anos de convivência e aprendizado. Obrigada pela orientação em toda minha carreira profissional.

À Professora Denise Tabacchi Fantoni pela inestimável colaboração na realização desse estudo. Pelo tempo dispensado e pelo interesse. Pelo exemplo de docência a ser seguido.

À amiga, Cristina Espanã de Albuquerque pela ajuda na revisão e formatação desse trabalho. Dizem que sabemos quem são os verdadeiros amigos nas horas difíceis, e nessas horas você sempre esteve presente. Obrigada!

À Mônica Rissi pela ajuda na parte prática desse estudo e pela disponibilidade e pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação e agregados do LOC: Daniel Ferro, Lenin Vilamizar, Samira Abdala, Sérgio Camargo, Roberto Fecchio, Mariana Fugita, Priscila Pedra e Rodrigo Prazeres pela convivência e apoio.

Ao enfermeiro José Miron pela disponibilidade e amizade.

À equipe do Laboratório de Hematologia Selene Aparecida de Oliveira e Ludmila Rodrigues Moroz pelas dicas no processamento das amostras.

À Dra. Márcia Kahvegian pelas instruções no início do trabalho.

Aos veterinários do serviço de anestesiologia Geni e Flor e aos pós-graduandos do mesmo setor pelo auxílio.

Aos secretários Ney Pereira e Lívia Gimenes pela ajuda e paciência.

À bibliotecária Elza Faquim pela atenção e boa vontade na revisão do texto.

Aos amigos da “Casa das Teses” por toda ajuda e paciência durante a confecção desse trabalho.

Aos amigos “de fora”: colegas do Hospital Veterinário Rebouças, em especial, Ana Carolina Lagoa. Às anestesistas: Aline Vasconcelos, Samantha Padilha, Maria Fernanda Garutti e demais colegas clínicos pela compreensão do pouco tempo disponível.

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido para realização desse estudo.

Insanidade

é continuar fazendo
sempre a mesma coisa
e esperar resultados
diferentes."

Albert Einstein

Resumo

KOWALESKY-CARDOSO, J. Mensuração sérica de Interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10 e Fator de Necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica. [Measurement of serum Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor- α in dogs with chronic periodontal disease]. 2012.118. f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A doença periodontal é resultado da inflamação das estruturas periodontais em resposta ao biofilme dentário presente na superfície dental e sulco gengival. Sua etiopatogenia é multifatorial e complexa. Na periodontite crônica há bacteremia freqüente durante rotinas diárias como escovação dentária e mastigação e acredita-se que esse estímulo constante ao sistema imunológico possa causar repercussões sistêmicas nos pacientes, como arterioescleroses. Uma das formas atuais de se mensurar essa alteração é pela presença de mediadores inflamatórios séricos. Sendo as proteínas de fase aguda, como as citocinas, as mais avaliadas. Assim como os trabalhos encontrados para a espécie humana, propôs-se a mensuração sérica das interleucinas IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α em cães com doença periodontal crônica. Como grupo controle, utilizaram-se os mesmos pacientes após tratamento periodontal, mensurando as mesmas interleucinas depois de 21 dias do tratamento. Como resultado todas as interleucinas sofreram alteração, porém somente a IL-6 teve redução estatisticamente significativa após o tratamento periodontal. Todavia atenta-se para os elevados valores encontrados em alguns pacientes, o que pode demonstrar importante alteração sistêmica.

Palavras-chave: Cão, Inflamação, Interleucina, Doença periodontal, Citocina

Abstract

KOWALESKY-CARDOSO, J. Measurement of serum Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor- α in dogs with chronic periodontal disease. [Mensuração de Interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina 10 e Fator de Necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica]. 2012. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Periodontal disease is the result of inflammation of the periodontal structures in response to the biofilm present on the tooth surface and the gingival sulcus. Its pathogenesis is multifactorial and complex. Bacteremia in chronic periodontitis is constant during daily routines, such as toothbrushing and chewing, and it is believed that this constant stimulus to the immune system can cause systemic effects in patients, such as arterioescleroses. One of the current ways of measuring this change is the presence of serum inflammatory mediators. The acute phase proteins, such as cytokines, are the most valued. Like the works found for the human species, the measurement of serum interleukins IL-1, IL-6, IL-10 and TNF- α in dogs with chronic periodontal disease was proposed. As controls, we used the same patients after periodontal treatment, measuring the same interleukins after 21 days of treatment. As a result, all interleukins have been changed, but only IL-6 showed statistically significant decrease after periodontal treatment. However, the high values found in some patients, which may prove important systemic change, must be highlighted.

Keywords: Dog, Inflammation, Interleukin, Periodontal disease, Cytokine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas periodontais	28
Figura 2 - Pontos de referência anatômicos da gengiva	30
Figura 3 - Estruturas epiteliais do periodonto	31
Figura 4 - Natureza multifatorial da doença periodontal	40
Figura 5 - Doença periodontal leve, moderada e grave	66
Figura 6 - Sondagem gengival e região de furca dentária	66
Figura 7 - Doença periodontal grave e radiografia intraoral	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal nos 36 cães. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 71
- Tabela 2 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 24 cães com doença periodontal grave. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 73
- Tabela 3 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 09 cães com doença periodontal moderada. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 75
- Tabela 4 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 03 cães com doença periodontal leve. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 77
- Tabela 5 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 28 cães da primeira fase. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 83
- Tabela 6 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em oito cães da segunda fase. FMVZ-USP. São Paulo, 2012 85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF em pg/ml, nos 36 cães. FMVZ-USP. São Paulo, 2012	72
Gráfico 2- Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF em pg/ml, dos cães com doença periodontal grave - FMVZ- USP. São Paulo, 2012	74
Gráfico 3 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF dos cães com doença periodontal moderada - FMVZ- USP. São Paulo, 2012	76
Gráfico 4 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF, dos cães com doença periodontal leve - FMVZ-USP. São Paulo, 2012.	78
Gráfico 5 - Correlação da IL-10 com a IL-6 no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012	79
Gráfico 6 - Correlação da IL-10 com a IL-1 no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012	80
Gráfico 7 - Correlação da IL-10 com o TNF- α no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012	81
Gráfico 8 - Comparação nas correlações de IL-10 versus IL-6; IL-10 versus IL-1 e IL-10 versus TNF α . FMVZ – USP. São Paulo, 2012	82
Gráfico 9 -. Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF dos cães da primeira fase. FMVZ – USP. São Paulo, 2012	84
Gráfico 10 - Boxplot dos níveis de IL-6 (1), IL-10 (2), IL-1 (3) e TNF (4) dos cães da segunda fase. FMVZ – USP. São Paulo, 2012	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: alanina transaminase

BID: duas vezes ao dia

°C: graus Celsius

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: doença periodontal

EV: endovenoso

FSG: fluido sulcular gengival

Hovet: hospital veterinário

IgA,: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL: interleucina

IL1: interleucina um

IL-1 β : interleucina um beta

IL-6: interleucina seis

IL-8: interleucina oito

IL-10: interleucina dez

IM: intramuscular

FA: fosfatase alcalina

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Kg: quilograma

LPS: lipopolissacarídeos

LOC: Laboratório de Odontologia Comparada

mg: miligrama

mm: milímetros

NIC: nível clínico de inserção

PCR: proteína C reativa

PGE2: prostaglandina E2

Rpm: rotação por minuto

PMNs: polimorfonucleares

SC: subcutâneo

SID: uma vez ao dia

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TID: três vezes ao dia

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

USP: Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 Introdução	24
2 Revisão de Literatura	28
2.1 ESTRUTURAS DO PERIODONTO.....	28
2.1.1 PERIODONTO DE PROTEÇÃO: GENGIVA	29
2.1.2 PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO: LIGAMENTO PERIODONTAL, CEMENTO RADICULAR E OSSO ALVEOLAR	33
2.2 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL.....	34
2.2.1 BIOFILME DENTÁRIO	35
2.2.2 BIOFILMES SUPRA E SUBGENGIVAL E A PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL	37
2.2.3 GENGIVITE E PERIODONTITE	38
2.2.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA - MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE	41
2.3 RESPOSTA TECIDUAL INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NA GENGIVITE E PERIODONTITE	44
2.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	48
2.4.1 INTERLEUCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	50
2.4.2 INTERLEUCINA ANTI-INFLAMATÓRIA	53
2.5 EFEITOS SISTÊMICOS DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	53
2.6 DOENÇAS SISTÊMICAS ASSOCIADAS À DOENÇA PERIODONTAL	56
3 Objetivos.....	60
3.1 GERAL.....	61
3.2 ESPECÍFICO	61
4 Material e Métodos	62

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA..... 63

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 64

4.2.1 TRATAMENTO PERIODONTAL..... 65

FIGURA 6 - SONDAGEM GENGIVAL E REGIÃO DE FURCA DENTÁRIA 66

4.2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL..... 67

4.3 PÓS-OPERATÓRIO 67

4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS..... 68

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 68

5 Resultados..... 70

5.1 AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS DE TODOS OS CÃES SEM SEPARAÇÃO POR GRUPOS. 70

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL GRAVE, MODERADA E LEVE. 72

5.2.1 GRUPO COM DOENÇA PERIODONTAL GRAVE..... 73

5.2.2 AVALIAÇÃO DO GRUPO DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL MODERADA 74

5.2.3 AVALIAÇÃO DO GRUPO DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL LEVE 76

5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE A IL-10 E AS DEMAIS INTERLEUCINAS..... 78

5.3.1 COMPARAÇÃO DA IL-10 COM A IL-6..... 79

5.3.2 CORRELAÇÃO DA IL-10 COM A IL-1 80

5.3.3 CORRELAÇÃO DA IL-10 COM O TNF-A 81

5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASE 82

5.4.1 VALORES DAS AMOSTRAS DA PRIMEIRA FASE 83

5.4.2 VALORES DAS AMOSTRAS DA SEGUNDA FASE 84

6 Discussão 87

7 Conclusão..... 96

Referências 98

apêndice 112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal tem importância clara pela sua grande prevalência. Em humanos, sabe-se que a doença periodontal atinge 7 a 15% da população mundial e sua forma mais severa atinge 1 a 5 % (ALBANDAR, 2002). Em cães não há esta estimativa, mas sabe-se que 85% dos cães e gatos acima de quatro anos de idade precisam de tratamento dentário (SAN ROMAN, 1999; GORREL, 2004; GIOSO, 2007).

A doença periodontal é uma doença infecto-inflamatória crônica que acomete os tecidos de proteção (gengiva) e sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) dos dentes, ou seja, o periodonto (WIGGS; LOBPRISE, 1997; GIOSO, 2007).

É uma doença complexa e multifatorial sendo induzida principalmente pela inflamação causada pela placa bacteriana ou biofilme que se acumula na superfície dentária e sulco gengival. É compreendida por dois estágios inflamatórios diferentes: a forma inicial, que é chamada gengivite e a forma mais avançada chamada periodontite (MORINHA et al., 2011).

Na gengivite a inflamação ocorre pela inadequada higienização dos tecidos orais levando ao acúmulo do biofilme que é composto, dentre outros, de glicoproteínas da saliva, debris celulares e diversas colônias bacterianas. Nessa fase, há prevalência de bactérias gram positivas, aeróbias e sem motilidade (KINANE, 2005; GIOSO, 2007).

A cronicidade do processo provoca reações imunes e inflamatórias do hospedeiro na tentativa de conter o processo. Assim, uma resposta que deveria ser benéfica acaba acelerando o processo de destruição dos tecidos subjacentes ao elemento dentário, pois leva à produção de diversas enzimas como collagenases, condroitinase e proteases. Nesse desenrolar, há perda de inserção do epitélio juncional e ligamento periodontal devido à destruição do tecido conjuntivo, formando a bolsa periodontal. Nessa fase pode também haver reabsorção do osso alveolar, causando a mobilidade do elemento dentário. A perda dos constituintes do periodonto é irreversível por si só, sendo então chamada de doença periodontal ou periodontite. Nessa fase há prevalência de bactérias gram negativas, anaeróbias e com motilidade (LINDHE; KARRING; LANG, 2005; NEWMAN ET AL., 2007; GIOSO, 2007).

A ocorrência da doença periodontal depende basicamente do desequilíbrio entre a qualidade e a quantidade da microbiota oral e a resposta do hospedeiro. As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram negativas da bolsa periodontal são capazes de iniciar uma resposta local e sistêmica (KINANE; LOWE, 2000). Bactérias ou parte delas têm acesso à circulação sanguínea e linfática durante atividades de rotina como escovação dentária e mastigação, sobretudo quando há a perda da integridade do tecido conjuntivo sulcular como ocorre na periodontite (RAWLINSON et al., 2011; GIOSO, 2007). Uma vez na circulação, esses componentes podem induzir e promover inflamação sistêmica e respostas pró-aterogênicas. A endotoxemia subclínica aumenta em três vezes o risco de incidência de arteriosclerose e doenças cardiovasculares (WIEDERMANN et al., 1999; KIECHI et al., 2001).

Estudos em cães têm proposto ligação entre a doença periodontal e doenças renais, hepáticas e cardiovasculares (DE BOWES et al., 1996; PAVLICA et al., 2008; GLICKMAN et al., 2009; GLICKMAN et al., 2011; RAWLINSON et al., 2011). Na espécie humana, numerosas pesquisas têm sugerido que a periodontite crônica é um fator de risco para arteriosclerose e subsequente doença vascular (DESTEFANO et al., 1996; MATTILA et al., 1995; BECK et al., 1996; YAMAZAKI et al., 2005; SUN et al., 2009).

Uma das formas que atualmente vem sendo empregada para a avaliação de lesões sistêmicas é a mensuração dos biomarcadores da inflamação (LAKS, 2010; SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

Infecções e injúrias teciduais induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecidos como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas pode ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. Em geral uma resposta inflamatória aguda é de curta duração e além de uma reação local ocorre também uma reação sistêmica chamada de resposta de fase aguda. Vários mediadores como quimiocinas, plasminas, mediadores lipídicos, citocinas, participam ativamente da resposta inflamatória. Em alguns casos o processo inflamatório agudo não é completamente resolvido, levando à inflamação crônica, como é o caso de doenças autoimunes ou infecções causadas por microrganismos que conseguem evadir a resposta imune. (BILATE, 2007).

Pesquisas atuais têm revelado a importância de se estudar melhor o quadro inflamatório sistêmico, uma vez que esses mediadores inflamatórios aumentados sericamente estão diretamente relacionados com a propensão à doenças cardiovasculares, dificuldade no controle glicêmico de pacientes diabéticos, nascimento de bebês prematuros e com baixo peso corporal, piora no quadro de pacientes com doenças neurológicas degenerativas e mau prognóstico de pacientes em UTI (MEALEY et al., 2003; DELIARGYRIS et al., 2004; FELICE et al., 2005).

Beck et al. (2005), Taylor et al. (1996) e Sun et al. (2009) sugeriram que a proteína C reativa e a interleucina 6 como possíveis mediadores envolvidos na associação entre doença periodontal e doenças sistêmicas.

Na espécie humana, vários autores propõem que a doença periodontal crônica por si só pode desencadear o aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos, como a proteína C reativa e algumas interleucinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6 (SUN et al., 2009; NOACK et al., 2001; LOSS, 2005; YAMAZAKI et al., 2005).

Em cães, pesquisas consistentes que correlacionem doença periodontal e alterações sistêmicas são escassas. Correlação sistêmica de mediadores inflamatórios e doença periodontal em cães não foram encontradas. Apenas Rawlison et al (2011) mensurou como mediador inflamatório a proteína C reativa em cães com periodontite, observando seu aumento nesses pacientes.

Propôs-se neste estudo a mensuração sérica das interleucinas 1, 6, 10 e TNF- α em cães com doença periodontal crônica. E como controle, foram feitas novas mensurações nestes mesmos cães, após 21 dias do tratamento periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A periodontia é o estudo do periodonto saudável e doente, assim como o seu tratamento para a manutenção ou o restabelecimento de sua saúde. A palavra *periodontium* tem origem no latim e no grego e significa “ao redor do dente” (WIGGS; LOBPRISE, 1997).

2.1 ESTRUTURAS DO PERIODONTO

O periodonto é definido e constituído pelo conjunto de estruturas que protegem e sustentam o dente: gengiva, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (Figura 1) (WIGGS; LOBPRISE, 1997; GIOSO, 2007).

Figura 1- Estruturas periodontais

Todos os componentes estruturais do periodonto formam um sistema funcional que proporciona uma articulação do dente ao osso da maxila e da mandíbula, permitindo aos dentes resistirem às forças da mastigação, promovendo sustentação e sensibilidade (TEN CATE, 2001). Quando observado clinicamente, a única estrutura do periodonto visível a olho nu é a porção gengival (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005).

2.1.1 Periodonto de Proteção: gengiva

A **gengiva** apresenta relação específica com a superfície do dente, constituindo a maior defesa periférica contra a infecção microbiana que possa levar à doença periodontal (CACHAPUZ, 2007). É composta de tecido conjuntivo denso e fibroso (fibras colágenas 60%, fibroblastos 5%, vasos, nervos e matriz 35%). Está intimamente unida ao perióstio dos processos alveolares, coberta por uma membrana mucosa lisa, destituída de glândulas e pouco sensível, fixada ao dente por meio do epitélio juncional (EVANS, 1993; CACHAPUZ, 2007).

Anatomicamente, a gengiva está dividida em: inserida, livre ou marginal e interdental ou papilar (Figura 2). A **gengiva inserida** é firme, resiliente e intimamente ligada ao perióstio subjacente do osso alveolar, contínua com a gengiva marginal. A **gengiva marginal** (“não-inserida” ou “livre”) é o bordo terminal da gengiva em torno dos dentes, em forma de colar, e está separada da gengiva inserida adjacente por uma depressão linear rasa, o sulco marginal (TEN CATE, 2001). A **gengiva interdental** ocupa o contorno gengival no espaço entre os dentes. (NEWMAN et al., 2007).

Figura 2 - Pontos de referência anatômicos da gengiva

2.1.1.1 Epitélio

Historicamente, pensava-se que o epitélio gengival (Figura 3) provia somente uma barreira física para as infecções e o ligamento periodontal subjacente. No entanto, agora se acredita que as células epiteliais possuem um papel ativo na defesa inata do hospedeiro através de resposta às bactérias de maneira interativa (por meio de citocinas epiteliais, células de Langerhans e de células dendríticas de origem da medula óssea, que estão localizadas dentro do epitélio). Isso significa que o epitélio participa ativamente na resposta à inflamação, sinalizando outras reações do hospedeiro e na integração das respostas imunes inata e adquirida. Por exemplo, as células epiteliais podem responder às bactérias através do aumento na proliferação, alteração dos eventos de sinalização celular, mudanças na diferenciação e morte celular, e, finalmente, alteração da homeostase tecidual (DALE, 2000). A principal função do epitélio gengival é proteger as estruturas profundas, ao mesmo tempo permitindo um intercâmbio seletivo com o ambiente oral (NEWMAN et al., 2007).

Figura 3 - Estruturas epiteliais do periodonto

O **epitélio oral** é um epitélio pavimentoso, estratificado, queratinizado que reveste a cavidade oral, estendendo-se da margem gengival à junção mucogengival, cobrindo dessa forma toda parte clinicamente visível da gengiva livre e inserida. É uma proteção efetiva contra o mecanismo de trauma e infecção bacteriana (CACHAPUZ, 2007).

O **epitélio sulcular** reveste o sulco gengival. É um tecido fino, escamoso, estratificado e não queratinizado. Extremamente importante, pois atua como uma membrana semipermeável, através da qual, produtos bacterianos lesivos são filtrados pelo fluido tecidual; carreando consigo proteínas de fundamental importância na resposta imunológica local, tais como imunoglobulinas do tipo A (IgA) (THILANDER, 1964; WEILDLICH, 2001).

O **epitélio junctional** é responsável pela inserção da gengiva ao dente, desempenhando, desta maneira, um papel muito importante. Coronariamente apresenta-se em continuidade com o epitélio do sulco e apicalmente com as fibras gengivais (CACHAPUZ, 2007). Pesquisas mostraram que apesar dos numerosos polimorfonucleares (PMNs) em migração serem sempre evidentes e presentes no epitélio junctional saudável, um aumento considerável no número de PMNs deve ser esperado com o acúmulo de placa dentária e inflamação gengival (NEWMAN et al.,

2007). O epitélio juncional hígido, em geral, fixa-se ao esmalte, e não à dentina ou cimento (GIOSO, 2007).

O **sulco gengival** é o sulco ou espaço raso em torno do dente, limitado pela superfície dentária e pela camada do epitélio que reveste a margem livre da gengiva. É uma depressão em forma de “V”, permitindo a entrada da sonda periodontal com certa resistência. A profundidade fisiológica média do sulco gira em torno de 2 mm, podendo variar de 1 até 3 mm em animais saudáveis, de acordo com o tamanho de cada indivíduo. Em casos de cães de raças grandes e gigantes, a profundidade do sulco gengival pode chegar a 4 mm, sendo considerado normal devido ao tamanho dos elementos dentais e sem que seja observado nenhum grau de doença periodontal (WIGGS; LOBPRISE, 1997; GIOSO, 2007).

Leucócitos foram encontrados no sulco gengival de animais clinicamente e histologicamente saudáveis. Esses leucócitos são predominantemente PMNs. Aparecem em pequenos números, extravasculares, no tecido conjuntivo adjacente ao fundo do sulco, nesse ponto eles atravessam o epitélio em direção ao sulco gengival, onde são expelidos. Contagens diferenciais mostram de 91,2% a 91,5% de PMNs e 8,5% a 8,8% de células mononucleares. As células mononucleares foram identificadas como sendo 58% de linfócito B, 24% de linfócito T e 18% de fagócitos mononucleares (NEWMAN et al., 2007).

2.1.1.2 Fluido Sulcular Gengival

A presença de fluido sulcular ou fluido sulcular gengival (FSG) é conhecida desde o século XIX, porém sua composição e o papel nos mecanismos de defesa oral foram elucidados pelos trabalhos de Waerhaug, Brill e Krasse em 1950. Estes investigadores introduziram papel filtro no sulco gengival de cães que receberam injeção intramuscular prévia de fluoresceína; dentro de três minutos o material fluorescente foi recuperado nas tiras de papel. Isso indicou a passagem do fluido da corrente sanguínea através dos tecidos e a saída via sulco gengival (NEWMAN et al., 2007).

O FSG é um exsudato inflamatório. Sua presença no sulco clinicamente normal pode ser explicada devido ao fato de que a gengiva que parece clinicamente normal invariavelmente exibe inflamação quando examinada microscopicamente. A quantidade de FSG é maior quando há inflamação e, algumas vezes, é proporcional à gravidade da inflamação. Os componentes do FSG podem ser caracterizados de acordo com as proteínas individuais, anticorpos específicos, antígenos e enzimas de várias especificidades. O FSG também contém elementos celulares (bactérias, células epiteliais descamadas e leucócitos), eletrólitos (potássio, sódio e cálcio), compostos orgânicos (carboidratos e proteínas) e produtos metabólicos e bacterianos (ácido láctico, uréia, endotoxinas, substâncias citotóxicas, sulfato de hidrogênio e fatores antimicrobianos) (NEWMAN ET AL., 2007).

2.1.2 Periodonto de sustentação: ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar

O **ligamento periodontal** é composto por um tecido conjuntivo ricamente vascularizado e altamente celular que circunda a raiz e a liga à parede interna do osso alveolar (NEWMAN et al., 2007). O componente celular principal é o fibroblasto (35%), no entanto também é composto por células dos restos epiteliais de Malassez, células imunológicas (macrófagos, mastócitos, leucócitos e plasmócitos), células mesenquimais indiferenciadas, cementoblastos, osteoblastos e osteoclastos (CACHAPUZ, 2007). É um tecido conjuntivo particularmente bem-adaptado para a sua função principal, que é a de suportar o dente no seu alvéolo, e ao mesmo tempo permitir que ele resista às forças da mastigação. O ligamento periodontal, além de articular o dente ao osso, atua como receptor sensorial indispensável para o posicionamento adequado dos ossos gnáticos durante a função normal (propriocepção) (TEN CATE, 2001).

O **cimento** é um tecido mesenquimal, calcificado e avascular, que recobre a raiz dos dentes (TEN CATE, 2001; NEWMAN et al., 2007).

O **osso alveolar** é composto pelos bordos da mandíbula que suportam os dentes. As raízes dos dentes alojam-se em profundas depressões, os alvéolos dentários. É uma estrutura dente-dependente, desenvolvendo-se com a erupção dentária e sendo reabsorvido com sua extração. As múltiplas foraminas encontradas no interior desse osso correspondem aos canais de Volkman, onde se conectam os ligamentos periodontais. Vasos sanguíneos, linfáticos e nervos passam por essas aberturas (VERSTRAETE, 1999; GORREL, 2004).

2.2 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma infecção/inflamação crônica com etiologia diretamente relacionada ao acúmulo de placa bacteriana (palavra que encontra sinonímia em termos como biofilme e induto mole) na área gengivodentária (CLICKMAN, 1979; HENNET; HARVEY, 1992; WIGGS; LOBPRISE, 1997; GORREL, 2004; GIOSO, 2007).

Reações inflamatórias e imunes à placa bacteriana são características predominantes na gengivite e na periodontite, sendo a reação inflamatória visível clínica e microscopicamente (LINDHE; LANG; KARRING, 2005).

O processo destrutivo é desencadeado pelo acúmulo de placa bacteriana e seus componentes próximo à gengiva e no interior do sulco gengival (HARVEY; EMILY, 1993). Para que esta placa cause danos aos tecidos moles é necessário que o acúmulo de seus constituintes seja contínuo e com tendência à organização. Após o período de organização da placa, que varia de 24 a 48 horas, inicia-se inflamação dos tecidos envolvidos (HARVEY; EMILY, 1993; GIOSO, 2007).

2.2.1 Biofilme dentário

Geralmente a microbiota bucal está em harmonia e equilíbrio com o hospedeiro, sendo que a formação do biofilme bucal é natural e contribui, à semelhança do que ocorre com a microbiota residente em outras áreas do organismo, para a integridade fisiológica e imunológica do hospedeiro (WEILDLICH, 2001).

A placa dental atualmente é definida como uma comunidade microbiana imersa numa matriz extracelular de polímeros derivados dos microrganismos e do hospedeiro, que está aderida aos dentes e estruturas não renováveis na cavidade bucal na forma de um biofilme (MARSCH, 2003).

Os microrganismos da cavidade bucal não se depositam sobre os dentes de uma forma aleatória, ao contrário, apresentam-se de forma organizada estrutural e funcionalmente, e possuem uma série de interações entre si e com o meio bucal (CONSTERTON et al., 1994).

Crescer e viver dentro de um biofilme é um dos métodos preferidos por um grande número de bactérias e traz benefícios a todos os integrantes da comunidade microbiana, visto que tal comunidade apresenta-se coordenada, organizada estruturalmente e integrada metabolicamente. O biofilme garante estabilidade no fornecimento de nutrientes, oferece um ambiente favorável à proliferação e com riscos limitados às espécies residentes. Sua estrutura facilita o processamento, distribuição e absorção de nutrientes. Espécies podem interagir tanto a partir do compartilhamento na produção de nutrientes, onde uma espécie produz nutrientes para a outra, quanto na remoção de produtos metabólicos inibidores ou tóxicos, o que geralmente é possibilitado pelo aproveitamento destes produtos tóxicos por outras bactérias (BRYERS, 1993).

A heterogeneidade fisiológica presente nos biofilmes é explicada pela produção de microambientes específicos decorrentes do metabolismo microbiano (SOCRANSKY; HAFFAJEE; 2002).

Os biofilmes proporcionam proteção às espécies colonizadoras, visto que fatores ambientais como componentes do sistema de defesa do hospedeiro e outras substâncias

potencialmente tóxicas às bactérias, como antimicrobianos, têm seu acesso dificultado ou impedido no seu interior (COSTERTON et al., 1999). A resistência a antimicrobianos está relacionada com a matriz de exopolissacarídeos, que têm mecanismos próprios para este fim. Íons ou agentes químicos altamente reativos podem ser neutralizados visto que a matriz intermicrobiana funciona como uma resina onde ocorrem trocas iônicas capazes de reagir e neutralizar tais agentes (MARSH, 2003). Além disso, enzimas extracelulares como beta-lactamases e formaldeído dehidrogenase podem ser represadas e mantidas em altas concentrações na matriz, o que inativa a ação de alguns antimicrobianos (WEILDLICH, 2001).

O estabelecimento de uma comunidade clímax no biofilme traz autonomia e independência a toda estrutura, pois nesse estágio a comunidade torna-se autossustentável, e não necessita, portanto, do meio externo para desenvolvimento de atividades essenciais, nem tampouco apresenta grandes variações com relação à composição microbiana (MARSH; MARTIM, 2005).

O processo de formação da placa inicia-se a partir de uma sequência ordenada de eventos, com a colonização da película adquirida pelas bactérias, os chamados colonizadores primários ou iniciais. Na sequência há a co-adesão de novas bactérias àquelas já aderidas, os chamados colonizadores secundários, e o início da formação de microcolônias, o que resulta no aumento da massa da placa e facilita que microrganismos sem capacidade de aderência colonizem o biofilme por agregação. A placa denominada madura pode ser definida como uma comunidade clímax, onde a população de espécies microbianas atinge estabilidade e equilíbrio (WEILDLICH, 2001).

Em 1998, Socransky et al. descreveram a formação de complexos microbianos presentes nos biofilmes dentais. A partir de 13.321 amostras de placa subgengival de 185 indivíduos, os autores descreveram o agrupamento das espécies nos biofilmes. Cinco complexos bacterianos foram identificados, sendo que os complexos amarelos, púrpura e verde reúnem espécies que estão presentes na colonização inicial das superfícies dentárias. As bactérias destes complexos fornecem receptores e criam condições ecológicas para as bactérias do complexo laranja, que precedem e criam condições para as bactérias do complexo vermelho, bactérias essas que se apresentam em maior número quando há sinais clínicos de inflamação subgengival. As bactérias integrantes do

complexo vermelho, *Tannerella forythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, são reconhecidas como os principais microrganismos envolvidos com o processo de destruição periodontal (SOCRANSKY et al., 1998; NEWMAN et al., 2007).

2.2.2 Biofilmes supra e subgingival e a patogênese da doença periodontal

A natureza, composição e estrutura dos biofilmes supra e subgingivais são distintas. Ainda que as características gerais apliquem-se a ambas, as condições ecológicas e os fatores que guiam o desenvolvimento dos biofilmes são diferentes, devido, em grande parte, à sua localização. O crescimento do biofilme supragengival, por estar em contato com a cavidade oral, está sujeito a abrasões intensas, pela influência direta da saliva, da língua, da fala, e da mastigação, o que acaba por limitar o acúmulo indefinido do biofilme. Além disso, há a ação dos componentes de defesa da saliva, como imunoglobulina A, lactoferrina, lisozima e peroxidases que têm propriedades antimicrobianas e agem de maneira sinérgica para limitar a colonização e o crescimento do biofilme supragengival (WEILDLICH, 2001).

Em contraste, o biofilme subgingival beneficia-se da proteção oferecida pela sua localização, visto que os tecidos periodontais o protegem das condições adversas encontradas no ambiente supragengival. Os principais limitantes do crescimento do biofilme subgingival são o espaço exíguo e a ação do sistema de defesa. O fluido gengival passa a ser uma fonte rica de nutrientes que contém componentes dos sistemas de defesa inato e adaptativo que auxiliam na prevenção da disseminação da infecção periodontal. A formação de biofilme subgingival parece ser uma adaptação necessária e conveniente que permite a sobrevivência microbiana, mesmo na presença de um sistema de defesa imunocompetente. As propriedades de aderência de algumas bactérias, acrescidas das propriedades da matriz de exopolissacarídeos do biofilme representam uma vantagem do ponto de vista evolutivo difíceis de serem superadas. Em função de sua estrutura, esses biofilmes podem ser resistentes não somente a antimicrobianos e agentes químicos como a clorexedina, mas também a mecanismos de defesa do

hospedeiro como a opsonização e fagocitose bacteriana pelo sistema complemento (WEILDLICH, 2001; NEWMAN ET AL., 2007).

Nesse contexto, é necessário reconhecer que gengivite e periodontite são doenças com natureza, epidemiologia e manejo terapêutico distinto, visto que a gengivite está relacionada com o biofilme supragengival e a periodontite com o biofilme subgengival (WEILDLICH, 2001).

2.2.3 Gengivite e Periodontite

A gengivite apresenta-se como a inflamação do periodonto de proteção, decorrente do acúmulo de biofilme supragengival e que não leva à destruição tecidual. Diz-se que a gengivite é uma resposta universal do periodonto de proteção ao acúmulo do biofilme, pois todo indivíduo que apresentar biofilme supragengival acumulado por um período de tempo que exceda a capacidade de equilíbrio entre biofilme e hospedeiro, irá desenvolver inflamação gengival (MARIOTTI, 1999).

A gengiva responde à inflamação, semelhante a que pode ocorrer em qualquer tecido conjuntivo: vasodilatação, marginação leucocitária, migração celular, produção de prostaglandinas, enzimas destrutivas e edema. Enquanto não houver perda de inserção do epitélio juncional, esta primeira etapa é chamada de gengivite, que pode ser reversível a partir da remoção do agente irritante (o biofilme) (GIOSO, 2007; NEWMAN et al 2007).

O processo imune e inflamatório ocorre no tecido gengival para proteção contra o ataque da microbiota local e previne que microrganismos e seus metabólitos lesivos espalhem-se ou invadam os tecidos. Esta reação de defesa do hospedeiro, no entanto, também é considerada potencialmente prejudicial (LINDHE; LANG; KARRING, 2005).

A continuidade do processo infeccioso, ou seja, sob a ausência de higienização adequada dos tecidos orais, aumenta a inflamação e pode tornar crônico o processo instalado. Frente ao agente agressor e com o avançar do processo, haverá desencadeamento da resposta imunológica de caráter humoral do animal, resultando em

produção de mais prostaglandinas, mediadores da inflamação, endotoxinas, estimulação de osteoclastos presentes na região e ativação de enzimas como protease, collagenase, hialuronidases, dentre outras. Assim, uma resposta que presumivelmente parece ser benéfica, passa a atuar como fator de destruição acelerada das estruturas de suporte do dente, com reabsorção óssea e retração gengival. O tecido conjuntivo e o epitélio gengival são destruídos pelo infiltrado de células inflamatórias e produtos bacterianos. A partir do momento em que ocorre o comprometimento do periodonto de sustentação, o processo é chamado de periodontite ou doença periodontal, sendo irreversível (PAGE; SCHRÖEDER, 1976; HARVEY; EMILY, 1993; GIOSO, 2007; CAFFESSE et al., 2002).

A presença do biofilme subgengival é necessária, porém não é suficiente para o estabelecimento das periodontites. A susceptibilidade do hospedeiro constitui-se em outro fator componente necessário para o estabelecimento destas doenças, sendo que indivíduos não suscetíveis mesmo na presença de gengivite, não apresentarão doença periodontal (KINANE; ATTSTRÖM, 2005). Na verdade, a expressão “susceptibilidade do hospedeiro” é um termo genérico usado para denominar fatores conhecidos e desconhecidos de origem comportamental, ambiental, sistêmico e genético que integram a cadeia causal das periodontites (WEILDLICH, 2001).

Morinha et al. (2011) acreditam que na doença periodontal a variação genética pode afetar de forma importante a regulação da doença, influenciando na estrutura do tecido (imunidade inata), resposta aos anticorpos (imunidade adaptativa) e mediadores inflamatórios (inflamação não específica), mudando a resposta contra a bactéria odontopatogênica e por último a destruição periodontal. Os autores atentam para que os genes e os “caminhos” associados com a regulação das citocinas devem receber maior atenção nos estudos genéticos de doenças complexas, incluindo a doença periodontal. Há uma complexa interação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias que é a chave para o desenvolvimento e a progressão da doença, da regulação do processo inflamatório e da resposta imune adaptativa.

Segundo Lindhe, Land e Karring (2005) e Martins (2007), a doença periodontal é multifatorial, sendo resultante da presença de microrganismos periodontopatogênicos, imunidade do hospedeiro, fatores locais, condições adquiridas (doenças sistêmicas) e

fatores genéticos (Figura 4). Portanto os autores ressaltam que o foco deve estar no paciente que tem a doença e não simplesmente na doença em si.

Figura 4 - Natureza multifatorial da doença periodontal

Enquanto as reações imunes e inflamatórias da doença periodontal podem parecer similares às demais vista no organismo, elas são significativamente diferentes. Para o entendimento, é uma consequência da anatomia do periodonto, da permeabilidade do epitélio juncional, e da dinâmica do fluido gengival. Sua finalidade principal é preservar a continuidade do epitélio juncional através da interface do tecido duro e mole. Outra característica importante é que o “processo de defesa” no tecido periodontal ocorre em resposta a um grande número e variações de microrganismos que residem na superfície dentária numa comunidade dentro de um biofilme bem próximo, mas não dentro da gengiva. A doença periodontal tem sido referida como uma “infecção bacteriana mista” (LINDHE; LANG; KARRING, 2005).

As espécies bacterianas do biofilme interagem e apesar de algumas não serem potencialmente patogênicas, elas podem influenciar o processo da doença, auxiliando e ajudando as bactérias patogênicas, também contidas no biofilme (LINDHE; LANG; KARRING, 2005; NEWMAN ET AL., 2007).

Os microrganismos de um biofilme em um ambiente com bolsa periodontal estão em constante fluxo, espécies que são relevantes em uma determinada fase da doença, podem não ser importantes em outra fase. Em outras palavras, a destruição do tecido pode resultar na combinação de fatores microbianos que variam o tempo todo. Diferente do que acontece com a maioria das outras doenças infecciosas clássicas, (como por exemplo, a tuberculose) onde o hospedeiro apresenta um tipo de organismo e o diagnóstico da doença é indicado pela presença ou ausência desse patógeno em particular (WEILDLICH, 2001; LINDHE; LANG; KARRING, 2005).

A patogenicidade dos microrganismos diz respeito muito mais a capacidade inata, inflamatória e imune do hospedeiro do que da virulência das próprias bactérias. Por exemplo, a destruição do tecido periodontal pode ocorrer pelas enzimas microbianas que digerem o tecido, mas também e mais, pela resposta do hospedeiro às essas enzimas, já que a destruição tecidual pode ocorrer pela reação imune e inflamatória do hospedeiro a um componente fisiológico normal da bactéria como os lipopolissacarídeos (LPS) encontrados nas membranas externas das bactérias (WEILDLICH, 2001; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; NEWMAN ET AL., 2007).

Estudos epidemiológicos mostram que no mesmo indivíduo a severidade da injúria periodontal pode variar de dente para dente ou mesmo em cada face de um mesmo dente. Isso acontece, pois cada local em sua boca apresenta um microambiente individualizado ou específico (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

2.2.4 Resposta inflamatória - mecanismos da resposta imune

Em indivíduos saudáveis, a proteção contra a invasão de microrganismos ocorre através da ativação simultânea e inter-relacionada do sistema imune, que compreende a resposta natural (inata ou inespecífica) que é inespecífica e indiferente à natureza antigênica do microrganismo e à resposta adquirida (adaptativa ou específica) (HEEG; DALPKE, 2003).

O sistema imune inato é compreendido por substâncias solúveis como a resposta humoral que inclui o sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e também por elementos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células “natural killer”. O sistema imune inato é responsável por deflagrar a resposta imune adquirida (BOCHUD, CALANDRA, 2003).

Agindo de forma integrada e auto-regulada, as respostas imunes inata e adquirida promovem o combate à invasão de microrganismos, limpeza dos restos teciduais, remodelagem tecidual com proliferação celular e ação angiogênica para o restabelecimento da matriz lesada, promovendo a recuperação do hospedeiro, e reduzindo a probabilidade de infecção secundária ou oportunista (AYALA et al., 2003). A inabilidade na auto-regulação ou desequilíbrio na reação inflamatória pode resultar em crescimento bacteriano incontrolável promovendo episódios de infecção recorrentes ou resposta inflamatória intensa com lesão tecidual, colapso vascular, falência de múltiplos órgãos ou mesmo resposta hipoinflamatória, promovendo a supressão imunológica (AYALA et al., 2003).

Os macrófagos e neutrófilos do sistema imunológico inato formam a primeira linha de defesa contra os microrganismos comuns e são essenciais para o controle das infecções bacterianas habituais. Estas células desempenham papel crucial na iniciação e no posterior direcionamento da resposta imune adaptativa (JANEAWAY et al., 2002).

Constantemente um alto número de polimorfonucleares é liberado da medula óssea para a corrente sanguínea (SHI et al., 2001). Esse número associado ao poder citotóxico destas células requer controle preciso para que não ocorram danos teciduais por auto-agressão. Essas células apresentam vida média na circulação de seis horas e, depois deste período, migram para o tecido ou locais de infecção (OGURA et al., 1999; SHI et al., 2001). O processo de morte celular dos polimorfonucleares por apoptose e posterior fagocitose pelos macrófagos impede que haja liberação de substâncias citotóxicas contidas nessas células, evitando assim lesões orgânicas (OGURA et al., 1999).

Os neutrófilos são células que apresentam núcleos polilobulados e contêm grânulos no seu citoplasma (por isso são chamados também de granulócitos polimorfonucleares). Encontram-se envolvidos em todas as fases da inflamação e são os iniciadores do processo nos tecidos. Na evolução dos mecanismos imunológicos contra

microrganismos patogênicos, os mamíferos desenvolveram diversas maneiras para sua identificação e neutralização. Após a lesão tecidual ocorre a produção de proteínas responsáveis pela interação entre as células endoteliais dos capilares e os neutrófilos. São as chamadas moléculas de adesão, conhecidas como selectinas e integrinas. Essas proteínas promovem atração dos neutrófilos pelo endotélio. Dessa maneira, o neutrófilo, que em situações normais ocupa a região central da coluna de sangue dentro do capilar, passa a aproximar-se do endotélio “margeando” e “rolando” sobre as células endoteliais (SGARBI et al., 2006).

A expressão de células endoteliais de outro grupo de moléculas de adesão *CAM I* (*cellular adhesion molecules*- tipo I) leva ao estacionamento do neutrófilo sobre o endotélio da região comprometida (ROTHLEIN, 1997). A partir de então ocorre a diapedese dos neutrófilos (entre células endoteliais) e a sua deposição no espaço intersticial, que levará à produção de polipeptídeos (interleucinas) responsáveis pela quimiotaxia de novas células inflamatórias e ao início dos processos de resolução e reparação tecidual. Quando o neutrófilo da corrente sanguínea recebe a informação de uma reação inflamatória em curso, ocorre uma profunda alteração no seu metabolismo intermediário e então a célula é dita “ativada”. Isso significa que o neutrófilo passará a expressar as suas moléculas de adesão do grupo das L-selectinas e passará, também, a consumir ativamente oxigênio em suas mitocôndrias. Esse processo é chamado de “explosão oxidante” (*burst* oxidativo das mitocôndrias) e esse consumo não é direcionado ao metabolismo da célula, mas sim à produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs). Uma vez nos tecidos, os neutrófilos sofrem um processo de “degranulação” com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (armazenada nos grânulos azurófilos). A enzima mieloperoxidase atua na presença do ânion superóxido (EROS identificada como O_2^-). E do ânion cloreto (Cl^-) para formar o ácido hipoclorídrico. O ácido hipoclorídrico apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo também, lesiva para as células do tecido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1993).

A infiltração de neutrófilos é seguida pela migração de monócitos da corrente sanguínea que, nos tecidos, sofrem transformação em macrófagos. Os macrófagos são as células responsáveis pela fagocitose dos elementos gerados pela destruição das bactérias

e de restos celulares e produzem substâncias relacionadas à modulação da resposta inflamatória (SGARBI et al., 2006).

2.3 RESPOSTA TECIDUAL INFLAMATÓRIA E IMUNOLÓGICA NA GENGIVITE E PERIODONTITE

Classicamente a resposta inflamatória tem sido caracterizada como aguda e crônica. A inflamação aguda caracteriza-se por ter curta duração, ter predomínio de neutrófilos e exibir fenômenos vasculares e exsudativos intensos. A inflamação crônica possui longa duração e é mais específica, suas principais células são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos e exibe fenômenos mais destrutivos e regenerativos do que o processo agudo (MARTINS; MARTINS, 2007).

A persistência da infecção bacteriana que ocorre na doença periodontal leva a uma confusão no que se refere ao estado inflamatório crônico ou agudo. Desta forma, a resposta do hospedeiro na doença periodontal vem sendo dividida em resposta imune inata, com características semelhantes à inflamação aguda. E resposta imune adaptativa, semelhante a inflamação crônica. Partindo-se de conceitos evolutivos, a resposta inata acontece primeiramente que a adaptativa. No momento em que patógenos específicos superam os elementos de defesa inata, permanecendo no local por mais tempo, estabelece-se a resposta adaptativa (MARTINS; MARTINS, 2007).

Embora os mecanismos de defesa que atuam na imunidade inata e na adaptativa sejam semelhantes, encontram-se amplificados, direcionados e potencializados na resposta adaptativa (DIXON et al., 2004; SEYMOUR; TAYLOR, 2004).

A histologia demonstra que na maior parte dos estágios da doença periodontal há comunicação cruzada entre os elementos celulares e bioquímicos da resposta inata e da imunidade adaptativa, sendo, portanto, muito difícil separar e individualizar o impacto de cada uma na patogênese da doença periodontal (MARTINS; MARTINS, 2007).

O biofilme da placa entra em contato com o hospedeiro na altura da junção cimento-esmalte. Neste local, a placa enfrenta a superfície dura e não descamativa do

dente e a superfície macia do epitélio sulcular e juncional. Estes epitélios representam barreiras físicas e químicas frágeis contras as propriedades patogênicas da microbiota do biofilme. Na realidade, tais epitélios agem como um porteiro, permitindo seletivamente a passagem de antígenos, células e moléculas defensivas (DIXON et al., 2004; SEYMOR; TAYLOR, 2004; SCHENKEIN, 2006).

O epitélio sulcular e o juncional são compostos por células epiteliais dispostas em várias camadas entremeadas por células dendríticas (células de Langerhans), sendo que essas funcionam como reconhecedoras e apresentadoras de antígenos (GEMMEL et al., 2002; CUTLER; JOTWANI, 2004). Frente ao acúmulo de biofilme, os lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e DNA dos microrganismos ligam-se a receptores específicos das células epiteliais normais e estimulam as células a produzirem peptídeos antibacterianos (defensinas) e mediadores químicos pró-inflamatórios, iniciando a inflamação no tecido conjuntivo local. Neste tecido, esses mediadores agem nos vasos sanguíneos locais favorecendo a vasodilatação e a exsudação (líquido rico em proteínas e células inflamatórias) gerando outros mediadores a partir do plasma sanguíneo (sistema complemento, sistema cinina, sistema de coagulação e fibrinolítico) ou a partir de célula epiteliais e conjuntivas. Portanto, enquanto houver depósito microbiano haverá agressão celular e liberação constante de mediadores químicos que perpetuam a resposta inflamatória (GEMEL; SEYMOUR, 2004; NANJI; BOSSHARD, 2006; MAHANONDA; PICHYANGKUL, 2007).

As defensinas são amplas variedades de polipeptídeos antimicrobianos produzidos pelas células epiteliais e de defesa que atravessam o epitélio, as quais destroem diretamente uma gama de bactérias (gram negativas e gram positivas). Além disso, as defensinas podem ativar o sistema imunológico perpetuando a inflamação (MARSHALL, 2004).

Os mediadores químicos, em especial citocinas IL-8, IL-1 e TNF- α secretados pelas células epiteliais e dendríticas levam a alterações teciduais locais tais como vasodilatação, saída de plasma e de células inflamatórias além da atração de células do sistema imune inato para o foco gengival agredido. Neste momento, forma-se a primeira linha de defesa, a resposta inata, constituída por um infiltrado inflamatório de

neutrófilos, macrófagos, defensinas e inúmeros mediadores químicos (DIXON et al., 2004; GEMMEL; SEYMOUR, 2004, SEYMOUR; TAYLOR, 2004).

Os neutrófilos e macrófagos participam da defesa inata englobando, reconhecendo, destruindo microrganismos e perpetuando a inflamação via secreção de mais mediadores químicos pró-inflamatórios até que o agente lesivo seja eliminado (GEMMEL et al., 2004; SCHENKEIN, 2006).

Uma vez que os neutrófilos são atraídos em direção ao agente microbiano eles podem transmigrar o epitélio e agir diretamente nas bactérias acumuladas no sulco gengival. Quando depositados no tecido conjuntivo gengival, formam uma barreira de leucócitos com a função de impedir a disseminação dos patógenos que tentam invadir os tecidos. Os neutrófilos sintetizam e armazenam um grande número de substâncias tais como enzimas de lisossomos, incluindo proteases destrutivas, que quando liberadas, levam a destruição de vários tipos de células como: epitélio, fibroblastos e células endoteliais (SCHENKEIN, 2006).

Se o antígeno microbiano não for removido haverá a contínua ativação dos neutrófilos e macrófagos fazendo com que estas células liberem mediadores químicos que ativam o recrutamento da resposta imune adaptativa por levarem à diferenciação (formação e maturação) e migração de células T. A resposta imune adaptativa está sob o controle das células T, as quais regulam a diferenciação das células B, dos plasmócitos e a produção de anticorpos. Inicialmente são visualizados mais linfócitos T, poucos linfócitos B e raros plasmócitos. Com o aumento do exsudato, nota-se a presença de maior quantidade de imunoglobulinas séricas, complemento e fibrinogênio. No tecido conjuntivo local nota-se degeneração dos fibroblastos e da matriz extra celular (perda de colágeno) (GEMMEL et al., 1997; GEMMEL; SEYMOUR, 2004; DIXON et al., 2004, SEYMOUR; TAYLOR, 2004).

No início, até poucos dias de acúmulo microbiano, a resposta inflamatória descrita acima não é clinicamente visível, entretanto após alguns dias (7 a 14 dias) nota-se clinicamente "vermelhidão", o edema e a flacidez gengival. Essas características são devido ao aumento da vasodilatação, exsudação e destruição do tecido conjuntivo, respectivamente. Paralelamente, nota-se sangramento à sondagem gengival, decorrente

da destruição do epitélio sulcular (ulceração) pela ação direta dos microrganismos e neutrófilos (BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

Histologicamente na gengivite observam-se na superfície gengival áreas de degradação do epitélio sulcular, infiltração do epitélio por neutrófilos, e proliferação do epitélio juncional para o interior do tecido conjuntivo na busca de nutrição. No tecido conjuntivo gengival subjacente observam-se intenso infiltrado inflamatório com presença de macrófagos e linfócitos, degradação das fibras colágenas e edema. Essa resposta inflamatória leva a degradação desse tecido, inicialmente em torno dos vasos e depois nas regiões vizinhas promovendo a desintegração estrutural e funcional da gengiva (BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

Até o momento, a gengivite tem sido considerada uma resposta não progressiva, controlada, balanceada, enquanto que a periodontite representa um sistema menos controlado, o qual parece ser cíclico através de períodos de destruição e homeostase (PAGE et al., 1997; NEWMAN et al., 2007; GIOSO, 2007).

Se a placa continuar presente, a gengivite pode avançar para o último estágio denominado periodontite (PAGE et al., 1997; KINANE et al., 2006).

O progresso da doença é devido a uma combinação de fatores, incluindo a presença de bactérias periodontopatogênicas, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteínases da matriz e prostaglandinas, e baixos níveis de citocinas inibidoras da inflamação (PAGE et al., 1997; KINANE et al., 2006).

A progressão da gengivite para a periodontite resulta na migração apical do epitélio juncional, podendo levar à formação da bolsa periodontal e recessão gengival. Com isso há migração da placa e consequentemente, há o desenvolvimento da resposta imune adaptativa que se infiltra apicalmente e lateralmente, com denso infiltrado de plasmócitos, linfócitos T, linfócitos B, e macrófagos. Quando o foco inflamatório se instala predominantemente em áreas de adesão ao cimento, o resultado é a perda de adesão (inserção) do tecido conjuntivo periodontal. Quando ocorrer próximo à crista óssea alveolar, os leucócitos são ativados, produzem mediadores químicos (prostaglandina, IL-1, IL-6, TNF) que estimulam a atividade osteoclástica e consequentemente a reabsorção óssea (PAGE et al., 1997; BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

O epitélio da bolsa periodontal e o sulcular também são agredidos e destruídos constantemente pelos microrganismos, o que permite o acesso direto dos antígenos da placa e seus metabólitos, causando uma ativação contínua do sistema imune, estabelecendo-se desta forma, um círculo vicioso. Este epitélio fragilizado sangra com facilidade (KINANE et al., 2006).

O fluido gengival na periodontite exibe altas concentrações de anticorpos (IgG, IgA, IgM), mediadores químicos (complemento, citocinas) e neutrófilos. No tecido conjuntivo subjacente há um predomínio de plasmócitos levando ao estabelecimento de um paradigma de que a periodontite é uma lesão de células B e que linfócitos T tem um papel imunoregulador (recrutando e ativando) essas células (KINANE et al., 1997). Pacientes com periodontite produzem anticorpos tanto local quanto sistemicamente em reação aos vários periodontopatógenos (MARTINS; MARTINS, 2007).

Os macrófagos também fazem-se presentes na periodontite e podem ter uma variedade de outras funções além do processamento de antígenos e fagocitose, podem produzir citocinas (IL-1, IL-6, TNF) que estimulam a proliferação local de células T, induzem a reabsorção óssea e a produção de collagenases pelos fibroblastos (BAKER et al., 2001; DOMEIJ et al., 2002).

2.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

O conceito de resposta inflamatória é baseado na codificação de gênese para a síntese de pequenas moléculas mediadoras que se auto-regulam durante a inflamação (DINARELLO, 2000). Após o reconhecimento da estrutura molecular da membrana do microrganismo patogênico são desencadeadas respostas imunes subsequentes com ativação e transcrição de vários genes promovendo uma cascata de eventos. Está inserida neste contexto a indução enzimática via óxido nítrico sintetase, via fosfolipase A2, via ciclooxigenase-2, síntese de citocinas pró-inflamatórias, síntese do fator ativador de plaquetas, leucotrienos, prostanóides e quimiocinas (DINARELLO, 2000; SENFTLEBEN; KARIN, 2002).

Avanços recentes na compreensão da resposta inflamatória e imunológica têm gerado novos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na destruição do tecido periodontal. Estudos indicam que a identificação de mediadores químicos pode contribuir na avaliação da progressão da doença bem como auxiliar no monitoramento da resposta tecidual ao tratamento sendo, portanto, considerados marcadores biológicos para doença periodontal (GRAVES; COCHRAN, 2003; DELALEU; BICKEL, 2004; BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

No momento que há a agressão tecidual e a defesa inata é deflagrada, várias substâncias químicas inflamatórias são liberadas no local afetado. Dentre os vários tipos de mediadores químicos, as citocinas são muito estudadas na doença periodontal, principalmente a IL-1, TNF- α , fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e IL-8. Além delas, outro mediador originado do metabolismo do ácido aracdônico, denominado de PGE2 também é alvo de várias pesquisas. Estes mediadores são relevantes, pois sua atividade coincide com eventos críticos que ocorrem durante a doença periodontal, como a perda de inserção conjuntiva e a reabsorção óssea alveolar (PAGE, 1997; GRAVES; COCHRAN, 2003).

As citocinas são pequenos polipeptídeos produzidos em resposta a vários estímulos, dentre eles a lesão tecidual e infecção (KIM; DEUTSCHMAN, 2000; CUNNEEN; CARTWHRIGHT, 2004). A nomenclatura das citocinas é baseada no seu local de origem. Citocinas produzidas por monócitos são chamadas monocinas, e citocinas produzidas por linfócitos são chamadas linfocinas. A palavra citocina foi utilizada para descrever a citocina produzida pelo leucócito, sendo o alvo de ação o próprio leucócito (HACK et al., 1997). Atualmente o termo empregado para citocinas independe da origem e do alvo (ABBAS et al., 2000).

Suas principais células produtoras são os linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos teciduais. Uma vez estimuladas essas células não apenas produzem a citocina, mas também promovem sua liberação, possibilitando que a mesma possa agir na própria célula que a secretou (ação autócrina), ou em células próximas ou distante (ação parácrina e endócrina) (GRAVES; COCHRAN, 2003; DELALEU; BICKEL, 2004).

Essas glicoproteínas regulam a resposta imune por meio de sinalização entre as células e compartilham os sinais intracelulares com os receptores distribuindo informações sobre o tipo de infecção e o recrutamento de células efetivas para a defesa do organismo (TIZARD 2002; HEEG; DALPKE, 2003).

A concentração sérica de citocinas é baixa ou indetectável em indivíduos saudáveis, mas sua produção é estimulada durante a invasão ao hospedeiro por patógenos (NETEA et al., 2003).

As quimiocinas são uma classe de citocinas que apresentam propriedades quimioatraentes, induzindo células com receptores apropriados a migrarem. As citocinas secretadas pelos macrófagos, em resposta aos patógenos, são um grupo de moléculas estruturalmente diverso e incluem algumas interleucinas (JANEAWAY, 2007).

As interleucinas atuam intensamente em todas as fases da inflamação (CALL et al., 2001). As diferentes interleucinas podem ser divididas em pró (estimulam) ou anti (inibem) inflamatórias (GIANNOUDIS et al., 2004). As interleucinas têm ação preponderante no local da inflamação, porém em algumas situações podem passar à corrente sanguínea e ter ação sistêmica. Exemplo disso são as alterações de comportamento (apatia, anorexia) e de temperatura (febre ou hipotermia), que poderiam sinalizar ações das interleucinas no sistema nervoso central (MOLDAWER; COPELAND, 1997).

Foi descrito um grande número de interleucinas e a lista continua sendo ampliada, porém entre as citocinas mais estudadas há a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como representantes das citocinas pró inflamatórias, e a interleucina 8 (IL-8) ou a interleucina 10 (IL-10) como representantes das citocinas anti-inflamatórias. As interações entre as citocinas são bastante complexas e em alguns casos pode ser definido que a produção do TNF- α é diminuída pela atuação da IL-10 (SGARBI et al., 2006).

2.4.1 Interleucinas pró-inflamatórias

As citocinas que possuem ação pró-inflamatória agem causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, estimulam a degradação tecidual pela

ativação de metaloproteinases da matriz e promovem a reabsorção óssea (SEYMOUR; GEMMEL, 2001).

2.4.1.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

É o principal mediador da resposta inflamatória aguda e é a única citocina capaz de induzir de maneira isolada a SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) (HERBERT et al., 1995).

Os fagócitos mononucleares ativados são os principais produtores de TNF- α (ABBAS et al., 2000) e o estímulo mais importante para a produção dessa citocina é o LPS (lipopolissacarídeo). Este é liberado normalmente durante a replicação bacteriana como consequência de sua morte, devido à lise da parede celular onde se encontra (BENJAMIN, 2001). Em decorrência deste fato, ocorre grande liberação de TNF- α em infecções causadas por bactérias gram negativas que liberam LPS (LARRICK; KUNKEL, 1988; SPOONER et al., 1992).

A principal função do TNF- α é induzir o recrutamento de polimorfonucleares e monócitos para os locais de infecção e ativá-los (SPOONER et al., 1992). Outras funções do TNF- α são: estimular a proliferação de precursores de osteoclastos maduros para estimular a reabsorção óssea em ação sinérgica com a IL-1; facilitar a degranulação de neutrófilos e a aderência de leucócitos na parede de células endoteliais. Aumentar a permeabilidade vascular e estimular as células endoteliais a liberar IL-1; Aumentar a atividade fagocítica, limitar o reparo através da indução da apoptose de células produtoras de matriz (fibroblastos) (KINANE e LAPPING, 2001).

2.4.1.2 Interleucina-1 β (IL-1 β)

É produzida predominantemente por macrófagos, mas também por linfócitos, plaquetas, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células do sistema nervoso

central. Sua produção ocorre quando tais células são estimuladas por substâncias microbianas, complexos imunes, prostaglandinas, fatores do complemento ou pela ação de outras citocinas (SEYMOUR; GEMMEL, 2001).

Juntamente com o TNF- α , a IL-1 promove a adesão de células leucocitárias ao endotélio, liberando proteases e metabólitos da cadeia aracdônica, possuindo efeitos na modulação e produção de outras citocinas (AKAMINE et al., 2000). Induz a síntese do fator de ativação plaquetário e aumenta as propriedades pró-coagulantes das células endoteliais, tornando a superfície endotelial pró-trombogênica (PAIZAN; MARTIN, 2009).

Na doença periodontal, induzem a síntese de prostaglandinas por macrófagos e fibroblastos gengivais, levando a um aumento da permeabilidade vascular e desmineralização óssea; induzem os fibroblastos, macrófagos, queratinócitos, células endoteliais, osteoblastos e osteoclastos a produzir metaloproteinases. Essas enzimas mais conhecidas como collagenases, gelatinases, estromalisinas, degradam o colágeno resultando na degradação tecidual; facilitam a apresentação de antígenos e a ativação de linfócitos T e B, promovendo ativação, proliferação e secreção de anticorpos (MARTINS; MARTINS, 2007).

2.4.1.3 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é produzida e secretada por células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos. Pode contribuir para o desenvolvimento da lesão aterosclerótica pelo seu efeito parácrino, autócrino e endócrino (VOLP et al., 2008). Age como co-fator da IL-1 na síntese de imunoglobulina M (IgM) e da IL-5 na síntese da imunoglobulina A (IgA), sendo o principal estimulador da resposta de fase aguda (TIZARD, 2002; PAIZAN; MARTIN, 2009).

2.4.2 Interleucina anti-inflamatória

Segundo estudos, a regulação do processo inflamatório envolve um equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Essas últimas têm, portanto, o papel de inibidoras das primeiras (MOURA et al., 2001).

2.4.2.1 Interleucina-10 (IL-10)

A mais bem conhecida e estudada citocina anti-inflamatória. É produzida por macrófagos e células dendríticas, e está envolvida no controle da reação imune inata. A IL-10 inibe a função dos macrófagos e a síntese de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Após exposição ao LPS, inibe a produção das TNF- α , IL-1, IL-6 (MIRE-SLUIJS; THORPE, 1998). Observa-se um aumento de sua concentração e da do receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) concomitante à diminuição das concentrações das citocinas pró-inflamatórias. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a IL-10 é induzida em linfócitos que infiltram as zonas isquêmicas e infartadas. Ela suprime metaloproteínas e estimula inibidores da metaloproteinase em macrófagos, o que favorece a preservação da matriz celular. Sua indução inicial é dependente da reperfusão (MOURA et al., 2001).

2.5 EFEITOS SISTÊMICOS DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Além de seus efeitos locais, as citocinas produzidas pelos macrófagos apresentam efeitos à distância, que contribuem para a defesa do hospedeiro. Um desses efeitos é a elevação da temperatura corporal, que é mediada por TNF- α , IL-6, IL-1 β . Esses são denominados pirógenos endógenos, pois causam febre e são derivados de uma fonte endógena, e não de componentes bacterianos como o LPS, o qual é um pirógeno

exógeno. A febre geralmente é benéfica para a defesa do hospedeiro. A maioria dos patógenos cresce melhor em temperaturas baixas, e as respostas imunes adaptativas são mais intensas em temperaturas mais elevadas. As células do hospedeiro também são protegidas dos efeitos deletérios TNF- α em temperaturas elevadas. Um dos efeitos mais importantes do TNF- α , IL-6 e IL-1 β é o início da reação conhecida como resposta de fase aguda. Essa reação envolve uma alteração na síntese de proteínas secretadas pelo fígado no plasma sanguíneo e o resulta da ação de IL-6, IL-1 β e TNF- α nos hepatócitos. Na resposta de fase aguda, os níveis de algumas proteínas plasmáticas caem, ao passo que os de outras aumentam marcadamente (JANEAWAY, 2007).

As proteínas cuja síntese é induzida por TNF- α , IL-6, IL-1 são chamadas proteínas de fase aguda. Algumas dessas proteínas são de especial interesse porque mimetizam a ação dos anticorpos, mas, ao contrário deles, essas proteínas têm ampla especificidade para padrões moleculares associados aos patógenos e dependem somente da presença das citocinas para as suas funções. Uma dessas proteínas é a proteína C reativa, que reconhece o patógeno e liga-se à porção fosfocolina de certos lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias e fungos. A fosfocolina também é encontrada em fosfolípidos da membrana celular de mamíferos, embora em uma forma que não se pode ligar à proteína C reativa. Quando a proteína C reativa liga-se a uma bactéria não é capaz somente de opsonizá-la, mas também de ativar a cascata do complemento (JANEAWAY et al., 2007).

Um efeito final à distância das citocinas produzidas pelos macrófagos é induzir a leucocitose, ou seja, ao aumento dos neutrófilos circulantes. Os leucócitos provêm de duas fontes: a medula óssea, da qual os leucócitos maduros são liberados em número elevado, e os sítios nos vasos sanguíneos, onde os leucócitos aderem francamente às células endoteliais. Assim, os efeitos dessas citocinas contribuem para o controle da infecção, enquanto se desenvolve a resposta imune adaptativa (JANEAWAY et al., 2007).

O TNF- α é uma citocina importante que ativa a contenção local da infecção, mas induz choque quando liberada sistemicamente. Os mediadores inflamatórios também estimulam as células endoteliais a expressar proteínas que ativam a coagulação sanguínea em pequenos vasos locais, obstruindo-os e interrompendo o fluxo sanguíneo. Isso pode ser importante na tentativa de impedir que o agente infeccioso entre na

corrente circulatória e se dissemine para os órgãos de todo o corpo através da circulação. Em vez disso, o fluido que vazou para os tecidos nas fases iniciais da infecção transporta o patógeno na linfa, normalmente nas células dendríticas, para os linfonodos regionais, onde a resposta imune adaptativa pode ser iniciada (JANEAWAY et al., 2007).

Uma vez que a infecção dissemina-se para a corrente sanguínea, os mesmos mecanismos pelos quais o TNF- α contém a infecção local com tanta eficiência tornam-se catastróficos. A presença da infecção na corrente sanguínea, conhecida como sepse, é acompanhada pela liberação do TNF- α pelos macrófagos no fígado, baço, e em outros locais sistêmicos. A liberação sistêmica do TNF- α causa vasodilatação, que leva a perda da pressão sanguínea, aumento da permeabilidade celular e eventualmente ao choque. No choque séptico, a coagulação intravascular disseminada é igualmente ativada pelo TNF- α , levando a formação de coágulos nos pequenos vasos e ao grande consumo de proteínas de coagulação, de modo que o paciente perde a capacidade de coagular o sangue de forma adequada. Essa condição frequentemente leva à falência de órgãos vitais como rins, fígado, coração e pulmões, que ficam rapidamente comprometidos pela insuficiência de perfusão normal. Consequentemente, o choque séptico apresenta elevado índice de mortalidade. É claro que do ponto de vista da conservação evolutiva do TNF- α , seus benefícios sobrepõem as consequências devastadoras de sua liberação sistêmica (JANEAWAY et al., 2007).

Em níveis sistêmicos elevados, as citocinas podem ativar o endotélio a produzir substâncias vasoconstritoras e promover adesão leucocitária e plaquetária, predispondo à trombogênese (PAIZAN; MARTIM, 2009).

Como resposta sistêmica a IL-1 pode-se observar febre, neutrofilia, anorexia, sonolência e liberação da proteína C reativa. Células em cultura tratadas com IL-1 tornam-se super adesivas aos neutrófilos (CHRISTMAN et al., 1998; MOURA et al., 2001). Além da pirogenicidade associada à IL-1, também sabe-se que ela é mediadora da migração e da aderência dos neutrófilos aos miócitos, contribuindo para o dano cardíaco durante o evento da reperfusão; a IL-1 está presente intra-alveolarmente em pacientes que apresentam a síndrome do estresse respiratório e tem participação na vasodilatação que ocorre em pacientes que passam por circulação extra corpórea. A IL-1 é responsável

pela indução de outras interleucinas e age em sinergia com elas. Estudos observaram sinergia entre a IL-1, TNF, LPS e IL-6 (MOURA et al., 2001).

A IL-6 é mediadora central da resposta de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas estimuladas pelo fígado de fibrinogênio, proteína amilóide sérica, e em especial, da proteína C reativa (PCR) (VOLP et al., 2008). Pode induzir febre, anorexia e causar a liberação do hormônio adrenocorticotrófico. Ela foi detectada no soro humano depois de queimaduras, cirurgias eletivas, e em pacientes sépticos. A IL-6 pode ser um bom marcador de dano tissular e seus níveis podem indicar prognóstico de choque séptico, pois existe correlação comprovada entre suas concentrações e a gravidade do quadro clínico do paciente (MOURA et al., 2001). Em animais de experimentação a IL-6 foi relacionada com resistência insulínica (VOLP et al., 2008).

A IL-10 exerce seu efeito anti-inflamatório no sistema vascular pela inibição das interações celulares endoteliais (CAMs) e leucocitárias, inibição de citocinas pró-inflamatórias e inibição da produção de quimiocinas por macrófagos ou linfócitos. A IL-10 parece inibir de uma maneira continuada a produção das citocinas pró-inflamatórias por meio de *feedback* negativo (VOLP et al., 2008).

2.6 DOENÇAS SISTÊMICAS ASSOCIADAS À DOENÇA PERIODONTAL

O melhor conhecimento da fisiopatologia tem permitido a identificação de marcadores genéticos, imunológicos e bioquímicos que contribuem não só com o diagnóstico das doenças, mas também com a atividade ou remissão dos processos patológicos. Marcadores bioquímicos e genéticos têm mostrado forte associação com diversos tipos de cânceres e têm sido amplamente utilizados como método auxiliar de diagnóstico de doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas. Estes marcadores quando acoplados à história clínica e exame físico do paciente são de grande valor para determinação do prognóstico, da gravidade da enfermidade e podem auxiliar a escolha

terapêutica. Entretanto esses marcadores têm pouco valor quando analisados de forma dissociada da doença (LOOS, 2005; SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

Diversos mediadores da inflamação têm sido usados como marcadores para avaliação de quadros sistêmicos como a SIRS, a sepse, doenças coronarianas, diabetes, doenças neurológicas degenerativas. Os marcadores estão relacionados com as fases e constituintes do processo inflamatório: coagulação, complementos, sistema de ativação ao contato, apoptose e inflamação. Dentre essas, as proteínas de fase aguda são as mais estudadas (LAKS, 2010).

Através da mensuração e correlação de biomarcadores inflamatórios, a doença periodontal tem sido identificada como um potencial fator de risco para doenças sistêmicas, como por exemplo, a doença cardiovascular. A hipótese é de que a periodontite local, sendo uma doença inflamatória crônica, produz citocinas circulantes, como TNF- α , IL-1, IL-6 e outros reagentes de fase aguda (JOSHIPURA, 2004; RIDKER; SILVERTOWN, 2008, 2008) e contribuem para o desenvolvimento da arteriosclerose, podendo evoluir para doença cardiovascular (DESTEFANO et al., 1996; MATTILA et al., 1995; BECK et al., 1996; GEERTS et al., 2002). A arteriosclerose, doença imunomediada, é caracterizada pelo processo degenerativo que resulta no endurecimento e espessamento da parede das artérias; é uma das maiores causas de mortalidade mundial em pacientes humanos (FOZ et al., 2010).

Patógenos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermédia*, *Treponema denticola* e *Eikenella coordens*, têm sido encontrados em placas de ateromas (DORN et al., 1999; KOZAROV et al., 2006). Suspeita-se que a bacteremia circulante freqüente, combinada com a estimulação crônica do sistema imune, desempenha papel fundamental nas doenças sistêmicas.

Estudos afirmam que bactérias ou parte delas podem ter acesso à circulação via tecido periodontal inflamado durante rotinas diárias como mastigação e escovação dentária. Uma vez na circulação, componentes podem induzir e promover inflamação sistêmica e respostas pró-aterogênicas. Há outros estudos ainda que dizem que as endotoxinas podem desencadear ou acelerar arteriosclerose por múltiplos mecanismos, incluindo a ativação de células inflamatórias, aumentadas em estresse oxidativo, e a

modificação do metabolismo da lipoproteína LPS. A endotoxemia subclínica aumenta em três vezes o risco de incidência de arteriosclerose e doenças cardiovasculares (WIEDERMANN et al., 1999; KIECHI et al., 2001).

Em humanos, associações têm sido detectadas entre a doença periodontal e o aumento das concentrações de mediadores inflamatórios circulantes, proteínas da fase aguda, disfunções endoteliais sistêmicas, arteriosclerose, infarto agudo do miocárdio, múltiplas complicações durante a gestação e diabetes *mellitus* (MEALEY et al., 2003; DELIARGYRIS et al., 2004; FELICE et al., 2005; LINDEN et al., 2008; NIEDZIELSKA et al., 2008; HIGASHI et al., 2008; NAVES et al., 2008).

DeBowes et al. em 1996, demonstraram a associação entre doença periodontal e alterações histológicas nos rins, miocárdio e fígado de cães.

Tanto em humanos quanto em cães, a bacteremia transitória está associada à lesão do epitélio gengival, podendo ser desencadeada por processos cotidianos, como mastigação e escovação dentária, ou também devido à utilização de ultrassom e a extrações dentárias, quando submetidos a tratamento periodontal ou profilático. Estes últimos ocorrem entre 30 e 100% dos casos de cães que realizaram tratamento (ROGOSA et al., 1960; CALVERT et al., 1986; NIEVES et al., 1997; BOWERSOCK et al., 2000).

Medidas que podem ser implementadas para melhorar a saúde oral incluem tratamento definitivo de periodontite, visitas regulares ao dentista e higiene oral adequada, pois comparados com pacientes com periodonto saudável ou após tratamento, pacientes com doença periodontal têm reconhecidamente maiores concentrações de endotoxinas séricas (BUHLIN et al., 2003).

Os trabalhos, no homem, que avaliam mediadores inflamatórios séricos na doença periodontal são controversos. Yamazaki et al. (2005) realizaram estudo sobre o efeito do tratamento periodontal em pacientes japoneses com periodontite agressiva, quando foram mensurados proteína C reativa, IL-6 e TNF- α séricos e concluíram que somente a proteína C reativa teve decréscimo após o tratamento. No entanto, em outros estudos o tratamento periodontal foi bem sucedido melhorando a inflamação local e reduzindo os níveis séricos dos marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa e também a IL-6 (DÁIUTO et al. 2004; HIGASHI et al., 2008; SUN et al., 2009). Iwamoto et al. (2001) em um grupo de pacientes com doença periodontal e diabetes utilizou tratamento

antimicrobiano local (nas bolsas periodontais) por um mês, havendo, após esse período, diminuição sérica do TNF- α e dos níveis de glicose. Já Ide et al. (2003) mensuraram os níveis séricos de fibrinogênio, PCR, TNF-, IL-6 e IL-1 em pacientes com bolsa periodontal maior que 5mm em pelo menos cinco dentes e sinais radiográficos de reabsorção óssea. Os pacientes foram divididos em dois grupos e reavaliados em seis semanas e três meses após o tratamento periodontal. Com relação aos marcadores de fase aguda não houve diferença estatística após o tratamento periodontal, todavia, com relação a bolsa periodontal, nível clínico de inserção, e sangramento, houve melhora.

Em cães não foram encontradas mensurações séricas de interleucinas na periodontite. Apenas Rawlinson (2001) mensurou a proteína C reativa antes e depois do tratamento periodontal, obtendo diminuição da mesma após o tratamento, não importando a severidade da doença.

Valores de referência para as interleucinas em cães saudáveis não foram encontrados, porém Martins (2010) mensurando IL-6 sérico em cães com neoplasias orais, em diversos grupos medicados com diferentes analgésicos pós-operatório, obteve valores entre 6,32 pg/ml a 396,39 pg/ml. Neuman, Kaup e Scheulen (2010) mensuraram a IL-6 em doenças hepáticas que resultaram em média de 25 pg/ml (6 a 67 pg/ml) em hepatites crônicas, 58 pg/dl (3 a 180 pg/ml) em tumores hepáticos secundários e 102 pg/ml (1 a 202 pg/ml) em hepatites agudas.

Fransson et al. (2007) mensuraram IL-6 e TNF- α em cães com piometra e SIRS e obtiveram como resultado para a piometra média de IL-6 de 172,6 pg/ml (1,1 a 847,7 pg/ml) e para TNF 0,13 ng/ml (0,0 a 0,26ng/ml). Na SIRS obtiveram média de 180,9 pg/ml para IL-6 e 0,12 ng/ml para TNF.

Em cães com piometra foi encontrada média de IL-10 de 20,3 ng/ml, em cães saudáveis 18,9 ng/ml e em cães após orquiectomia ou ovário-salpingo-histerectomia 14,8 ng/ml (KJELGAARD-HANSEN et al., 2005).

Acredita-se que os mediadores inflamatórios são bons biomarcadores em diversas doenças. São, portanto, alvo das mais atuais e diversas pesquisas na medicina. Assim, fazem-se necessários mais estudos também na medicina veterinária, onde os dados na área ainda são escassos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar se a doença periodontal crônica em cães altera os níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios de fase aguda.

3.2 ESPECÍFICO

Mensurar os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α em cães com doença periodontal crônica, antes e após 21 dias do tratamento periodontal dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram triados cães com doença periodontal crônica. Os cães eram pacientes do Laboratório de Odontologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A inclusão do paciente ao estudo era feita após o esclarecimento ao proprietário sobre a metodologia do experimento e assinatura do termo de consentimento. O termo está em conformidade com a “Comissão de Ética no Uso de Animais” da mesma instituição, aprovado e protocolado sob o n. 2304/2011.

Para ser incluído no estudo o paciente devia se adequar aos critérios seguintes:

- Cães machos e fêmeas.
- Pacientes com doença periodontal crônica.
- Idade maior que cinco anos.
- Pacientes sem hábito de higienização oral.
- Informação ao proprietário a respeito da participação no projeto e posterior consentimento com o protocolo experimental.
- E, como critério de exclusão adotou-se:
 - Histórico de antibioticoterapia nos últimos três meses.
 - Histórico de terapia anti-inflamatória nos últimos três meses.
 - Doenças sistêmicas como: doenças de pele, doenças respiratórias, doenças renais ou hepáticas, doenças endócrinas, doenças autoimunes, neoplasia.
 - Realização de tratamento periodontal nos últimos três anos.
 - Histórico de vacinação nos últimos seis meses.

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

De acordo com os critérios pré-estabelecidos foram recrutados e tratados 58 pacientes. Todavia foram selecionadas para análise as amostras de 36 cães (n=36). Os

demais foram excluídos ao longo do estudo por alterações diversas que poderiam comprometer a veracidade das mensurações como: amostras de sangue com intensa lipemia ou hemólise, pacientes que apresentaram sintomas como êmese ou diarreia pós-operatória, pacientes que utilizaram medicações diferentes das prescritas e pacientes que não retornaram no período correto para coleta da segunda amostra de sangue.

Foram estabelecidos dois grupos: (A) pacientes com periodontite crônica antes do tratamento periodontal e (B) os mesmos pacientes, 21 dias após o tratamento periodontal. Foram também divididos de acordo com o grau de comprometimento da doença periodontal: grave, moderado e leve.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O paciente fez quatro visitas ao hospital veterinário:

- **Visita 1:** triagem do paciente, ciência do projeto de pesquisa e aceitação pelo proprietário. Exame clínico contendo o odontograma, coleta de sangue venoso (5ml) para avaliação pré-cirúrgica: hemograma completo com contagem de plaquetas, uréia, creatinina, alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Agendamento da avaliação cardiológica realizada na mesma instituição pelo serviço de Cardiologia da Clínica Médica.
- **Visita 2:** paciente em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de cinco horas. Coleta de sangue venoso para mensuração das citocinas antes da medicação pré-anestésica e posterior tratamento periodontal sob anestesia geral inalatória.
- **Visita 3:** acompanhamento pós-cirúrgico uma semana após o tratamento periodontal.
- **Visita 4:** reavaliação clínica e coleta de sangue venoso para mensuração das citocinas, após 3 semanas do tratamento periodontal.

4.2.1 Tratamento Periodontal

Os pacientes foram anestesiados pelo serviço de anestesiologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Hovet / FMVZ-USP). Sendo pré-medicados com acepromazina (0,05mg/Kg/SC) e meperidina (4mg/Kg/SC). Foi estabelecido acesso venoso periférico para fluidoterapia e medicação. A indução anestésica foi realizada com propofol (5mg/Kg/EV) e após a intubação oro-traqueal foram mantidos com isoflurano. O protocolo anestésico de alguns pacientes pode ter sofrido alterações de acordo com cada caso a critério do serviço de anestesiologia.

Após a estabilização anestésica foi iniciado o tratamento periodontal que consistiu nos seguintes passos:

- Antissepsia da cavidade oral com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%.
- Sondagem de todos os dentes, em todas as faces: mesial, distal, vestibular e lingual ou palatina, totalizando quatro mensurações por dente. Utilizou-se para tal, sonda periodontal milimetrada (Figura 2).
- Sondagem em região de furca de dentes multiradiculares (Figura 2).
- Classificação da doença periodontal em grave, moderada e leve (Figura 3).
- Avaliação do sangramento gengival à sondagem: presente ou ausente (Figura 2).
- Radiografia intraoral dos dentes com bolsa periodontal (Figura 4).
- Extração dos dentes que estavam com comprometimento periodontal grave e sutura com fio monofilamentar absorvível 4-0.
- Aplainamento radicular de dentes com bolsa periodontal.
- Nos casos de extração de dentes caninos superiores, realizou-se retalho mucogengival e sutura com fio monofilamentar absorvível 4-0 ou 5-0.
- Limpeza ou raspagem das superfícies dentárias com ultrassom dentário e curetas de Gracey.
- Polimento dos dentes com taça de borracha e pasta de polimento.

Figura 5 - Doença periodontal leve, moderada e grave

A - Visão lateral da cavidade oral de cão, com doença periodontal leve, B- Visão lateral da cavidade oral de cão com doença periodontal moderada, C Visão lateral da cavidade oral com doença periodontal grave.

Figura 6 - Sondagem gengival e região de furca dentária

A - Sondagem gengival com sonda periodontal milimetrada em face vestibular de dente quarto pré-molar inferior esquerdo. Nota-se sangramento à sondagem e bolsa periodontal de 5mm; B- Sondagem em face distal de dente canino superior esquerdo. Nota-se bolsa periodontal de 10mm; C- Sondagem em região de furca de dente quarto pré-molar inferior esquerdo. Nota-se furca grau III e exposição radicular.

Figura 7 - Doença periodontal grave e radiografia intraoral

A- Visão lateral da cavidade oral com doença periodontal grave, B- radiografia intraoral da região de dentes, segundo molar, primeiro molar, quarto pré-molar e terceiro pré-molar, inferiores direitos do mesmo cão (A). Nota-se perda óssea alveolar.

4.2.2 Classificação da doença periodontal

O exame periodontal da boca completa foi conduzido utilizando-se sonda periodontal milimetrada. A profundidade da sondagem foi mensurada da margem gengival até o fundo do sulco/bolsa periodontal em quatro sítios (face mesial, distal, vestibular e lingual/palatino) em cada dente, em todos os dentes presentes.

Considerou-se como:

- Doença grave: os pacientes que apresentaram bolsa periodontal maior que $\geq 6\text{mm}$ em pelo menos quatro sítios, evidência radiográfica de perda óssea alveolar, com ou sem sangramento à sondagem periodontal.
- Doença moderada: os pacientes que apresentaram bolsa periodontal de 4mm a 5mm em pelo menos quatro sítios, com perda óssea alveolar radiográfica, com ou sem sangramento à sondagem periodontal.
- Doença leve: os pacientes que apresentaram bolsa periodontal menor $\leq 3\text{mm}$, sem perda óssea e sangramento à sondagem gengival ou espontâneo.

4.3 PÓS-OPERATÓRIO

No pós-operatório imediato foram administrados os analgésicos dipirona (25mg/Kg), ou cloridrato de tramadol (2mg/Kg) e anti-inflamatório não esteroide: cetoprofeno (1mg/kg) ou meloxicam (0,1mg/Kg), pela via intravenosa.

Como prescrição foi solicitada higienização oral com digluconato de clorexedina 0,12% três vezes ao dia por sete dias, antibioticoterapia (metronidazol, 15mg/Kg/BID) por sete dias e dipirona (25mg/Kg/TID) por cinco dias, pela via oral.

4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os exames para avaliação pré-cirúrgica de hemograma, uréia, creatinina, alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) foram processados pelo laboratório clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ- USP.

Para mensuração das citocinas, as amostras de sangue foram coletadas em tubos com gel ativador e em seguida centrifugadas em centrífuga refrigerada em 4°C a 2500rpm durante 15 minutos. O soro foi armazenado em eppendorfs e mantido em freezer a -80°C para posterior mensuração.

A quantificação das interleucinas IL-6, IL-10, TNF- α foram realizadas utilizando-se kits comerciais CCYTOMAG 90K (Milliplex[®]) seguindo o protocolo padrão descrito pelo fabricante e a IL1- β , kits comerciais (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) – ELISA também de acordo com as instruções do fabricante, específicos para cão. Todos os testes foram realizados em duplicata. Exames realizados pelo Laboratório Genese, São Paulo.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo Departamento de Epidemiologia e Bioestatística da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para as análises foi utilizado o programa R Project for Statistical Computing 2.14.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Após a triagem inicial, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, passaram por tratamento periodontal 58 pacientes. Porém destes, 22 foram excluídos. Obtendo-se assim amostragem final de 36 cães (n=36).

Sob anestesia, durante exame clínico, os animais foram separados em grupos de acordo com a severidade da doença periodontal. O grupo de cães com doença periodontal grave foi composto por 24 cães, o grupo com doença periodontal moderada por nove cães e o grupo com doença periodontal leve foi composto por três cães. Todos os animais apresentavam doença crônica.

Os dados compilados dos 36 animais, ou seja, mensuração das interleucinas antes e depois do tratamento periodontal, sexo, idade, peso e gravidade da doença periodontal, estão dispostos em uma tabela em apêndice A.

5.1 AVALIAÇÃO DAS INTERLEUCINAS DE TODOS OS CÃES SEM SEPARAÇÃO POR GRUPOS.

Primeiramente foi realizada a análise descritiva dos dados. Posteriormente utilizou-se teste de Shapiro-Wilk para verificar se as amostras tinham aderência à distribuição normal. Como o resultado mostrou que os dados das variáveis não tinham distribuição normal, fez-se o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico utilizado para dados pareados) para comparar os grupos antes e depois do tratamento periodontal para todas as interleucinas propostas nos 36 cães (Apêndice B).

De acordo com o teste de Wilcoxon somente a IL-6 teve redução estatisticamente significativa ($p=0,02626$) após o tratamento periodontal. A IL-1 ($p=0,1397$) e o TNF ($p=0,1045$) não tiveram redução estatisticamente significativa. E a IL-10 ($p=0,5761$) teve leve aumento também não estatisticamente significativo.

Como média nos níveis séricos, obteve-se para a IL-6 antes do tratamento 363,4 pg/ml e 201,3 pg/ml após o tratamento. Para a IL-10 obteve-se média de 28,14 pg/ml antes do tratamento e 30,17 pg/ml após o tratamento. Para IL-1, 8,5pg/ml antes do tratamento e 20,1 pg/ml depois do tratamento. E para TNF, 72,2 pg/ml antes do tratamento e 51,1 pg/ml após o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal nos 36 cães. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	363.4 (726.6)	40.63	1.71 - 3389	3.618e-09
	Depois	201.3 (359.2)	43.66	1.71 - 1555	1.592-08
IL10	Antes	28.14 (86.9)	2.12	0.88 – 496.7	1.565e-11
	Depois	30.17 (86.7)	2.12	0.88 – 462.4	3.142e-11
IL1	Antes	8.5 (11.55)	5.7	1.5 – 72.9	1.313e-11
	Depois	20.1 (42.6)	5.7	3.2 – 175.3	4.516e-11
TNF	Antes	72.2 (118.6)	11.6	3.5 – 483.0	4.557e-08
	Depois	51.1 (73.7)	17.4	3.5 – 278.0	2.397e-07

¹. Teste de aderência à distribuição normal de Shapiro-Wilk

Os níveis das interleucinas podem ser observados nos gráfico 1.

Gráfico 1 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF em pg/ml, nos 36 cães. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL GRAVE, MODERADA E LEVE.

Por se tratar de mais de um grupo (grave, moderado e leve) e as variáveis não terem distribuição normal foi usado o teste de Kruskal-Wallis.

Através do teste constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com doença periodontal grave, moderada ou leve.

5.2.1 Grupo com doença periodontal grave

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk todas as variáveis tiveram valor de p menor a 0.05, portanto nenhuma teve distribuição normal no grupo com doença periodontal grave (Tabela 2).

No apêndice C, encontram-se os dados das mensurações desse grupo.

Tabela 2 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 24 cães com doença periodontal grave. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	456.5 (853.7)	61.56	1.71 – 3389.0	6.538e-07
	Depois	238.7 (420.9)	34.58	1.71 – 1555.0	1.252e-06
IL10	Antes	34.0 (103.21)	2.12	0.88 – 496.7	2.979e-09
	Depois	38.25 (104.9)	2.12	0.88 – 462.4	7.845e-09
IL1	Antes	9.53 (13.98)	5.7	1.58 – 72.97	2.74e-09
	Depois	19.73 (40.25)	5.7	5.7 – 175.3	8.485e-09
TNF	Antes	84.37 (133.25)	28.49	3.47 – 483.0	3.496e-06
	Depois	51.23 (80.31)	20.99	3.47 – 278.0	1.212e-06

¹. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk

Os níveis das interleucinas nos cães com doença periodontal grave podem ser vistos no gráfico 2.

Gráfico 2- Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF em pg/ml, dos cães com doença periodontal grave - FMVZ- USP. São Paulo, 2012

5.2.2 Avaliação do grupo de cães com doença periodontal moderada

No grupo de cães com doença periodontal moderada (Apêndice D), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk todas as variáveis tiveram valor de p menor a 0.05, portanto nenhuma teve distribuição normal, a exceção da IL-1 antes do tratamento (Tabela3).

Tabela 3 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 09 cães com doença periodontal moderada. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	136.0 (250.6)	15.12	1.71 – 772.7	0.00015
	Depois	104.7 (142.2)	45.2	1.71 – 432.4	0.01075
IL10	Antes	6.33 (13.6)	2.12	0.88 – 42.5	7.44e-07
	Depois	5.45 (9.57)	2.12	0.88 – 30.7	7.035e-06
IL1	Antes	6.94 (3.62)	5.7	1.50 – 14.71	0.0767
	Depois	7.05 (5.25)	5.7	3.2 - 20.9	7.673e-06
TNF	Antes	37.02 (64.9)	6.42	3.47 – 196.2	0.00014
	Depois	46.1 (53.2)	3.47	3.47 – 125	0.00663

¹. Teste de aderência à distribuição normal de Shapiro-Wilk

Os níveis das interleucinas nos cães com doença periodontal moderada podem ser observados no gráfico 3.

Gráfico 3 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF dos cães com doença periodontal moderada - FMVZ- USP. São Paulo, 2012

5.2.3 Avaliação do grupo de cães com doença periodontal leve

No grupo de cães com doença periodontal leve (Apêndice E), o teste de Shapiro-Wilk verificou que as variáveis tiveram valor de p menor a 0.05. Portanto, assim como no grupo de cães com doença periodontal grave e moderada, nenhuma variável teve distribuição normal no grupo de cães com doença periodontal leve (Tabela 4).

Tabela 4 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 03 cães com doença periodontal leve. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	300 (512.44)	6.64	1.71 – 891.8	0.0092
	Depois	192.3 (283.3)	57.2	1.71 – 517.9	0.1873
IL10	Antes	46.6 (78.23)	2.12	0.88 – 137.0	0.0151
	Depois	39.6 (66.1)	2.12	0.88 – 116.0	0.0179
IL1	Antes	5.53 (0.29)	5.7	5.19 – 5.70	3.615e-07
	Depois	62.2 (97.9)	5.7	5.7 - 175.3	3.615e-07
TNF	Antes	79.87 (132.2)	3.47	3.47 – 232.7	3.615e-07
	Depois	65.26 (96.2)	16.19	3.47 – 176.1	0.1263

¹. Teste de aderência à distribuição normal de Shapiro-Wilk

No gráfico 4 observam-se os níveis das interleucinas nos cães com doença periodontal leve.

Gráfico 4 - Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF, dos cães com doença periodontal leve - FMVZ-USP. São Paulo, 2012.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, os níveis de IL-6 ($p=0,584$), IL-10 ($p=0,5705$), IL-1 ($p=0,3408$) e TNF ($p=0,7214$) antes do tratamento periodontal foram iguais entre os grupos ($p>0.05$). E os níveis de IL-6 ($p=0,9397$), IL-10 ($p=0,7217$), IL-1 ($p=0,1672$) e TNF ($p=0,9256$) depois do tratamento periodontal também foram iguais entre os grupos ($p>0.05$).

5.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE A IL-10 E AS DEMAIS INTERLEUCINAS

Por terem sido mensuradas citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-1, TNF- α e a IL-10 como citocina anti-inflamatória. Fez-se a correlação entre elas. Por se tratar de dados sem distribuição normal foi usado o teste Spearman.

5.3.1 Comparação da IL-10 com a IL-6

Comparando-se a IL-6 a IL-10 conclui-se que não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,4037$), porém observou-se uma correlação negativa. Ou seja, quando uma aumenta a outra diminui (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Correlação da IL-10 com a IL-6 no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012

5.3.2 Correlação da IL-10 com a IL-1

Comparando-se a IL-1 a IL-10 conclui-se que não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,7345$), porém observou-se uma correlação positiva (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Correlação da IL-10 com a IL-1 no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012

5.3.3 Correlação da IL-10 com o TNF- α

Comparando-se a TNF- α a IL-10 com o valor de p maior a 0.05 ($p=0,1267$), conclui-se que não houve correlação estatisticamente significativa entre os grupos, porém observou-se correlação negativa (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Correlação da IL-10 com o TNF- α no grupo dos 36 cães. FMVZ – USP. São Paulo, 2012

No gráfico 8, pode-se e comparar a correlação da IL-10 com as demais interleucinas, IL-6, IL-1 e TNF.

**Gráfico 8 - Comparação nas correlações de IL-10 versus IL-6; IL-10 versus IL-1 e IL-10 versus TNF α .
FMVZ – USP. São Paulo, 2012**

5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASE

A coleta dos dados foi realizada em duas fases. Na primeira fase validaram-se as amostras de 28 cães (Apêndice F). E na segunda fase, oito cães (Apêndice G).

As alíquotas da primeira fase passaram por um episódio de descongelamento e congelamento, assim, comparou-se as amostras da primeira e segunda fase.

Como os dados eram independentes e não tiveram distribuição normal, utilizou-se o teste não paramétrico de U Mann Withney.

Obteve-se assim, diferença estatisticamente significativa nos valores das interleucinas, IL-6 ($p=0,00942$), IL-10 ($p=0,00993$) e TNF ($p=0,002021$) antes do tratamento periodontal, comparando a primeira e a segunda fase. Apenas na IL-1 ($p=0,2568$) não houve diferença estatística.

Na avaliação dos valores das interleucina após o tratamento periodontal, comparando-se a primeira à segunda fase, a IL-6 ($p=0,1021$) e a IL-1 ($p= 0.8661$) não

foram estatisticamente diferentes, porém, a IL-10 ($p=0,02015$) e o TNF ($p= 0.0267$) apresentaram diferença estatística.

5.4.1 Valores das amostras da primeira fase

Avaliaram-se as amostras dos 28 cães da primeira fase, independentemente da severidade da doença periodontal (Tabela 5).

Como o valor de $p \leq 0.05$, os dados desta variável não tiveram distribuição normal.

Tabela 5 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em 28 cães da primeira fase. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	310.8 (790.2)	16.6	1.71 – 3389.0	3.538e-09
	Depois	194.3 (395.9)	24.0	1.71 – 1555.0	3.719e-08
IL10	Antes	17.60 (37.3)	2.12	2.12 – 137.0	7.154e-09
	Depois	13.12 (28.2)	2.12	2.12 – 116.0	3.202e-09
IL1	Antes	8.79 (13.04)	5.7	1.5 – 72.9	3.359e-10
	Depois	18.2 (37.4)	5.7	3.2 – 175.3	1.222e-09
TNF	Antes	54.68 (121.9)	3.47	3.5 – 483.0	7.602e-09
	Depois	45.11 (77.7)	8.90	3.5 – 278.0	1.257e-07

¹. Teste de aderência à distribuição normal de Shapiro-Wilk

Gráfico 9 -. Boxplot dos níveis de IL-6, IL-10, IL-1 e TNF dos cães da primeira fase. FMVZ – USP. São Paulo, 2012

5.4.2 Valores das amostras da segunda fase

Avaliaram-se as amostras dos oito cães da segunda fase, independentemente da severidade da doença periodontal (Tabela 6).

Tabela 6 - Média, mediana, valores mínimos e máximos e teste de aderência à distribuição normal das interleucinas IL-6, IL-10, IL-1, TNF antes e depois do tratamento periodontal em oito cães da segunda fase. FMVZ-USP. São Paulo, 2012

Variável	Categoria	Media (dp)	Mediana	Min-max	Valor de p ¹
IL6	Antes	547.2 (425.9)	547.7	17.6 – 1183	0.4046
	Depois	226.0 (198.4)	170.5	3.57 – 517.9	0.3217
IL10	Antes	65.05 (174.5)	0.88	0.88 – 496.7	1.817e-06
	Depois	89.87 (173.9)	0.88	0.88 – 462.4	0.0001
IL1	Antes	7.66 (3.20)	6.1	5.18 – 14.72	0.012
	Depois	26.9 (59.9)	5.7	5.7 – 175.3	1.047e-06
TNF	Antes	133.3 (86.02)	133.3	28 – 232.8	0.046
	Depois	72.1 (56.9)	72.12	6.27 – 176.1	0.6014

¹. Teste de aderência à distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk)

Como o valor de $p \leq 0.05$, os dados destas variáveis não tiveram distribuição normal, a exceção da IL-6 e do TNF depois.

**Gráfico 10 - Boxplot dos níveis de IL-6 (1), IL-10 (2), IL-1 (3) e TNF (4) dos cães da segunda fase.
FMVZ – USP. São Paulo, 2012**

6 DISCUSSÃO

Nos cães em estudo foi evidenciado que no periodonto hígido o dente está inserido ao alvéolo dentário fixado por tecido conjuntivo, promovendo sustentação e juntamente com a gengiva, proteção. Permitindo aos dentes resistirem às forças de mastigação (EVANS, 1993; VERSTRAETE, 1999; TEM CATE, 2001; LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2005; CACHAPUZ, 2007; NEWMAN et al., 2007).

Contudo, a periodontite mostrou-se como uma doença infecciosa e inflamatória que acometeu os tecidos periodontais (CLICKMAN, 1979; HENNET; HARVEY, 1992; WIGGS; LOBPRISE, 1997; TEN CATE, 2001; GIOSO, 2007). Como os pacientes apresentavam doença crônica e, em sua maioria, em estado avançado, foi possível, por sondagem, notar a perda do tecido de aderência e a inflamação local. Através da radiografia intra-oral visibilizou-se a reabsorção do osso alveolar levando, clinicamente, à mobilidade dentária. Em alguns casos mais graves havia a perda espontânea do elemento dentário relatada pelo proprietário (EVANS, 1993; WIGGS; LOBPRISE, 1997; DALE, 2000; CACHAPUZ, 2007; GIOSO, 2007; NEWMAN et al., 2007).

Corroborar-se que o fator desencadeante da inflamação e reposta imune no hospedeiro é o acúmulo da placa dentária (ou biofilme) sobre a superfície dentária e no sulco gengival (HARVEY; EMILY, 1993; WEILDLICH, 2001; GORREL, 2004; LINDHE; LANG; KARRING, 2005). E, apesar de não ter sido feita essa avaliação, que o biofilme é uma comunidade organizada e estruturada de colônias bacterianas imersas em uma matriz composta de diversos constituintes (CONSTERTON et al., 1994; MARSCH, 2004) tornando-se um ambiente ideal aos microrganismos nela residentes pelo seus sistemas de defesa ao hospedeiro e à outras substâncias como, por exemplo, os antimicrobianos (BRYERS, 1993; SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002; MARSCH, 2003; MARSH; MARTIM, 2005).

Concorda-se que a gengivite e a periodontite são processos distintos e que o biofilme supragengival difere-se do subgengival. Concorda-se que a progressão da gengivite pela não remoção do agente causador, o biofilme, pode levar à periodontite, principalmente quando o sistema imune do hospedeiro não é competente (MARIOTTI,

1999; KINANE; ATTSTRÖM, 2005). E que a resposta inflamatória crônica torna-se maléfica ao liberar mediadores que acabam por destruir as estruturas periodontais (HARVEY; EMILY, 1993; WEILDLICH, 2001; CAFFESSE et al., 2002; LINDHE; LANG; KARRING, 2005; GIOSO, 2007).

De frente aos resultados com tantas variações nos níveis das interleucinas entre os indivíduos, acorda-se com as citações que afirmam que a doença periodontal é multifatorial e complexa (LINDHE; LANG; KARRING, 2005; MARTINS; MARTINS, 2007; NEWMAN ET AL., 2007). Que sua evolução acontece pelo desequilíbrio imune e inflamatório do hospedeiro frente aos microrganismos ou seus metabólitos. (KINANE; LOWE, 2000; WEILDLICH, 2001; NEWMAN ET AL., 2007; BILATE, 2007). Pode-se observar que um dos cães com doença periodontal classificada como leve teve altos níveis de IL-6 e TNF quando comparado aos animais com doença grave. A regulação do sistema imune pode ser a resposta para esses achados. Ainda acredita-se que mais estudos devam ser feitos a respeito da contribuição genética para a competência do sistema imune de cada indivíduo (MOURINHA et al., 2011).

Quanto as respostas imunes, aceita-se que a doença periodontal seja deflagrada pela sistema imune inato e que em curto prazo sejam observados componentes do sistema imune adaptativo. Apesar do presente trabalho não contar com avaliação histológica, uma grande diversidade de autores descrevem e ilustram essa situação (HOBERHOLZSER et al., 2000; SHI et al., 2001; AYALA et al., 2003 BOCHOUD; CALANDRA, 2003; HEEP; DALPKE, 2003; JANEWAY et al., 2007). Concorde-se com o mecanismo de resposta inflamatória e imune proposto pelos autores (HALLIWELL; GITTERIGDE, 1993; ROTHLEIN, 1997; OGURA et al., 1999; BAKER, 2001; DOMEJI et al., 2002; SGARBI et al., 2006) e sobre a resposta imune da gengivite e periodontite onde, histologicamente, há um grande infiltrado de PMNs que desencadeia o processo inflamatório e que, pode ser notado clinicamente, através do edema gengival, aumento do sangramento local (vasodilatação) e até destruição da estrutura gengival (GEMMEL et al., 2002; CUTLER; JOTWANI, 2004; MARSHAL, 2004; SEYMOUR; DIXON et al., 2004; TAYLOR, 2004; NANJI; BOSSHARD, 2006; SCHENKEIN, 2006; MAHANONDA; PICHYANGKUL, 2007).

Como os pacientes foram acompanhados por pelo menos 40 dias e estes fizeram ao menos quatro visitas ao hospital, pode-se observar que a doença periodontal

apresentava fases ativas e de latência (PAGE et al., 1997; MARTINS; MARTINS, 2007; NEWMAN et al., 2007), sendo esse comportamento também um possível responsável para a grande variação nos valores das interleucinas encontradas entre os indivíduos estudados, visto que não há como detectar em qual condição está a doença.

Atentou-se para regiões com gengivite onde o órgão dental apresentou acúmulo de cálculo, porém sem perda de estrutura periodontal e que logo após o tratamento, em questão de horas, já era notável a diminuição da hiperemia e edema da gengiva na região. Concorde-se assim, que a remoção do agente, biofilme ou cálculo dentário, cessa o processo de agressão aos tecidos subjacentes e interrompe a progressão da gengivite (GEMMEL et al., 2002; DIXON et al., 2004; BAROLD; NARAYANAN, 2006; KINANE et al., 2006).

Sabe-se que o sistema imune é responsável pela proteção contra invasão de microrganismos (HEEG; DALPKE, 2003) e pela ativação e regulação de respostas para seu combate (BOCHUD; CALANDRA, 2003). Reduzindo a probabilidade de infecção secundária ou oportunista (HOBERHOLZSER et al., 2000; AYLÀ et al., 2003). Portanto, na cavidade oral, pela presença da placa bacteriana, há constante estímulo ao sistema imune. Nesse contexto os PMNs exercem papel fundamental iniciando e direcionando a resposta imune (OGURA et al., 1999, SHI et al., 2001; JANEWAY et al., 2007).

Observa-se nos dentes com acúmulo de placa e cálculo dentário, gengivite. Reconhece-se portanto, que a inflamação é uma resposta do sistema imune frente a agressões aos tecidos. E que esse evento é fundamental para a remodelação das injúrias teciduais e controle de agentes infecciosos. Mas que, quando de forma exacerbada causa repercussões sistêmicas prejudiciais ao organismo do hospedeiro (SENFTLEN; KARIN, 2002; TIZARD, 2002).

O presente estudo baseou-se nos vários trabalhos recentes que mensuram mediadores inflamatórios, como as citocinas, com intuito de avaliar a repercussão sistêmica de diversas doenças, inclusive a doença periodontal (DINARELLO, 2000; GRAVES; COCHRAN, 2003; DELALEU; BICKEL, 2004). Sugerem-se mais pesquisas na área da odontologia veterinária, pois acredita-se que muitos colegas negligenciam a doença periodontal por não conhecerem sua devida importância e suas repercussões sistêmicas.

As citocinas são proteínas produzidas em resposta a vários estímulos, entre eles a agressão tecidual (KIM; DEUTSCHMAN, 2000; CUNNEEN. CARTWHRIGHT, 2004). Assim como ocorre nas periodontites graves, onde diversas bolsas periodontais, representam extensa lesão tecidual.

Como pôde-se notar nos pacientes em que as interleucinas apresentaram nível mínimo detectável durante as mensurações, a concentração das citocinas em pacientes saudáveis é muito baixa ou indetectável (HACK et al. 1997; ABBAS et al., 2000; NETEA et al., 2003). Sugerindo que mesmo na presença de uma doença infecciosa a resposta dependerá da competência do sistema imune do hospedeiro em, desenvolver ou não, quadro inflamatório exacerbado.

No grupo das citocinas encontram-se as interleucinas que tem ação preponderante no local da inflamação, porém podem passar a corrente sanguínea e ter ação sistêmica. Como na doença periodontal sabe-se que há o aumento das interleucinas localmente (PAGE et al., 1997; BAKER et al., 2001; DOMEJI et al., 2002; BAROLD; NARAYANNAN, 2006) induzindo a destruição das estruturas periodontais, o intuito desse estudo foi avaliar se, nos cães com periodontite crônica, elas aumentam sistemicamente, o que pode trazer danos orgânicos ao paciente.

Nesse trabalho foram mensuradas algumas das interleucinas mais estudadas e conhecidas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α (LARRICK; KUNKEL, 1988; SPOONER et al., 1992; MOLDAWER; COPELAND, 1997; MIRE-SLUIS; THORPE, 1998; BENJAMIN, 2001; MORURA et al, 2001; GIANNOUDIS et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005; PAIZAN E MARTIM, 2009) todavia acredita-se na importância de estudar também outras interleucinas. Obtendo-se um quadro geral mais completo, para melhorar a compreensão de como a doença atua e repercute.

Os biomarcadores sistêmicos da inflamação (LOOS, 2005; SCHIEFER; CARVALHO, 2008; LAKS, 2010) são bons parâmetros para se avaliar a repercussão das doenças (DESTEFANO et al., 1996; MATILLA et al., 1995; BECK et al, 1996; GEERTS et al. 2002; JOSHIPURA, 2004; RIDKER; SILVERTOWN, 2008, 2008; FOZ et al., 2010), contudo de acordo com o estudo acredita-se que na periodontite, devam ser usados como referências individuais, fazendo o acompanhamento do paciente durante seu tratamento

obtendo-se assim um adequado prognóstico. Porém não se deve compará-las entre indivíduos. Ou ainda entre indivíduos com doenças diferentes.

Corroborar-se com os diversos estudos que sugerem a correlação entre a doença periodontal e alterações sistêmicas (DE BOWES, et al., 1996; MEALEY et al., 2003; DELIARGYRIS et al., 2004; FELICE et al., 2005; LINDEN et al., 2008; NIEDZIELSKA et al., 2008; HIGASHI et al., 2008; NAVES et al., 2008). No entanto, o objetivo das diversas pesquisas é desvendar como a doença periodontal causa influência sistêmica. Portanto, concorda-se com o conceito da existência de bacteremia constante durante mastigação e escovação dentária em pacientes com doença periodontal crônica, gerando endotoxemia subclínica. E o consequente estímulo contínuo ao sistema imune do hospedeiro (WIEDERMANN et al., 1999; KIECHI et al., 2001; BUHLIN et al., 2003). O que desencadeia processo inflamatório, foco da atual pesquisa.

Assim como Dáito et al. (2004), Sun et al. (2009) e Higashi et al. (2008), pode-se observar aumento dos níveis IL-6 em pacientes com doença periodontal. Todavia, o presente estudo não encontrou aumento sérico do TNF como Iwamoto et al. (2003); e Yamazaki et al. (2005) que não obteve aumento sérico de IL-6 e TNF em pacientes com periodontite, apenas a PCR estava elevada. Já Ide et al. (2003) não encontrou aumento para nenhuma das proteínas testadas, IL-6, IL-1 e TNF.

Assim como no estudo de Rawlison et al. (2011) a severidade da doença periodontal não foi determinante. Portanto mesmo em cães com doença leve (Apêndice E) pode-se ter grande repercussão sistêmica.

No presente trabalho a profundidade da bolsa foi um dos critérios de avaliação. No contexto de foco infeccioso, a bolsa periodontal tem relevância sobre o nível clínico de inserção (NCI). Mesmo quando há grande perda do NCI pode haver retração gengival e ausência de bolsa periodontal, não constituindo um sítio infeccioso importante.

Embora somente a IL-6 tenha apresentado resultados estatisticamente significativos, se forem comparados os níveis encontrados das interleucinas nos cães com doença periodontal, com outras afecções, nota-se que a mesma causa grande resposta sistêmica ((KJELGAARD-HANSEN et al., 2005). Assim como no trabalho de Martins (2009) onde a IL-6 em cães com tumores orais apresentou médias de IL-6 séricos menores que o presente estudo. Ainda ao comparar os resultados obtidos com os valores médios de

quadros sistêmicos graves como a SIRS e piometra (FRANSSON et al., 2007), e alterações hepáticas (NEUMAN; KAUP; SCHEULEN, 2010) concluiu-se que a periodontite pode ter grande repercussão sistêmica.

No presente trabalho os resultados foram obtidos em duas etapas. Na primeira fase foram selecionadas amostras de 28 cães, processadas e armazenadas a -80°C. As amostras foram mensuradas todas juntas, pois quando o kit é aberto deve ser inteiramente utilizado. Nesse período de armazenamento, houve um episódio de descongelamento das amostras, o que não as invalida, porém é contra indicado. Após as análises apresentarem grande variação dos resultados entre os indivíduos optou-se por novas coletas para descartar algum erro laboratorial, do kit, de triagem, ou pelo episódio de descongelamento das mesmas.

Na segunda etapa houve acurada triagem dos pacientes e de toda metodologia até o armazenamento das amostras. Padronizou-se o operador para a centrifugação e armazenamento, e não houve nenhum descongelamento. Foram tratados mais 15 cães, porém consideraram-se válidas as amostras de apenas de oito cães.

Na comparação entre os cães da primeira e segunda fase, houve diferença estatística nos valores das interleucinas, propondo que o descongelamento das alíquotas pode afetar o nível das interleucinas.

Esperava-se neste estudo encontrar níveis mais altos das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF) antes do tratamento periodontal quando comparadas após o tratamento. No entanto, a disparidade dos resultados apresentados entre os indivíduos em todas as interleucinas mensuradas sugere alguns questionamentos que possam ter representado limitações ao estudo.

Sugere-se que isto tenha ocorrido, pois a doença periodontal depende muito, dentre outros fatores, da imunidade individual.

Acredita-se que a fase ativa e inativa desta doença exerça grande influência sobre os níveis destas interleucinas.

No pós-operatório todos os animais responderam positivamente ao tratamento periodontal, sendo notado melhora na condição oral, como redução da gengivite. Porém devido a necessidade da anestesia geral, não pôde-se avaliar se houve regressão das bolsas periodontais.

Questiona-se se o descongelamento das alíquotas possa ter interferido nos resultados da primeira fase.

E finalmente, questiona-se a veracidade de fatos fornecidos pelos proprietários na primeira fase. Muitos proprietários quando chegavam ao Laboratório de Odontologia Comparada (LOC) encaminhados por outros setores do hospital, já sabiam de alguns critérios de exclusão como: uso de antibiótico e anti-inflamatório prévio e ausência de outra doença sistêmica concomitante. Acredita-se que possa ter ocorrido omissão destes fatos pelo proprietário para inclusão do paciente no grupo de estudos visto que os clientes, de modo geral, são de situação sócio econômica baixa e neste estudo há a isenção da taxa do tratamento periodontal. E ainda os pacientes que se encaixavam no estudo eram atendidos mais prontamente visto que a agenda do LOC tem uma espera média de 60 dias. Esses fatores podem ter caracterizado erro de triagem dos pacientes para o estudo.

Sobre os diversos animais excluídos do experimento, na triagem inicial chamou atenção o grande número de pacientes que chegaram fazendo uso de antibiótico ou anti-inflamatório (o que gera outra discussão sobre o uso indiscriminado destas medicações). Surpreenderam proprietários que mesmo cientes do projeto de pesquisa e concessão através da assinatura do “termo de ética”, não voltaram para a segunda colheita de sangue. E surpreendeu o elevado número de animais que apresentaram intensa lipemia mesmo estando em jejum alimentar de 12 horas.

Acredita-se que este trabalho tem grande importância para o estudo da doença periodontal em cães. Puderam-se observar dados que até então eram inexistentes na literatura e que revelam resultados inesperados. A elevada média das interleucinas pró-inflamatórias mostra quão importante é a repercussão da doença periodontal no contexto sistêmico e a grande variação dos resultados leva a pensar sobre as grandes e possíveis influências para a suscetibilidade individual dessa doença que acomete em torno de 80% dos animais acima de quatro anos de idade.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Apenas a IL-6 teve diferença (redução) estatística após o tratamento periodontal. As interleucinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α sofreram alteração, porém, não foram estatisticamente significativas.

O grau de severidade da doença periodontal não teve influência sobre os níveis séricos das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α .

Os altos níveis séricos das interleucinas pró-inflamatória em alguns pacientes chama atenção para um importante comprometimento sistêmico

A variação entre indivíduos nos valores séricos das interleucinas mostra que a doença periodontal é complexa e multifatorial, sendo importante a realização de mais estudos para a compreensão da etiopatogenia dessa doença que apresenta alta ocorrência nos cães.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citokines. In: _____. **Cellular and molecular immunology**, 5.ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 243-74.
- AKAMINE, N.; DERNANDES, C. J.; WEY, S. B.; KNOBEL, E. Choque séptico e mecanismos de agressão tecidual. In: **Manual de terapia intensiva**, 2ed. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 18-46.
- ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontology 2000**, v. 29, p. 7-10, 2002.
- AYALA, A.; CHUNG, C. S.; GRUTKOSKI, P. S.; SONG, G. Y. Mechanisms of immune resolution. **Crit Care Med**, 31, p. 558-71, 2003.
- BAKER, P. J.; GARNEAU, J.; HOWE, L.; ROOPENIAN, D. C. T-cell contributions to alveolar bone loss in response to oral infection with *Porphyromonas gingivalis* **Acta Odontologica Scandinavica**, Aug; v. 59, n. 4, p. 222-5, 2001.
- BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 29-49, 2006.
- BECK, J.; GARCIA, R.; HEISS, G.; VOKONAS, P. S.; OFFENBACHER, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **Journal Periodontal**, v. 67, p. 1123-1137, 1996.
- BENJAMIN, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: **Medicina Intensiva**, v. 34, p. 18-26, jan./mar, 2001.
- BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia**, v. 8, n. 2, junho 2007.
- BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Pathogeneses of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ**, 326, p. 262-66, 2003.

BOWERSOCK, T. L.; WU, C. C.; INSKEEP, G. A.; et al. Prevention of bacteremia in dogs undergoing dental scaling by prior administration of oral clindamycin and chlorhexidine oral rinse. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.17, p. 11–16, 2000.

BRYERS, J. D. Bacterial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, n. 2, 197-204, 1993.

BUHLIN, K.; GUSTAFSSON, A.; POCKLEY, A. G.; FROSTEGARD, J.; KLINGE, B. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. **European Heart Journal**, v. 24, p. 2099-2107, 2003.

CACHAPUZ, P. F. Anatomia do periodonto. In: BRUNETTI, M. C.; FERNANDES, M. I.; MORAES, R. G. B. **Fundamentos da periodontia: Teoria e Prática**. Ed. Artes Médicas. Sao Paulo, 2007. p. 1-21.

CAFFESSE, R. G.; DE LA ROSA, M.; MOTA, L. F. Regeneration of soft and hard tissue periodontal defects. **American Journal of Dentistry**, v. 15, n. 5, p. 339-45, 2002.

CALANDRA, T.; GERAIN, J.; HEUMMAN, D.; BAUMGARTNER, J. D.; GLAUSER, M. P. High circulation levels of interleukin 6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 23-29, 1991.

CALL, D. R.; NEMZEK, J. A.; EBONG, S. J.; BOLGOS, G. L.; NEWCOMB, D. E.; REMICK, D. G. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p. 715-21, 2001.

CALVERT, C. A.; GREENE, D. E. Bacteremia in dogs: diagnosis, treatment, and prognosis. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian**; v. 8, p. 179–186, 1986.

CONSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137-42, 1994.

CONSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, 1999.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **American Association of Critical-care Nurses, Clinical Issue** 15, p. 18-44, 2004.

CUTLER, C. W.; JOTWANI, R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 35, p. 135–157, 2004.

D'AIUTO, F.; PARKAR, M.; ANDREOU, G.; SUVAN, J.; BRETT, P. M.; READY, D.; TONETTI, M. S. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **Journal of Dental Research**. Feb, v. 83, n. 2, p. 156-60, 2004.

DALE, B. A. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease, **Periodontology** 2000, v. 30, 70, 2002.

DEBOWES, L. J.; MOSIER, D.; LOGAN, E.; et al. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 13, p. 57–60, 1996.

DELALEU, N.; BICKEL, M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. **Periodontology** 2000, 35, p. 42-52, 2004.

DELIARGYRIS, E. N.; MADIANOS, P. N.; KADOMA, W.; et al. Periodontal disease in patients with acute myocardial infarction: prevalence and contribution to elevated C-reactive protein levels. **American Heart Journal**, v. 147, p. 1005–1009, 2004.

DESTEFANO, F.; ANDA, R. F.; KAHN, H. S.; WILLIAMSON, D. F.; RUSSEL, C. M. Dental disease and cardiovascular disease. **Journal of Periodontology**, 67, p. 1123-1137, 1996.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines. **Chest**, 118, p. 503-8, 2000.

DIXON, D. R.; BAINBRIDGE, B. W.; DARVEAU, R. P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. **Periodontology** 2000, v. 35, n. 1, p. 53–74, June 2004.

DOMIJJ, H.; YUCEL-LINDBERG, T.; MODEER, T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, 110, p. 302-306, 2002.

DORN, B. R.; DUNN, W. A. JR.; PROGULSKE-FOX, A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. **Infection Immunity**, v. 67, p. 5792-98, 1999.

EVANS, H. E. **Miller's Anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1993. 1113 p.

FELICE, P.; PELLICCIONI, G. A.; CHECCHI, L. Periodontal disease as a risk factor in pregnancy. **Minerva Stomatology**, v. 54, p. 255-264. 2005

FOZ, M. A.; ROMITO, A.; BISPO, C. M.; PETRILLO, C. L.; PATEL, K.; SUVAN, J.; D'AIUTO, F. Periodontal therapy and biomarkers related to cardiovascular risk. **Minerva Stomatology**, v. 59, p. 271-283, 2010.

GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; HART, D. N.; DRYSDALE, K. E.; SEYMOUR, G. J. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. **Oral Microbiology and Immunology**, Dec; v. 17, n.6, p. 388-93, 2002.

GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; SEYMOUR, G. J. Mast cells in human periodontal disease. **Journal of dental Research**. v. 83, n. 5, p. 384-7, may 2004.

GEERTS, S. O.; NYS, M.; DE, M. P.; CHARPENTIER, J.; ALBERT, A.; LEGRAND, V.; ROMPEN, E. H. Sistemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. **Journal of Periodontology**, v. 73, p. 73-78l, 2002.

GIANNOUDIS, P. V.; HILDEBRAND, F.; PAPE, H. C. Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome? **Journal Bone Joint Surgery Britsh**, v. 86, n. 3, p. 313-23, Review 2004.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 6 ed, São Paulo: ieditora, 2007, p.201.

GLICKMAN, L. T.; GLICKMAN, N. W.; MOORE, G. E.; GOLDSTEIN, G. S.; LEWIS, H. B. Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 234: 486-494, 2009.

GLICKMAN, L. T.; GLICKMAN, N. W.; MOORE, G. E.; LUND, E. M.; LANTZ, G. C.; PRESSLER, B. M. Association of chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. **Preventive Medicine**, 99: 193-200, 2011.

GLICKMAN. **Periodontia Clínica**, 5ed, ed. Guanabara, 1979.

GORREL, C. Veterinary dentistry for the general practioners, London: Elsevier, 2004. 216 p.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, Mar, v. 74, n. 3, p. 391-401, 2003.

HACK, C. E.; DE GROOT, E. R.; FELT-BERSMA, R. J.; NUIJENS, J. H.; STRACK VAN SCHIJNDEL, R. J.; EEREMBERG-BELMER, A. J.; THIJS, L. G.; AARDEN, L. A. Increasead plasma levels of interleukin 6 in sepsis. **Blood**, 74: 1704-10, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, Oxford: Clarendon Press, 1993, p 543.

HARVEY, C. E.; EMILY, P. P. **Small animal dentistry**, 1. ed., St. Louis: Ed. Mosby, 1993, p. 413.

HEEG, K.; DALPKE, A. TLR induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity. **Vaccine**, 21, p. 61-7, 2003.

HENNET, P. R.; HARVEY, C. E. Natural development of periodontal disease in the dog: a review of clinical, anatomical and histological features. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 13-9, 1992.

HERBERT, J. C.; O'REALLY; BEDNAR, M. Modifying the host response to injury. The future of trauma care. **Surgical Clinics of North America**, v. 75, p. 335-49, 1995.

HIGASHI Y.; GOTO, C.; JITSUIKI, D.; UMEMURA, T.; NISHIOKA, K.; HIDAKA, T.; TAKEMOTO, H.; NAKAMURA, S.; SOGA, J.; CHAYAMA, K.; YOSHIZUMI, M.; TAGUCHI, A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**. Feb, v. 51, n. 2, p. 446-53, 2008.

IDE, M.; MCPARTLIN, D.; COWARD, P. Y.; CROOK, M.; LUMB, P.; WILSON, R. F. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. **Journal of Clinical Periodontology**; v. 30, p. 334–340, 2003.

IWAMOTO, Y.; NISHIMURA, F.; SOGA, Y.; TAKEUCHI, K.; KURIHARA, M.; TAKASHIBA, S.; MURAYAMA, Y. Antimicrobial periodontal treatment decreases serum c-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, 74, p. 1231-1236, 2003.

IWAMOTO, Y.; NISHIMURA, F.; NAKAGAWA, M.; SUGIMOTO, H.; SHIKATA, K.; MAKINO, H.; FUKUDA, T.; TSUJI, T.; IWAMOTO, M.; MURAYAMA, Y. The Effect of Antimicrobial Periodontal Treatment on Circulating Tumor Necrosis Factor-Alpha and Glycated Hemoglobin Level in Patients With Type 2 Diabetes. **Journal of Periodontology**, June, v. 72, n. 6, p. 774-778, 2001.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JOSHUPURA, K. J.; WAND, H. C.; MERCHANT, A. T.; RIMM, E. B. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. **Journal of Dental Research**, v. 83, p. 151-155, 2004.

KIECHI, S.; EGGER, G.; MAYR, M.; WIEDERMANN, C. J.; BONORA, E.; OBERHOLLENZER, F.; MUGGIO, M.; XU, Q.; WICK, G.; POEWE, W.; WILLEIT, J. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis. **Circulation**, v. 103, p. 1064-70. 2001.

KIM, P. H.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **Surgical Clinics North America**, 80: 885-94, 2000.

KINANE, D. F.; ATTSTROM, R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 130-1, 2005. Supplement, 6.

KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontol Scand**, Jun, v. 59, n. 3, p. 154-60, 2001.

KINANE, D. F.; LOWE, G. D. O. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. **Periodontology** 2000, v. 23, p. 121-126, 2000.

KJELGAARD-HANSEN; M.; LUNTANG-JENSEN, M.; JAKOB, W.; JENSEN, L.A. Measurement of serum interleukin-10 in the dog. **The Veterinary Journal** 173 p. 361–365, 2007.

KOZAROV, E.; SWEIER, D.; SHELBURNE, C.; PROGULSKE-FOX, A.; LOPATIN, D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. **Microbes Infection**, v. 8, p. 687-93, 2006.

LAKS, D. **Ferritina como marcador de resposta inflamatória sistêmica em crianças criticamente doentes**. 2010.102 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

LARRICK, J. W.; KUNKE, S. L. Tumor of role necrosis factor and interleukin-1 in the immunoinflammatory response. **Pharmacological Research**, v. 5, p. 129-39, 1988.

LINDEN, G. J.; MCCLEAN, K.; YOUNG, I.; EVANS, A.; KEE, F. Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. Sep, v. 35, n. 9, p. 741-7, 2008

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAÚJO, M. Anatomia do Periodonto. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Guanabara Koogan, 4ªed., cap.1, 2005. p. 3-46.

LINDHE, J.; LANG, N.; KARRING, T. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 5 ed., v. 1. Blackwell Munksgaard, 2008.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LÖE, H.; THEILAD, E.; BORGLUM, J. S. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v. 36, p. 177-87, 1965.

LOISA, P.; RINNE, T.; LAINE, S.; HURME, M.; KAUKINEN, S. Anti inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. **Acta Anesthesiologica Scandinavica**, v. 47, p. 319-25, 2003.

LOOS, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. **Periodontology**, 76: 2106-2115, 2005.

MADEIRA, M.C. **Anatomia do dente**, 4ed. Revisada, São Paulo: Savier, 2004. 128p.

MAHANONDA, R.; PICHYANGKUL, S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. **Periodontology** 2000, v. 43, p. 41-55, 2007.

MARIOTTI, A. Dental plaque I induced gingival diseases. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 7-19, 1999.

MARSH, P. D. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub and supragingival environment. **Oral Dis**, v. 9, p. 16-22, 2003. Supplement, 1.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. Dental Plaque. In: _____. **Microbiologia Oral**. São Paulo: Editora Santos, 2005. p. 58-81.

MARSHALL, R. I. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. **Periodontology** 2000, v. 35,n. 1, p. 14–20, June 2004.

MARTINS, T. L. Estudo comparativo entre tramadol e codeína no controle da dor pós-operatória em cães submetidos a procedimentos cirúrgicos odontológicos. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Anestesiologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARTINS, M. D.; MARTINS, M. A. T. Etiopatogênese da Doença periodontal. In: BRUNETTI, M.C.; FERNANDES, M.I.; MORAES, R. G. B. **Fundamentos da periodontia: Teoria e Prática**. Ed. Artes Médicas. Sao Paulo, 2007. p. 37-52.

MATTILA, K. J.; VALTONEN, V. V.; NIEMINEN, M.; HUTTUNEN, J. K. Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. **Clinical Infectious Disease** Mar, v. 20, n. 3, p. 588-92, 1995.

MEALEY, B. L.; RETHMAN, M. P. Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. **Dent Today**, v. 22, p. 107–113. 2003.

MIRE-SLUIS, A. R.; THORPE, R. **Cytokines**. Academic Press. 1998.

MOLDAWER, L. L.; COPELAND, E. M. Proinflammatory cytokines, nutritional support and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. **Cancer**, v. 79, n. 9, p. 1828-39, Review 1997.

MORINHA, F.; ALBUQUERQUE, C.; REQUICHA, J.; DIAS, I.; LEITÃO, J.; GUT, I.; GUEDES-PINTO, H.; VIEGAS, C.; BASTOS, E. Detection and characterization of interleukin -6 gene variants in *Canis familiares*: Association studies with pweriodontal disease. **Gen**, v. 485, p. 139-145, 2011.

MOURA, H.V., POMERANTZEFF P. M. A., GOMES W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, n. 4, p. 376-87, 2001.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 11-28, 2006.

NAVES, R. C.; FREITAS, C. O. T.; BARBOSA, M. D. S.; TUNES, U. R.; COSTA, T. D.; VIEIRA, T. S. Comportamento da proteína C reativa em pacientes com doença periodontal. **Revista de Periodontia**, v. 18, n. 3, set 2008.

NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B. J. Pro inflammatory citokines and sepsis syndrome: not enough or too much for a good thing? **Trends Immunology**, v. 24, p. 254-58, 2003.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H.H.; KLOKKEVOLD, P.R.; CARRANZA, F. A. **Carranza, Periodontia Clinica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 1286p.

NEUMANN, S.; KAUP, F. J.; SCHEULEN, S. Interleukin-6 (IL-6) serum concentrations in dogs with hepatitis and hepatic tumours compared with those with extra-hepatic inflammation and tumours. **Comparative Clinical Pathology**. DOI 10.1007/s00580-010-1126-y, 2010.

NIEDZIELSKA, I.; JANIC, T.; CIERPKA, S.; SWIETOCHOWSKA, E. The effect of chronic periodontitis on the development of atherosclerosis: review of the literature. **Medical Science Monitor**, Jul, v. 14, n. 7, p. 103-6, 2008.

NIEVES, M. A.; HARTWIG, P.; KINYON, O. A. M.; RIEDESEL, D. H. Bacterial Isolates From Plaque and From Blood During and After Routine Dental Procedures in Dogs. **Veterinary Surgery**, v. 26, p. 26-32, 1997.

NOACK, B.; GENCO, R. J.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; ZAMBON, J. J.; DE NARDIN, E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **Journal of Periodontology**, Sep, v. 72, n. 9, p. 1221-7, 2001.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Citokine signaling-response of the immune response in normal and critically ill states. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 3-12, 2000.

OGURA, H.; TANAKA, H.; KOH, T.; HASHIGUCHI, N.; KUWAGATA, Y.; HOSOTSUBO, H.; SHIMAZU, T.; SUGIMOTO, H. Priming, second-hit priming and apoptosis in leukocytes in trauma patients. **Journal of Trauma**, v. 46, p. 774-8, 1999.

PAGE, R. C.; SCHRÖEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current works. **Laboratory investigation**, v. 34, n. 3, p. 235-49, 1976.

PAIVA, M.L.; MARTIM, J. F. V. Associação entre doença periodontal, doença vascular e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.16, n. 3, p. 183-185, 2009.

PAIZAN, M. L.; MARTIN, J. F. V. Associação entre doença periodontal, doença cardiovascular e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.16, n.3, p.183-185, 2009.

PAVLICA Z, PETELIN M, JUNTES P, ERZEN D, CROSSLEY DA, SKALERIC U. Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, Jun, v. 25, n. 2, p. 97-105, 2008.

PEJCIC, A.; KESIC, L. J.; MILASIN, J. C-reactive protein as a systemic marker of inflammation in periodontitis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, p. 407-414, 2011.

PUSSINEM, J. P.; TUOMISTO, K.; JOUSILAHTI, P.; HAVULINNA, A. S.; SUNDVALL, J.; SALOMAA, V. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 1433-1439, 2007.

RAMIERZ, J. H.; ARCE, R. M.; CONTRERAS, A. Periodontal treatment effects on endothelial function and cardiovascular disease biomarkers in subjects with chronic periodontitis: protocol for a randomized clinical trial. **Trials**, v. 12, p. 46, 2011.

RAWLINSON, J. E.; GOLDSTEIN, R. E.; REITER, A. M.; ATTWATER, D. Z.; HARVEY, C. E. Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. **J Am Vet Med Assoc**. Mar 1, v. 238, n. 5, p. 601-9, 2011.

RIDKER, P. M.; SILVERTOWN, J.D.; Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1544-51, 2008.

ROGOSA, M.; HAMPP, E. G.; NEVIN, T. A.; et al. Blood sampling and cultural studies in the detection of postoperative bacteremias. **Journal of American Dentistry Association**, v. 60, p. 171–178, 1960.

ROTHLEIN, R. Overview of leukocyte adhesion. **Neurology**, v. 49, n. 5, p. 3-4, Review, 1997. Supplement, 4

SAN ROMAN, F. **Atlas de odontologia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1999. 285p.

SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, R. B.; PAJU, S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. **Annals of Periodontology**, v. 8, p. 38-49, 2003.

SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease **Periodontology** 2000, v. 40, n. 1, p. 77–93, February 2006.

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em Medicina. **Gazeta Médica da Bahia**;v. 78, p. 47-51, 2008, Supplement 1.

SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. THE IKK/NF- Kappa B pathway. **Critical Care Medicine**, v. 30, p. 18-26, 2002.

SEYMOUR, G. J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here. **Acta Odontologica Scandinava**, 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.

SGARBI, M. W. N.; JUNIOR, B. A. S.; NETO, J. S. H. Importância da resposta inflamatória sistêmica (*SIRS*) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 41, n. 1/2, p. 1-6, 2006.

SHI, J.; GILBERT, G. E.; KOKUBO, Y.; OHASHI, T. Role of the liver in regulation numbers of circulation neutrophils. **Blood**, v. 98, p. 1226-30, 2001.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 134-44, 1998.

SPOONER, C. E.; MARKOWITS, N. P.; SARAVOLATZ, L. D. The role of tumor necrosis factor in sepsis. **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 62, p. 1-7, 1992.

SUN, X. J.; MENG, H. X.; SHI, D.; XU, L.; ZHANG, L.; CHEN, Z. B.; FENG, X. H.; LU, R. F.; REN, X. Y. Elevation of c-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. **Journal of Periodont Research**, v. 44, p. 311-316, 2009.

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. **Journal of Periodontology**, v. 67, p. 1085-93, 1996, Supplement 10.

TEM CATE, A. R., **Histologia Bucal**. 5ed., Guanabara. 2001.

THILANDER, H.: Permeability of the gingival pocket epithelium. **International Dental Journal**, v. 14, p. 416, 1964.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, 6ed. São Paulo, Roca, 2002. 532p.

VAN DYKE, T. E. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 45, p. 10-13, 2007.

VERSTRAETE, F. J. M. **Self-Assessment Color Review of Veterinary Dentistry**. Manson Publishing, London & Iowa State University Press, Ames, 1999.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.52, n.3, 2008.

YAMAZAKI, K.; HONDA, T.; ODA, T.; UEKI-MARUYAMA, K.; NAKAJIMA, T.; YOSHIE, H.; SEYMOUR, G. J. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. **Journal of Periodontology Research**, v. 40, n. 53-58, 2005.

WEILDLICH, P. Biofilme e Cálculo Dental. In: BRUNETTI, M.C.; FERNANDES, M. I.; MORAES, R. G. B. **Fundamentos da periodontia: Teoria e Prática**. Ed. Artes Médicas. São Paulo, 2007. p.

WIEDERMANN, C. J.; KIEHL, S.; DUNZENDORFER, S.; SCHRATZBERGER, P.; EGGER, G.; OBERHOLLENZER, F.; WILLEIT, J. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease. **Journal of American College of Cardiology**, v. 34. P. 1975-81, 1999.

WIGGS, R.B.; LOBPRIDE, H.B.; **Veterinary dentistry: principles and practice**. Lippincott-Raven Publishers, 1997. 748 p.

APÊNDICE A

NOME	PRONTUÁRIO	SEXO	IDADE (ANOS)	PESO VIVO (Kg)	GRAU D. P.	IL-1 (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		TNF-a (pg/ml)	
						ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
JULLY	218727	F	15	3,8	GRAVE	<5.7	<5.7	3389	1555	<2.12	<2.12	483	278
TOMMY	212239	M	11	5,5	GRAVE	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	131	13.41	<3.47	<3.47
KETTY	218728	F	12	5,3	GRAVE	<5.7	<5.7	169	175	<2.12	<2.12	40.95	38.93
FREDERICO	114984	M	10	9,8	LEVE	<5.7	<5.7	6.64	57.2	<2.12	<2.12	<3.47	16.19
SAKURA	161257	F	8	5,7	MODERADA	14.718	20.907	15.12	45.17	<2.12	<2.12	<3.47	<3.47
PIRATA	218163	M	13	6,7	GRAVE	<5.7	<5.7	45.17	42.14	<2.12	<2.12	<3.47	18.72
KIM	154779	F	11	4,6	MODERADA	9.107	5.189	<1.71	<1.71	<2.12	<2.12	<3.47	<3.47
NINA	209625	F	13	6,3	GRAVE	<5.7	<5.7	<1.71	49.67	8.2	103	<3.47	<3.47
TOBBY	220138	M	13	8,7	GRAVE	6.559	6.775	77.96	4.03	85.38	<2.12	<3.47	<3.47
ESTHER	209429	F	14	5	MODERADA	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	<2.12	<2.12	<3.47	<3.47
DIANA	220448	F	10	22,2	GRAVE	<5.7	8.653	193	189	<2.12	<2.12	33.73	29.25
BABI	150910	F	12	15,4	LEVE	<5.7	175.338	<1.71	<1.71	137	116	<3.47	<3.47
WILLY	220719	M	10	2,75	GRAVE	<5.7	<5.7	331	171	<2.12	<2.12	66.06	36.25
JOY	218603	F	10	11	GRAVE	<5.7	<5.7	6.64	15.12	<2.12	<2.12	<3.47	14.33
RAFA	220245	M	5	7,7	MODERADA	<5.7	<5.7	61.68	21.03	<2.12	<2.12	6.42	<3.47
STEEL	165732	M	7	2	GRAVE	72.974	111.944	<1.71	<1.71	<2.12	<2.12	<3.47	<3.47
MAGALI	185395	F	11	6,9	MODERADA	1.498	<5.7	8	211	<2.12	6.07	6.93	125
KELLY	222842	F	11	2,3	GRAVE	<5.7	<5.7	28.54	15.12	<2.12	<2.12	16.21	27.22
MICKEY	222489	M	11	4	GRAVE	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	12.65	17.26	<3.47	<3.47
NICK	222447	M	11	9,7	GRAVE	<5.7	<5.7	18.06	<1.71	31.45	17.26	<3.47	<3.47
LULI	168027	M	11	14,7	GRAVE	20.243	21.709	341	560	<2.12	21.17	39.27	74.1
NANI	215335	F	15	4,3	GRAVE	<5.7	<5.7	2398	1114	<2.12	<2.12	393	254
KILLER	112416	M	12	25	MODERADA	<5.7	3.204	146	95.43	<2.12	<2.12	81.7	61.18
SUMOMO	198672	F	14	5,25	MODERADA	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	42.52	30.66	<3.47	<3.47
FREDERICO	219609	M	14	13,5	GRAVE	1.582	46.498	1415	1076	<2.12	<2.12	285	218
BILLY	22308	M	12	11	GRAVE	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	<2.12	<2.12	23.26	23.26
JUNIOR	221840	M	13	5	GRAVE	<5.7	<5.7	<1.71	<1.71	<2.12	<2.12	<3.47	<3.47
MILU	204654	F	17	7,5	GRAVE	5,7	5,7	36,09	27,03	2,12	2,12	3,47	3,47
ISABEL	223118	F	11	11,7	MODERADA	5,7	5,7	839,95	208,47	0,88	250,29	216,77	67,48
LUMA	224460	F	8	17	GRAVE	14,718	5,7	135,39	116,34	496,71	462,39	67,12	43,26
MEG 1	225567	F	9	4,3	GRAVE	9,107	175,338	322,65	392,89	0,88	1,88	57,16	66,42
TEOPHILO	222057	M	5	40	LEVE	5,189	5,7	891,75	517,86	0,88	0,88	232,66	176,13
BRANCO	226076	M	8	30,3	GRAVE	6,559	5,7	17,64	3,57	0,88	0,88	64,54	6,27
MEG 2	219933	F	12	4,7	MODERADA	5,7	5,7	215,08	132,53	0,88	0,88	28,03	100,2
TATY	84456	F	12	14	MODERADA	8,653	5,7	772,73	432,41	0,88	0,88	196,24	110,91
LUDIMILA	202092	F	13	15	GRAVE	5,7	5,7	1182,58	3,57	18,4	0,88	204,12	6,27

Apêndice B: compilação de todos os cães.

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
3389	1555	2,12	2,12	483	278	5,7	5,7
1,71	1,71	131	13,41	3,47	3,47	5,7	5,7
169	175	2,12	2,12	40,95	38,93	5,7	5,7
6,64	57,2	2,12	2,12	3,47	16,19	5,7	5,7
15,12	45,17	2,12	2,12	3,47	3,47	14,71	20,9
45,17	42,14	2,12	2,12	3,47	18,72	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	9,107	5,189
1,71	49,67	8,2	103	3,47	3,47	5,7	5,7
77,96	4,03	85,38	2,12	3,47	3,47	6,559	6,775
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
193	189	2,12	2,12	33,73	29,25	5,7	8,653
1,71	1,71	137	116	3,47	3,47	5,7	175,338
331	171	2,12	2,12	66,06	36,25	5,7	5,7
6,64	15,12	2,12	2,12	3,47	14,33	5,7	5,7
61,68	21,03	2,12	2,12	6,42	3,47	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	72,974	111,944
8	211	2,12	6,07	6,93	125	1,498	5,7
28,54	15,12	2,12	2,12	16,21	27,22	5,7	5,7
1,71	1,71	12,65	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
18,06	1,71	31,45	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
341	560	2,12	21,17	39,27	74,1	20,243	21,709
2398	1114	2,12	2,12	393	254	5,7	5,7
146	95,43	2,12	2,12	81,7	61,18	5,7	3,204
1,71	1,71	42,52	30,66	3,47	3,47	5,7	5,7
1415	1076	2,12	2,12	285	218	1,582	46,498
1,71	1,71	2,12	2,12	23,26	23,26	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
36,09	27,03	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
839,95	208,47	0,88	250,29	216,77	67,48	5,7	5,7
135,39	116,34	496,71	462,39	67,12	43,26	14,718	5,7
322,65	392,89	0,88	1,88	57,16	66,42	9,107	175,338
891,75	517,86	0,88	0,88	232,66	176,13	5,189	5,7
17,64	3,57	0,88	0,88	64,54	6,27	6,559	5,7
215,08	132,53	0,88	0,88	28,03	100,2	5,7	5,7
772,73	432,41	0,88	0,88	196,24	110,91	8,653	5,7
17359,3	6490,09	0,88	3,94	964,82	620,55	5,7	5,7
1182,58	3,57	18,4	0,88	204,12	6,27	5,7	5,7

Apêndice c: grupo de cães com doença periodontal grave

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
3389	1555	2,12	2,12	483	278	5,7	5,7
1,71	1,71	131	13,41	3,47	3,47	5,7	5,7
169	175	2,12	2,12	40,95	38,93	5,7	5,7
45,17	42,14	2,12	2,12	3,47	18,72	5,7	5,7
1,71	49,67	8,2	103	3,47	3,47	5,7	5,7
77,96	4,03	85,38	2,12	3,47	3,47	6,559	6,775
193	189	2,12	2,12	33,73	29,25	5,7	8,653
331	171	2,12	2,12	66,06	36,25	5,7	5,7
6,64	15,12	2,12	2,12	3,47	14,33	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	72,974	111,944
28,54	15,12	2,12	2,12	16,21	27,22	5,7	5,7
1,71	1,71	12,65	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
18,06	1,71	31,45	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
341	560	2,12	21,17	39,27	74,1	20,243	21,709
2398	1114	2,12	2,12	393	254	5,7	5,7
1415	1076	2,12	2,12	285	218	1,582	46,498
1,71	1,71	2,12	2,12	23,26	23,26	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
36,09	27,03	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
839,95	208,47	0,88	250,29	216,77	67,48	5,7	5,7
1182,58	3,57	18,4	0,88	204,12	6,27	5,7	5,7
322,65	392,89	0,88	1,88	57,16	66,42	9,107	175,338
135,39	116,34	496,71	462,39	67,12	43,26	14,718	5,7
17,64	3,57	0,88	0,88	64,54	6,27	6,559	5,7

Apêndice D grupo de cães com doença periodontal moderada

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
15,12	45,17	2,12	2,12	3,47	3,47	14,71	20,9
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	9,107	5,189
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
17359,3	6490,09	0,88	3,94	964,82	620,55	5,7	5,7
61,68	21,03	2,12	2,12	6,42	3,47	5,7	5,7
8	211	2,12	6,07	6,93	125	1,498	5,7
146	95,43	2,12	2,12	81,7	61,18	5,7	3,204
1,71	1,71	42,52	30,66	3,47	3,47	5,7	5,7
215,08	132,53	0,88	0,88	28,03	100,2	5,7	5,7
772,73	432,41	0,88	0,88	196,24	110,91	8,653	5,7

Apêndice E - Planilha 6: grupo de cães com doença periodontal leve

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
6,64	57,2	2,12	2,12	3,47	16,19	5,7	5,7
1,71	1,71	137	116	3,47	3,47	5,7	175,338
891,75	517,86	0,88	0,88	232,66	176,13	5,189	5,7

Apêndice F - amostras da primeira fase.

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
3389	1555	2,12	2,12	483	278	5,7	5,7
1,71	1,71	131	13,41	3,47	3,47	5,7	5,7
169	175	2,12	2,12	40,95	38,93	5,7	5,7
6,64	57,2	2,12	2,12	3,47	16,19	5,7	5,7
15,12	45,17	2,12	2,12	3,47	3,47	14,71	20,9
45,17	42,14	2,12	2,12	3,47	18,72	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	9,107	5,189
1,71	49,67	8,2	103	3,47	3,47	5,7	5,7
77,96	4,03	85,38	2,12	3,47	3,47	6,559	6,775
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
193	189	2,12	2,12	33,73	29,25	5,7	8,653
1,71	1,71	137	116	3,47	3,47	5,7	175,338
331	171	2,12	2,12	66,06	36,25	5,7	5,7
6,64	15,12	2,12	2,12	3,47	14,33	5,7	5,7
61,68	21,03	2,12	2,12	6,42	3,47	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	72,974	111,944
8	211	2,12	6,07	6,93	125	1,498	5,7
28,54	15,12	2,12	2,12	16,21	27,22	5,7	5,7
1,71	1,71	12,65	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
18,06	1,71	31,45	17,26	3,47	3,47	5,7	5,7
341	560	2,12	21,17	39,27	74,1	20,243	21,709
2398	1114	2,12	2,12	393	254	5,7	5,7
146	95,43	2,12	2,12	81,7	61,18	5,7	3,204
1,71	1,71	42,52	30,66	3,47	3,47	5,7	5,7
1415	1076	2,12	2,12	285	218	1,582	46,498
1,71	1,71	2,12	2,12	23,26	23,26	5,7	5,7
1,71	1,71	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7
36,09	27,03	2,12	2,12	3,47	3,47	5,7	5,7

Apêndice G: cães da segunda fase

IL-6 antes	IL-6 depois	IL-10 antes	IL-10 depois	TNF antes	TNF depois	IL-1 antes	IL-1 depois
839,95	208,47	0,88	250,29	216,77	67,48	5,7	5,7
135,39	116,34	496,71	462,39	67,12	43,26	14,718	5,7
322,65	392,89	0,88	1,88	57,16	66,42	9,107	175,338
891,75	517,86	0,88	0,88	232,66	176,13	5,189	5,7
17,64	3,57	0,88	0,88	64,54	6,27	6,559	5,7
215,08	132,53	0,88	0,88	28,03	100,2	5,7	5,7
772,73	432,41	0,88	0,88	196,24	110,91	8,653	5,7
1182,58	3,57	18,4	0,88	204,12	6,27	5,7	5,7