EDER DE SOUZA MARTINS

**Análise clínica e de citocinas no fluido gengival de pacientes com periodontite
agressiva - estudo longitudinal**

São Paulo

2015

EDER DE SOUZA MARTINS

**Análise clínica e de citocinas no fluido gengival de pacientes com periodontite
agressiva - estudo longitudinal**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. João Batista César Neto

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Martins, Eder de Souza.

Análise clínica e de citocinas no fluido gengival de pacientes com periodontite agressiva – estudo longitudinal / Eder de Souza Martins ; orientador João Batista César Neto . -- São Paulo, 2015.

62 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Periodontite agressiva. 2. Biomarcadores. 3. Citocinas. I. César Neto, João Batista. II. Título.

Martins, ES. Análise clínica e de citocinas no fluido gengival de pacientes com periodontite agressiva - estudo longitudinal: Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____ / ____ / 2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais **Manoel e Emília,**

Pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida, sempre me deram todo amor e sempre me deram os melhores ensinamentos morais e éticos para conseguir trilhar minha vida, mesmos nos momentos de tormenta e dificuldade.

Aos meus irmãos **Edson e Edmar,**

Por serem meus amigos e protetores nas horas de dificuldade. Obrigado pela paciência, carinho e apoio.

Ao meu sobrinho **Pedro,**

Meu braço direito e grande amigo durante toda vida. Te amo.

Aos meus três tesouros: **Karina, Verônica e Valentina,**

Tudo pode ser definido com amor. Obrigado pela paciência, meus anjos. Essa conquista também é de vocês.

Hoje sou imensamente grato a tudo que passei para chegar a essa importante conquista da minha vida. Compreendo que as dificuldades foram muitas durante minha carreira e isso torna esse feito ainda mais importante. Um sonho realizado. Desta forma, agradeço:

A Deus e a **Nossa Senhora Aparecida**, que me ajudaram a iluminar meu caminho e as difíceis escolhas nessa fase da minha vida.

À **minha família**, pais, irmãos, pela compreensão e apoio.

Em especial, a minha orientadora, **Profa. Luciana Saraiva**, pela imensa paciência e sabedoria soube trilhar os meus caminhos durante todo o curso. Seu Projeto é maravilhoso e sua dedicação é algo raro e especial. Jamais vou esquecer de nossas conversas. Você será especial por toda minha vida, sem sua ajuda eu jamais teria conseguido essa conquista.

Ao coordenador do curso de Pós-graduação em Periodontia, **Prof. Giuseppe Alexandre Romito**, pela oportunidade de ter participado deste curso maravilhoso, onde cresci como ser humano e cientificamente.

Aos professores do curso de Periodontia, **Prof. Claudio Mendes Pannuti, João Batista Cesar Neto e Cristina Cunha Villar**, por todo ensino e aprendizado durante estes anos.

A **Profa. Marinella Holzhausen Caldeira**, pela oportunidade de conhecer e trabalhar ao seu lado na elaboração da parte laboratorial da minha pesquisa.

Aos amigos e amigas das turmas de mestrado e doutorado: **Alexandre Hugo Llanos, Bruna Di Profio, Giovane Hisse Gomes, Lucas Macedo Ambrosio, Luis Marcelo M. Calderero, Marcelo Sirolli Ferreira, Mônica Misawa, Thais Eiler Guirado e Vítor Sapata**. Companhias de momentos especiais. Obrigado pela troca de conhecimento; foram momentos únicos e eternizados em minha memória. Vocês são pessoas espetaculares. Obrigado por tudo!

A minha sogra **Maria de Fátima Paiva Nunes Marreiros** que com imenso carinho cuidou dos meus maiores tesouros e me possibilitou ter tempo para dedicação a Pós Graduação.

Aos **pacientes** participantes, que possibilitaram o desenvolver dessa pesquisa durante todos esses anos.

Aos alunos de iniciação científica **Estela, Marcela e Vinny**, que de forma direta ajudaram com a manutenção de vários pacientes.

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade de São Paulo, à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** (processo 2013/26381-0) e à CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

A **todos os professores** que contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários da FOU SP, por toda ajuda e colaboração.

***“Um covarde é incapaz de demonstrar amor.
Isso é privilégio dos corajosos.”***

MAHATMA GANDHI

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros clínicos periodontais: profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento a sondagem e os níveis de IL-17, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, ICAM-1, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-4 no fluido gengival de pacientes portadores de periodontite agressiva, comparando esses valores aos dados obtidos de sujeitos periodontalmente saudáveis, além de comparar os dados clínicos e imunológicos iniciais aos obtidos após um ano de tratamento nos pacientes com periodontite agressiva. Foram selecionados 37 pacientes portadores de periodontite agressiva e oito pacientes periodontalmente saudáveis, utilizados como grupo controle. Após a realização do exame clínico periodontal em todos os dentes, foi escolhido um sítio profundo de cada paciente com periodontite e um sítio raso dos pacientes saudáveis para coleta do fluido gengival. Todos os pacientes receberam tratamento periodontal que consistiu de orientação de higiene bucal, raspagens, remoção de fatores de retenção do biofilme bacteriano, polimento e uso de antibióticos. As amostras obtidas foram processadas e analisadas com um painel de 10 citocinas através de um ensaio multiplex. As análises estatísticas mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os doentes e os saudáveis em relação a GM-CSF, IL-4, IL-8 e MCP-1. Quando foi feita a comparação longitudinal dos pacientes com periodontite agressiva, houve aumento após o tratamento para GM-CSF, ICAM-1, IL-4, IL-10, IL-17, MCP-1 e TNF- α . Com isso, pode-se concluir que mesmo após o tratamento periodontal com consultas trimestrais de manutenção e melhora dos parâmetros clínicos nos pacientes com PA que tinham um baseline mais inflamado, foi observado que alguns biomarcadores continuaram elevados, o que pode significar que esses pacientes continuam a apresentar atividade de doença ou que alguns desses biomarcadores não têm significância clínica para esses pacientes.

Palavras-chave: Periodontite agressiva. Biomarcadores. Citocinas.

ABSTRACT

MARTINS ES. Clinical and cytokines analyzes on the gingival fluid of patients with aggressive periodontitis – longitudinal study. inglês [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

The aim of this study was to evaluate the periodontal clinical parameters: clinical probing depth, clinical attachment level and bleeding on probing and the IL-17, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, ICAM-1, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α and IL-4 levels in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis subjects, comparing these values with some data obtained from periodontal healthy patients, and also comparing clinic and immunologic initial data with the obtained after one year of treatment of aggressive periodontitis. The sample had 37 patients with aggressive periodontitis and 8 subjects clinically healthy, as control group. After the full periodontal examination, each patient with periodontitis had a deep site chosen, and a shallow site of the healthy ones, for collecting gingival fluid. All patients received periodontal treatment with oral hygiene, scaling, removal of retention factors, polishing and antibiotics. The obtained samples were processed and analyzed with a panel of 10 cytokines through a multiplex test. The statistical analyzes showed that there was no significant statistical difference between subjects with PA and healthy subjects with regard to GM-CSF, IL-4, IL-8 and MCP-1 levels. When longitudinal comparison of the subjects was made, it was noted some increase for GM-CSF, ICAM-1, IL-4, IL-10, IL-17, MCP-1 and TNF- α . Then, it can be concluded that, even after the periodontal treatment with trimestral maintenance and improvement on the clinical parameters, some biomarkers are still elevated, what can mean one of those possibilities: or the patients are still presenting some activity of the disease, or that some of these biomarkers don't have any clinical significance for this patients.

Keywords: Aggressive Periodontitis. Biomarkers. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - médias (com desvio padrão) para PCS, NCI e SS dos pacientes com PAG no baseline após 1 ano. Teste t pareado34
- Figura 5.2 - média com desvio padrão para PCS, NCI e SS dos pacientes com PAL no baseline após 1 ano. Teste t pareado.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 –	Distribuição dos sujeitos de pesquisa, de acordo com as variáveis sócio-demográficas.....	33
Tabela 5.2 –	Número e porcentagem de sítios que sofreram alterações em mm para NCI e PCS entre o início do estudo e um ano pós-tratamento	34
Tabela 5.3 –	Comparação (média e DP) intergrupos em relação ao número de dentes e aos parâmetros clínicos periodontais NCI, PCS e SS no baseline, e intragrupo (PA) após um ano.....	35
Tabela 5.4 –	Comparação (média e DP) intergrupos (PA e controle) e intragrupo (PA baseline e um ano) de biomarcadores dosados no fluido.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µg/mL	micrograma/mililitro
µL	microlitro
<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAP	Academia Americana de Periodontia
CCL-2	chemokine ligand 2
CCL-28	chemokine ligand 28
DP	Desvio padrão
FG	Fluido gengival
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1β	Interleucina 1-beta
INF-γ	Interferon gama
LEC	Linha Esmalte Cimento
LPMN	Leucócitos polimorfonucleares
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito

MG	Margem Gengival
mg/mL	Miligrama/mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP-8	Metaloproteinase da matriz 8
MMP-9	Metaloproteinase da matriz 9
MPO	Mieloperoxidase
NCI	Nível clínico de inserção
NK	Natural Killer
PA	Periodontite Agressiva
PAG	Periodontite Agressiva Generalizada
PAL	Periodontite Agressiva Localizada
PC	Periodontite Crônica
PCS	Profundidade clínica de sondagem
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
PBS –DEPC	phosphate-buffered saline diethyl pyrocarbonate
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SPSS	Statistical package for the social science
SS	Sangramento à sondagem
Th	T Helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
WR	Reagente de Trabalho

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
>	Maior
≥	Maior igual
=	Igual
<	Menor
n	Tamanho da amostra
p	probabilidade de significância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3 PROPOSIÇÃO.....	25
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 CASUÍSTICA.....	26
4.2 MÉTODOS.....	27
4.2.1 Anamnese.....	27
4.2.2 Exame clínico.....	27
4.2.3 Coleta do fluido gengival.....	28
4.2.4 Tratamento.....	28
4.2.5 Procedimento laboratoriais.....	29
4.2.5.1 Análise dos mediadores inflamatórios	29
4.2.5.1.1 <i>Protocolo de diluição do fluido a partir do periopaper</i>	29
4.2.5.1.2 <i>Dosagem de proteínas</i>	29
4.2.5.1.3 <i>Ensaio luminex</i>	30
4.3 Método estatístico	31
5 RESULTADOS.....	33
5.1 AMOSTRA ANALISADA.....	33
5.2 RESULTADOS CLÍNICOS.....	33
5.3 RESULTADOS DOS BIOMARCADORES.....	36
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Em 1999 o termo Periodontite Agressiva (PA) foi introduzido pela Academia Americana de Periodontia (AAP) para definir um grupo de doenças periodontais destrutivas com características particulares. Essa nova classificação procurou substituir a classificação anterior, agrupando diferentes doenças como a periodontite de estabelecimento precoce, a periodontite juvenil e a periodontite progressiva rápida, todas sob o termo PA. Essa nova definição ressalta a rapidez da progressão e não, necessariamente, a idade do surgimento da doença.

Em conjunto com a rápida progressão, a saúde sistêmica e a agregação familiar são as principais características da PA, e existem algumas características secundárias que podem estar presentes, mas não são obrigatórias, como por exemplo, o fator microbiológico, onde o consenso da AAP sugere que elevadas proporções de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e em certas populações de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) são típicas de pacientes com PA (Lang et al., 1999).

Embora afetando uma baixa parcela da população, diferente de outras formas de doença periodontal, a rapidez de progressão da doença e o alto risco de perda dentária numa idade extremamente jovem tornam a PA uma doença única no rol das doenças periodontais (Albandar; Tinoco, 2002) e muitas vezes ela pode não estar relacionada a altos níveis de biofilme ou presença de cálculo (Lang et al., 1999). Hipóteses tentam explicar porque isso ocorre. Vários estudos têm focado num perfil microbiano específico; outros têm proposto que uma resposta do hospedeiro ao desafio bacteriano juntamente com o desequilíbrio imunológico poderia contribuir para as diferenças clínicas encontradas entre PA e periodontite crônica (PC). O fator inflamatório tem ação direta nos tecidos periodontais e a resposta imunológica do hospedeiro pode levar a diferentes tipos de destruição periodontal de acordo com a suscetibilidade do indivíduo, dependendo diretamente da agressão bacteriana e de possíveis fatores genéticos (Serhan et al., 2008).

Em geral, os processos imuno-inflamatórios envolvem uma complexa cadeia de reações que podem ser protetoras ou destrutivas e que são mediadas por uma rede de quimiocinas, como por exemplo, a interleucina 8 (IL-8), a proteína quimioatrativa de monócitos – MCP-1, as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF-

α), $\text{interferon-}\gamma$ ($\text{INF-}\gamma$), IL-1 β , IL-6, IL-17, as citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e as metaloproteinases da matriz.

Existem diversos biomarcadores com funções imunológicas anti ou pró-inflamatórias complexas que podem influenciar a proliferação, migração, crescimento e diferenciação das células de defesa. Vários estudos têm tentado correlacionar diferentes citocinas com a PA (de Lima Oliveira et al., 2012; Mattuela et al., 2013; Yue et al., 2014). Dessa maneira, a avaliação de tais biomarcadores ou proteínas no fluido gengival pode ser um método extremamente válido para entender um pouco do processo inflamatório e, devido ao seu potencial relacionamento com a cadeia inflamatória da destruição na PA, estes biomarcadores possam tornar-se, no futuro, alvos terapêuticos chaves no tratamento destes pacientes.

Algumas dessas citocinas/quimiocinas foram incluídas em nossa revisão de literatura devido à provável correlação com a PA. Dentre elas IL-17, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, ICAM-1 IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-4. Isso porque formulamos a hipótese de que os pacientes com PA poderiam possuir um perfil imuno-inflamatório alterado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A doença periodontal é um processo patológico que afeta o periodonto, genericamente dividida em gengivite e periodontite (Glossário de Termos Periodontais – AAP, 2001). As periodontites são caracterizadas pela perda de inserção conjuntiva e pela perda óssea ao redor dos dentes juntamente com a formação de bolsas periodontais (Highfield, 2009; Ozmeric, 2004),

A periodontite agressiva é um tipo de doença periodontal caracterizada pela rápida destruição dos tecidos de suporte em indivíduos sistemicamente saudáveis. Agregação familiar também é outra característica importante (Lang et al., 1999).

De uma maneira geral, a doença periodontal é uma desordem inflamatória em que os patógenos periodontais conseguem driblar as defesas do hospedeiro, levando à destruição tecidual e à perda óssea.

Atualmente sabe-se que a patogênese da doença periodontal é decorrente tanto da resposta do hospedeiro frente ao biofilme bacteriano quanto da presença mediadores pró-inflamatórios (Souza et al., 2010). Tais mediadores são ativados quando o biofilme bacteriano acumula-se na região subgengival. Algumas bactérias estimulam células do hospedeiro a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da *P. gingivalis* que estimula células indiferenciadas do ligamento periodontal a produzirem IL1 β , IL-6 e IL-8 (Imatani et al., 2001). A ativação do sistema imune inato pelos patógenos periodontais pode resultar num desequilíbrio entre a produção de citocinas/quimiocinas pró- e anti-inflamatórias, que desempenham um papel fundamental na progressão da periodontite. Além disso, o sistema imune adquirido ativado por periodontopatógenos também contribuiria para a progressão da doença (Yue et al., 2013).

Assim as pesquisas mais recentes têm focado na procura de perfis de citocinas e quimiocinas com atividade na doença periodontal, já que citocinas e quimiocinas produzidas pelas células do hospedeiro têm um importante papel nas respostas imune e inflamatória (Yue et al., 2013). Os níveis de citocinas liberadas pelos tecidos e células adjacentes aos dentes são mensurados no fluido gengival (FG). O FG é um exsudato inflamatório, coletado dentro do sulco gengival ou da bolsa periodontal, que pode ser utilizado como uma ferramenta para o diagnóstico de doenças (Lamster; Ahlo, 2007).

Estudos epidemiológicos recentes têm reportados que citocinas pró-inflamatórias estão associadas à periodontite (Nibali et al., 2012; Prakasam; Srinivasan, 2014). Entre as inúmeras citocinas e quimiocinas que podem estar envolvidas na patogênese da doença periodontal,

podem ser destacadas:

IL-17

A interleucina 17 é uma citocina pró-inflamatória derivada das células-T, produzida por macrófagos, células dendríticas, células mães e células natural killer (Duarte et al., 2010). A família IL-17 inclui as interleucinas IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. São capazes de ativar células T, fibroblastos, células dendríticas e osteoclastos, além disso, participam ativamente na defesa autoimune e em inflamações crônicas, como na artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase e patologias gastrointestinais (Lubberts, 2015). São capazes de estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8), quimiocinas e metaproteinases (Beklen et al., 2007)

Ainda hoje, ainda não está bem definido o papel das células Th17 e de suas citocinas em relação às doenças periodontais; há exemplos de que a IL-17 é protetora contra infecções bacterianas, especificamente contra infecções periodontais (Yu et al., 2007) apesar de trabalhos mostrarem níveis aumentados de IL-17 em fluido gengival de pacientes com periodontite crônica, expressão aumentada de mRNA de IL-17 em tecido gengival doente e associação com o aumento da reabsorção óssea (Honda et al., 2008).

Cifcibasi et al. (2015) investigaram os níveis de mieloperoxidase, IL-17 e IL-23 no fluido gengival e no soro de pacientes com PAG comparando-os com indivíduos saudáveis. Os autores mostraram que as duas citocinas pró- inflamatórias e a enzima neutrofílica MPO estavam significativamente aumentadas nos pacientes com PAG no baseline, sugerindo um papel na patogênese desta doença.

M-CSF/GM-CSF

O fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) ou CSF-1 é uma citocina, enquanto o fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) codificado pelo gene CFS-2 é uma glicoproteína monomérica com funções de citocina; ambos são biomarcadores capazes de regular a função de macrófagos e possuem receptores diferentes em tecidos distintos (Fleetwood et al., 2009).

O GM-CSF pode ser produzido por macrófagos, células T, mastócitos, células NK, células endoteliais e fibroblastos. Possui função imunomoduladora em doenças autoimunes, tendo importante papel na manutenção, proliferação, diferenciação, maturação e ativação

funcional de células hematopoiéticas, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas. (Spitler et al., 2014)

Shaddox et al. (2013) demonstraram que o tratamento periodontal não cirúrgico com amoxicilina e metronidazol em pacientes com PA, apresentou melhora nos níveis clínicos e nos índices sorológicos de GM-CSF. No entanto, a presença de GM-CSF no fluido gengival não tem sido extensivamente estudada e o único trabalho que analisou este mediador inflamatório em amostras de fluido gengival de indivíduos com periodontite não encontrou diferenças entre sítios saudáveis e doentes (Thunell et al., 2010). Além disso, os autores não conseguiram encontrar uma alteração nos níveis de GM-CSF no fluido gengival como consequência da terapia mecânica periodontal. Embora apresente um delineamento totalmente diferente do estudo de Thunell et al. (2010), de Lima Oliveira et al. (2012) mostraram que a terapia periodontal diminui significativamente os níveis de GM-CSF no fluido gengival de pacientes com PAG, destacando a participação desta citocina na patogênese da PAG, dado confirmado também pelo estudo de Teles et al., 2010.

MCP-1

A proteína MCP-1 (CCL-2) pode ser produzida por células endoteliais, mastócitos, fibroblastos e células T, principalmente na camada basal dos tecidos epiteliais (Anil et al. 2013), e está envolvida com a quimioatração de monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de dano tecidual ou de infecção. Essa proteína tem sido relacionada à patogênese de doenças sistêmicas crônicas, tais como artrite reumatoide, doenças cardíacas, granulomatoses e asma (Anil et al., 2013) e sua expressão pode ser estimulada por TNF- α , IL-1 β , IL-4, IFN- γ e endotoxinas (Takahara et al., 1997; Yamagishi et al., 2002).

Schenkein et al. (2013) procuraram determinar se anticorpos anticardiolipina de pacientes com periodontite induziam a produção de MCP-1 por células endoteliais vasculares humanas e demonstraram que os níveis de MCP-1 foram significativamente maiores em pacientes com periodontite crônica ou agressiva em relação aos sujeitos saudáveis. O aumento dessa proteína levou ao aumento da anticardiolipina que está relacionada diretamente com problemas sistêmicos vasculares. Outro estudo procurou avaliar os níveis de MCP-1 no fluido gengival, saliva e soro de pacientes com PC, analisando as mudanças após o tratamento periodontal básico. Os autores também demonstraram altos níveis de MCP-1, evidenciando que este biomarcador serve para determinar a severidade da doença e o seu provável impacto sistêmico (Gupta et al., 2013).

Procurando avaliar os efeitos da terapia de modulação do hospedeiro nos parâmetros químicos e bioquímicos, Üstün et al. (2013) demonstraram que pacientes com artrite reumatóide demonstram diminuição dos níveis de MCP-1 e IL-8 após o tratamento periodontal e apresentaram diferenças significativas quando comparados com pacientes saudáveis. Anil et al. (2013) realizaram um estudo comparativo com pacientes saudáveis e periodontalmente comprometidos, fumantes e não fumantes, e os resultados demonstraram que os fumantes apresentavam maiores quantidades de MCP-1 no soro e no fluido gengival.

Longo et al. (2014) observaram os níveis de MCP-1 em pacientes periodontalmente doentes e portadores de diabetes mellitus, com e sem controle da glicemia, e não observaram diferenças significativas entre os pacientes com periodontite.

Sítios doentes de pacientes com PAL apresentaram altos níveis de citocinas, incluindo a GM-CSF, quando comparados a sítios saudáveis dos mesmos pacientes (Shaddox et al., 2013). Os altos níveis de GM-CSF em fluido gengival de sítios doentes de pacientes com PAL podem explicar a baixa concentração de MCP-1 nesses locais (menor até do que em sítios saudáveis), já que a expressão de MCP-1 é suprimida por GM-CSF (Hartner et al., 2005).

ICAM-1

A ICAM-1 é uma molécula de adesão intercelular expressa em vários tipos de células, com importante função na inflamação vascular. ICAM-1 tem um papel chave na inflamação, no desenvolvimento dos neurônios, nas respostas imunes através de reconhecimento antigênico e na circulação/ativação de linfócitos. Essa proteína está envolvida na transdução de sinal através das membranas celulares de leucócitos, células endoteliais e epiteliais, na migração transendotelial e respiração celular dependente de aderência (Kotteas et al., 2014).

Liu et al. (2014) mostraram expressão aumentada da molécula em tecido gengival de pacientes com periodontite crônica e agressiva. Umeda et al. (2012) mostraram altos níveis de ICAM-1 em tecido gengival de pacientes com periodontite (tanto agressiva quanto crônica) e em células epiteliais gengivais infectadas com *A. actinomycetemcomitans*. Em estudo procurando avaliar a influência da terapia periodontal regenerativa sobre os parâmetros clínicos e sobre os níveis de IL-8, IL-17 e ICAM-1 no fluido gengival de indivíduos com PC, Erdermir et al. (2015) não encontraram nenhuma alteração nos níveis de ICAM-1 após o tratamento.

Para Kato et al. (2014), o aumento dos níveis de TNF- α em células infectadas por *P. gingivalis* estimulou a produção de ICAM-1 em indivíduos com PC. Este mesmo resultado foi encontrado em outra pesquisa, demonstrando que células infectadas por *P. gingivalis* podem

servir para determinar a gravidade da doença em pacientes portadores de periodontite (Liu et al., 2014).

IL-8

A interleucina-8 é uma quimiocina pró-inflamatória com funções bastante diversificadas. Ela pode responder ao estímulo inflamatório em células alvo, com angiogênese ou com ação fagocitária. Esta quimiocina é um importante estimulante para os granulócitos neutrófilos, ativando-os e promovendo seu acúmulo ao longo de vasos sanguíneos. A IL-8 pode ser secretada por células mesenquimais, tumorais, endoteliais, neutrófilos e monócitos. Possui função inflamatória importante através da sinalização de diversas células e da regulação da atividade neutrofílica, porém a sua liberação contínua pode gerar dano tecidual e também é estimulante da angiogênese com proliferação capilar (Dong; Zheng, 2015).

Procurando comparar os níveis da quimiocina epitelial associada à mucosa (CCL28), da IL-8, da IL-1 β e do TNF- α , Ertugrul et al. (2013) analisaram o fluido gengival de pacientes portadores de PAG, pacientes com PC, pacientes com gengivite e sujeitos periodontalmente saudáveis, e observaram que esse biomarcador estava em concentrações mais elevadas nos indivíduos com PAG, quando comparados com PC, gengivite e saudáveis.

IL-10

A interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória imunorreguladora com caráter pleiotrópico. Ela é secretada, principalmente, por macrófagos e em menores quantidades por células T auxiliares, linfócitos T, células dendríticas, linfócitos B, células T citotóxicas e monócitos. As doenças mais relacionadas a essa citocina são a asma, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatóide, tuberculose e neoplasia. (Trifunović et al., 2015).

Os estudos que relacionam a IL-10 e a PA apresentam dados controversos. Gümüs et al. (2014) avaliaram na saliva e no soro de pacientes com PC, PA e sujeitos periodontalmente saudáveis, os níveis de cinco biomarcadores, entre eles a IL-10, e verificaram que os níveis de IL-10 foram semelhantes nos indivíduos com PA e PC, porém significativamente maiores nos sujeitos saudáveis.

Procurando verificar alterações, após o tratamento periodontal, nos níveis de citocinas encontradas no fluido gengival, de Lima Oliveira et al. (2012) compararam pacientes com PA com sujeitos periodontalmente saudáveis e demonstraram que a terapia periodontal diminuiu os níveis de IL-1 β e aumentou os níveis de IL-10 no grupo PA, embora a média de alterações das citocinas estudadas não tenha sido significativamente diferente entre os grupos.

IL-1 β

A IL-1 β é uma potente citocina anti-inflamatória pertencente à família da IL-1. As suas principais atividades são as de imunomodulação, inflamatória, proliferação celular, diferenciação e apoptose. Ela pode estar presente em diversas doenças autoimunes e pode ser controlada por anti-IL-1 β . A sua produção ocorre, principalmente, em macrófagos e monócitos, porém, pode ser produzida nas células T, células NK, endotélio, fibroblastos, células da glia e na cortical das suprarrenais (Zhao et al., 2013).

Acredita-se que seja a citocina chave na patogênese da doença periodontal (Meisel et al., 2003) Ela é a primeira ativadora da quimiotaxia de outras citocinas, bem como da expressão de moléculas de adesão, que facilitam a migração dos leucócitos dentro dos tecidos (Lang et al., 2000; Cullinan et al., 2001).

Estudos demonstraram uma diminuição nos níveis de IL-1 β no FG após o tratamento (Engelbreton et al., 2002; Rosalem et al., 2011; Zhong et al., 2007). Goutoudi et al. (2004) demonstraram, após o tratamento cirúrgico periodontal, uma diminuição nas quantidades totais de IL-1 β no FG enquanto os níveis de IL-10 mantiveram-se estáveis até 32 semanas. Relataram também que a IL-1 β estava associada à periodontite e que existe uma relação inversa entre IL-1 β e IL-10.

Gümüs et al. (2014) avaliaram os níveis de pentraxina-3 e IL-1 β na saliva e no soro de pacientes com PC, PA e sujeitos periodontalmente saudáveis. Os dados da saliva e do soro foram muito semelhantes nos pacientes com PA e PC, mas os níveis de IL-1 β foram significativamente mais elevados nos grupos PC e PA do que nos indivíduos saudáveis.

TNF- α

O fator de necrose tumoral- α é uma citocina que participa da inflamação sistêmica na fase aguda, sendo sua principal função a de regulação imunológica. É produzido principalmente por macrófagos, mas também por linfócitos T CD4+, eosinófilos, células NK,

neurônios e neutrófilos. Ele é capaz de induzir apoptose, febre, caquexia, inflamação, resposta à sepse via IL-1 e IL-6, replicação viral e inibir a gênese tumoral (Li et al., 2013), além da degranulação de polimorfonucleares e reabsorção óssea (Yucel et al., 2015).

Ertugrul et al. (2013) avaliaram os níveis de CCL28, IL-1 β , IL-8 e TNF- α no fluido gengival de pacientes com PA, PC, gengivite e sujeitos periodontalmente saudáveis e concluíram que os níveis de TNF- α em indivíduos com PA foram significativamente mais altos quando comparados com sujeitos com PC, gengivite e saudáveis. Em um estudo duplo-cego com placebo, pacientes com PA, que receberam antibioticoterapia e foram avaliados posteriormente, não apresentaram mudanças significativas nos níveis de TNF- α . quando comparados a indivíduos saudáveis (de Lima Oliveira et al., 2012).

IL-4

A interleucina-4 é uma citocina pleiotrópica que inibe as células Th1 enquanto estimula a resposta imune tipo Th2 (Shapira et al., 1992). Sua principal função é a ativação de células T e a diferenciação das células T em plasmócitos. Seu excesso pode induzir alergias. Essa citocina é capaz de reduzir a produção de células Th1, macrófagos, IFN- γ e células dendríticas (Paul, 2015).

Yue et al. (2013) avaliaram e compararam os níveis de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α no FG e na saliva de pacientes com PA e sujeitos periodontalmente saudáveis antes e após o tratamento periodontal e constataram que os níveis de citocinas tanto no FG quanto na saliva correlacionaram com os parâmetros clínicos na PA. Os níveis de IL-4 foram mais altos nos pacientes com PA comparados com os indivíduos saudáveis. Já Mattuella et al. (2013) não encontrou diferenças significantes nos níveis de IL-4 quando comparou sujeitos com PA, PC e saúde periodontal.

Com base nessa diversidade de informações sobre diferentes tipos de biomarcadores e com poucos estudos longitudinais na literatura para avaliar os níveis no FG, esse estudo busca verificar as diferentes respostas inflamatórias no pré e pós-tratamento de 1 ano da PA.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi verificar os parâmetros clínicos periodontais PCS, NCI e SS e os níveis de IL-17, M-CSF, GM-CSF, MCP-1, ICAM-1 IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-4 no fluido gengival de um sítio profundo de pacientes portadores de periodontite agressiva, comparando esses valores aos dados obtidos de sujeitos periodontalmente saudáveis. Houve também comparação entre os dados iniciais e pós um ano do tratamento no grupo com periodontite agressiva, a fim de verificar se esses pacientes apresentam um perfil inflamatório mais exacerbado.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (18045113.0.0000.0075 – Anexo A).

Inicialmente participaram do estudo 48 pacientes diagnosticados como portadores de Periodontite Agressiva (PAG e PAL) que foram triados nas clínicas de Graduação e Pós-Graduação da Disciplina de Periodontia da FOU SP ou para elas encaminhados e 10 sujeitos periodontalmente saudáveis. Os sujeitos que se adequaram aos critérios de inclusão do estudo e dele aceitaram participar, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo B), foram submetidos aos exames e coletas das amostras. Todos os exames e coletas foram realizados no ambulatório de atendimento odontológico.

Critérios de inclusão:

- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Ser portador de Periodontite Agressiva (AAP):

** Localizada: apresenta-se em primeiros molares e incisivos, com perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, um dos quais é um primeiro molar e envolvendo não mais do que dois outros dentes permanentes que não primeiros molares e incisivos.

** Generalizada: perda de inserção generalizada afetando pelo menos três dentes permanentes que não primeiros molares e incisivos.

- Histórico de doença periodontal na família (agregação familiar);
- Sujeitos de ambos os gêneros com idade entre 15 e 38 anos;
- Boa saúde geral.

Critérios de exclusão:

- Presença de qualquer condição sistêmica que pudesse afetar a progressão da doença periodontal (como diabetes) ou que necessitasse cobertura antibiótica para a terapia rotineira dental.

- Gestantes ou lactantes;
- Tabagistas;
- Ter feito uso de antibióticos nos três meses prévios ao início do estudo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Anamnese

Os pacientes responderam às perguntas presentes na ficha de anamnese utilizada na Disciplina de Periodontia da FOUSP (Anexo C).

4.2.2 Exame clínico

O exame periodontal completo (Anexo D) foi realizado por profissional, previamente calibrada para o diagnóstico da condição bucal. Para avaliar a reprodutibilidade das medidas da profundidade clínica de sondagem (PCS) e do nível clínico de inserção (NCI) foi realizada, previamente ao exame inicial, uma calibração intraexaminador. Para tal, foram realizados exames repetidos, em um intervalo de uma semana, em seis pacientes com periodontite crônica. Este intervalo permitiu a não memorização de medidas e garantiu a não alteração das mesmas.

Os registros, em seis diferentes sítios de cada dente (mesio-vestibular, vestibular e disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual), foram obtidos com uma sonda periodontal milimetrada (PCPUNC 15 - Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Foram obtidos os seguintes parâmetros periodontais:

1. Profundidade Clínica de Sondagem (PCS): distância compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal;
2. Distância entre a linha esmalte-cimento e a margem gengival (LEC-MG)
3. Nível Clínico de Inserção: distância entre a linha esmalte-cimento e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal;
4. Sangramento à Sondagem (SS): presença ou ausência de sangramento durante a sondagem dos seis sítios de cada dente;

Além disso, foram coletados dados de mobilidade, supuração, presença de lesão de furca. Todos os dados foram mensurados na visita inicial e após um ano, em seis sítios por dente.

Após a sondagem, foram escolhidos os sítios de onde seria coletado o fluido gengival. Esses sítios eram os que apresentavam maior profundidade clínica de sondagem.

4.2.3 Coleta do fluido gengival

As amostras de FG foram coletadas a partir de um sítio periodontalmente doente (PCS ≥ 5 mm, NCI ≥ 2 mm e SS) dos pacientes com PA, enquanto um sítio saudável foi amostrado de participantes saudáveis. Os sítios para obtenção do FG foram isolados com roletes de algodão, suavemente secos com jato de ar e o biofilme bacteriano supragengival previamente removido. Uma tira de coleta (PerioPaper®, OraFlow - Smithtown, NY, USA) foi inserida de 1-2 mm no sulco/bolsa dos sítios selecionados por aproximadamente 30 segundos. As amostras contaminadas com sangue foram descartadas, quando possível. Após a coleta, as tiras foram colocadas em tubos de polipropileno e armazenadas, imediatamente, em gelo seco e depois em freezer – 80°C.

4.2.4 Tratamento

Após a realização do exame clínico periodontal e coleta do fluido gengival, todos os pacientes receberam tratamento periodontal realizado pela professora Luciana Saraiva, da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP e sua equipe. O tratamento consistiu de orientações de higiene bucal, raspagens (com ultrassom e curetas manuais) e uso de antibióticos amoxicilina 500 mg + metronidazol 400 mg. Os pacientes foram orientados a fazer a suspensão do tratamento com antibióticos quando houvesse algum tipo de distúrbio gastro-intestinal.

Após o término do tratamento os pacientes entraram em um regime de manutenção que consistiu de controle de biofilme supra e subgengival com auxílio de ultrassom mais polimento dentário com taças de borracha e uma pasta profilática composta por pedra-pomes e dentifrício. Esses controles eram trimestrais ou de acordo com a necessidade de cada

paciente. Após um ano, os pacientes foram submetidos a novo exame periodontal completo e novas coletas de fluido gengival.

As análises laboratoriais de todos os materiais coletados (fluido gengival) foram realizadas no Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Toxicologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com o auxílio da Professora Dra. Marinella Holzhausen Caldeira.

4.2.5 Procedimentos laboratoriais

4.2.5.1 Análise dos mediadores inflamatórios - fluido gengival

Foi utilizado o kit Human Premixed Multi-Analyte® (R&D Systems, Boston, MA, USA) para Luminex para detecção de múltiplos biomarcadores no fluido gengival. As citocinas analisadas foram: IL-8, IL-10, GM-CSF, M-CSF, IL-4, IL-17, ICAM-1, IL-1 β , MCP-1 e TNF- α .

Preparo das amostras:

4.2.5.1.1 Protocolo de diluição do fluido a partir do periopaper

As amostras foram retiradas do freezer -80°C e armazenadas em estantes dentro de gelo seco. Foram adicionados 200 uL de PBS-DEPC a cada amostra e vortexado 3 vezes por 30 segundos. Os periopapers foram então removidos e os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Foram separados 120 uL para análise no luminex e 80 uL para a dosagem de proteínas. Os frascos foram então novamente armazenados a -80°C.

4.2.5.1.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas do fluido gengival foi realizada com Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific®, Rockford, IL, USA). A preparação dos padrões (albumina diluída - BSA) e do reagente de trabalho (WR) foi feita seguindo as instruções do fabricante. ‘

Foram adicionados 25 uL de cada padrão ou das amostras (em duplicata) a cada poço da placa. Acrescentou-se 200 uL do reagente de trabalho a cada poço e a placa foi agitada cuidadosamente por 30 segundos em um agitador. A placa foi então coberta e incubada a 37°C por 30 minutos. Após atingir temperatura ambiente foi levada ao leitor na absorbância aproximada de 562 nm.

4.2.5.1.3 Ensaio luminex

A curva padrão foi estabelecida de acordo com o preconizado pelo fabricante.

Depois que todos os reagentes, padrões e amostras foram preparados seguindo as instruções do fabricante, a placa foi umedecida com a solução tampão de lavagem. O líquido foi então removido da placa usando um dispositivo de sucção a vácuo (manifold) projetado para acomodar a placa.

A mistura com as micropartículas diluídas foi então ressuspensa por inversão e 50 uL da mistura foram acrescentados a cada poço da microplaca. Foram então adicionados 50 uL das soluções padrão (curva) ou das amostras (em duplicata) a cada poço. A placa foi então coberta com um papel alumínio selante e mantida em incubação por 2 horas à temperatura ambiente em um agitador orbital horizontal a 500 RPM.

Após o período de incubação, o líquido foi removido no dispositivo de sucção a vácuo (manifold) e cada poço da placa foi preenchido com 100 uL do tampão de lavagem. Novamente o líquido foi removido. O procedimento de lavagem foi realizado três vezes. Então, 50 uL da mistura diluída anticorpo-Biotina foram acrescentados em todos os poços. A placa foi novamente selada e incubada por uma hora a temperatura ambiente no agitador orbital horizontal a 500 RPM. As etapas de lavagem foram repetidas.

Foram acrescentados 50 uL de Streptavidina- ficoeritrina em todos os poços. Após selagem da placa, ela foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente no agitador orbital horizontal a 500 RPM. As etapas de lavagem foram repetidas. As micropartículas foram então ressuspensas pela adição de 100 uL do tampão de lavagem a cada poço. Foi feita a incubação por dois minutos a temperatura ambiente no agitador a 500 RPM. Seguiu-se então a leitura usando o Luminex.

Para calibração do aparelho cada analito recebe um valor padrão em pg/mL, informado no kit, e estes valores devem ser divididos por 3, cinco vezes.

Os níveis de citocinas foram determinados usando kits de detecção de citocinas humanas (R&D systems Pro Human Cytokine 10-Plex Panel® - Boston – USA) para as interleucinas IL1- β , IL-6, IL8, IL-10, IL-17, TNF- α , MCP-1, GM-CSF, M-CSF e INF- γ seguindo as instruções dos fabricantes.

Antes do ensaio, as amostras do FG foram eluídas por vortexação, por 30 minutos, utilizando-se 60 μ l de tampão de ensaio fornecido no kit, em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 RPM. Os ensaios foram realizados em placas de filtro com 96 poços, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a placa de filtro foi pré-umedecida com o tampão de lavagem e a solução foi aspirada dos poços, utilizando-se um coletor de vácuo.

Microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os diferentes analitos alvo foram adicionadas aos poços. Amostras e os padrões (variando de 0,13 a 2000 pg / ml para cada analito) foram pipetados nos poços e incubados. Os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após incubação durante 1 h, a estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (Estreptavidina- RPE) foi adicionada aos grânulos e incubada durante 30 min. Após a lavagem para remover os reagentes não ligados, uma solução tampão foi adicionada aos poços com as microesferas (mínimo de 100 por analito) para serem analisadas.

Depois de calibrado o aparelho Luminex (Luminex 200™, Merck Millipore Co., Darmstadt, Germany) as leituras foram realizadas com o auxílio do software xPONENT® 3.1 (Merck Millipore Co., Darmstadt, Germany) e as concentrações das amostras desconhecidas (antígenos nas amostras de FG) foram estimadas a partir da curva padrão utilizando este software. Os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por sítio (pg sítio).

4.3 Método Estatístico

As análises foram realizadas com o *software* SPSS™ 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). O paciente foi considerado como a unidade estatística ($n = 37$). Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A aderência dos dados à curva de normalidade foi verificada pelo teste de normalidade do Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foram selecionados testes paramétricos e não paramétricos para análises das diferenças intra e inter-grupos.

Parâmetros clínicos

Para cada paciente, foi calculada a média e o desvio-padrão para PCS, NCI e SS nos diferentes grupos (controle e teste) e tempos experimentais (*baseline* e 1 ano).

Para a variável idade foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para raça utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

Para PCS, NCI e SS foi utilizado teste t no baseline entre indivíduos teste e controle, enquanto que no longitudinal de 1 ano utilizou-se o teste t pareado intragrupo.

Parâmetros imunológicos

Os valores de proteína total foram convertidos em pg/mL. Os níveis finais das citocinas analisadas foram determinados pela razão entre os valores inicialmente obtidos no ensaio com luminex e os valores de proteína total convertidos em pg/mL. Para cada paciente, foi calculada a média e o desvio-padrão dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL8, IL-17, TNF- α , MCP-1, GM-CSF, M-CSF e INF- γ (pg/mL) obtidas do FG nos diferentes grupos (controle e teste) e tempos experimentais (*baseline* e 1 ano) Para TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL8, IL-17, TNF- α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF e INF- γ foram feitos o teste t no baseline entre indivíduos teste e controle, enquanto que no longitudinal de 1 ano foi utilizado o teste t pareado intragrupo.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA ANALISADA

O estudo foi conduzido entre agosto de 2010 e setembro de 2012. Inicialmente foram incluídos no estudo 48 sujeitos portadores de periodontite agressiva, mas como foi um estudo longitudinal, ao término de um ano, o estudo foi concluído com 37 sujeitos. Todos os dados clínicos, bem como as amostras do fluido gengival foram coletados de todos os pacientes tanto no baseline (início do estudo) quanto um ano depois do tratamento. Os dados do grupo controle (indivíduos saudáveis) foram coletados somente no início do estudo.

Na tabela 5.1 encontram-se as variáveis sócio-demográficas: idade, gênero e raça. Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na idade dos pacientes com PA quando comparados aos controles. A porcentagem de caucasianos foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle quando comparada ao grupo com PA, que foi formado em sua maioria por afro-descendentes.

Tabela 5.1 – Distribuição dos sujeitos de pesquisa, de acordo com as variáveis sócio-demográficas:

		PA (n=37)	Controle (n = 8)	P-valor
Idade	Média $\pm$ DP	29,4 $\pm$ 6,5	21,6 $\pm$ 1,6	<0,001*
Gênero	% de mulheres	31 (83,7)	5 (62,5)	0,18
Raça	% de caucasianos	18 (48,6)	8 (100)	0,01**

* diferença significativa ao nível alfa de 5% (teste de Mann-Whitney)

** associação significativa ao nível alfa de 5% (teste exato de Fisher)

5.2 RESULTADOS CLÍNICOS

Dentro dos parâmetros clínicos analisados, procurou-se observar a possível existência de diferenças significativas entre os dois momentos do estudo. A tabela 5.2 apresenta o número e a porcentagem de sítios que apresentaram alterações de PCS e de NCI entre o baseline e um ano após o tratamento. Houve uma estratificação por milímetros para que se

pudesse avaliar mais precisamente se houve melhora ou piora para esses dados clínicos. Em ambas as situações pode-se observar que houve melhora após o tratamento e a manutenção dos pacientes, já que as porcentagens de estabilidade ou ganho de inserção foram sempre maiores que as de perda de inserção.

Tabela 5.2 – Número e porcentagem de sítios que sofreram alterações em mm para NCI e PCS entre o início do estudo e um ano pós-tratamento:

NCI						
	- 3 mm	- 2 mm	- 1 mm	0	+ 1 mm	+ 2 mm + 3 mm
N (%)	47 (0,89%)	118 (2,25%)	629 (11,99%)	2561 (48,81%)	1302 (24,81%)	388 (7,39%) 202 (3,85%)
PCS						
	+ 3 mm ou +	+ 2 mm	+ 1 mm	0	- 1 mm	- 2 mm - 3 mm ou +
N (%)	22 (0,42%)	32 (0,61%)	352 (6,70%)	2657 (50,58%)	1376 (26,2%)	508 (9,67%) 306 (5,82%)

As figuras 5.1 e 5.2 demonstram os parâmetros clínicos periodontais PCS, NCI e SS dos pacientes com PA divididos em PAG (Figura 5.1 - 27 pacientes) e PAL (Figura 5.2 -10 pacientes). Foi utilizado o teste t pareado para comparar os parâmetros iniciais obtidos no baseline com os parâmetros obtidos após um ano.

Figura 5.1 Média com desvio padrão para PCS, NCI e SS dos pacientes com PAG no baseline após 1 ano. Teste t pareado (***) $\alpha=0,001$

Figura 5.2 Média com desvio padrão para PCS, NCI e SS dos pacientes com PAL no baseline após 1 ano. Teste t pareado (* $\alpha=0,05$)

Na tabela 5.3 estão os resultados comparativos entre os grupos PA e controle em relação ao número de dentes, PCS, NCI e porcentagem de SS no baseline. Esta tabela também apresenta a comparação intragrupo para os pacientes com PA comparando os mesmos dados no momento inicial com os dados obtidos após um ano.

Conforme esperado, o grupo controle apresentou os menores valores de PCS, NCI e ISS, além de um maior número de dentes. Quando os parâmetros clínicos dos pacientes portadores de PA foram avaliados um ano após o exame inicial notou-se uma diminuição de todos eles. Todas essas reduções foram estatisticamente significantes.

Tabela 5.3 – Comparação (média e DP) intergrupos em relação ao número de dentes e aos parâmetros clínicos periodontais NCI, PCS e SS no baseline, e intragrupo (PA) após um ano:

		Baseline	1 ano	p-valor
N dentes	PA	25,1 ± 2,4	24,2 ± 3,3	<0,05*
	Controle	28,0 ± 0,0		
	p-valor	0,001*		
NCI	PA	3,9 ± 0,9	3,5 ± 0,9	<0,001*
	Controle	2,1 ± 0,2		
	p-valor	<0,001*		
PCS	PA	3,3 ± 0,7	2,7 ± 0,4	<0,001*
	Controle	2,2 ± 0,1		
	p-valor	<0,001*		

SS (%)	PA	48,3 ± 24,3	20,9 ± 18,1	<0,001*
	Controle	4,3 ± 3,0		
	p-valor	<0,001*		

* diferença significativa ao nível alfa de 5% (teste t pareado)

5.3 RESULTADOS DOS BIOMARCADORES

Foram avaliados 10 biomarcadores no fluido gengival tanto para os pacientes portadores de PA quanto para o grupo controle. A maioria dos biomarcadores analisados apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o baseline e 1 ano, exceto a IL-8 e M-CSF. Entre estas diferenças significativas de 1 ano, somente a IL1- β apresentou redução em seus valores. Quando comparados o grupo teste e o controle, os seguintes biomarcadores apresentaram diferenças significantemente menores: ICAM-1, IL1- β , IL-17, M-CSF e TNF- α . IL-10 apresentou valores maiores (Tabela 4).

Tabela 5.4 – Comparação (média e DP) intergrupos (PA e controle) e intragrupo (PA baseline e um ano) de biomarcadores dosados no fluido gengival:

		Baseline	1 ano	P-valor (teste t pareado)
GM-CSF	PA	0,005 ± 0,003	0,018 ± 0,013	<0,001*
	Controle	0,003 ± 0,003		
	p-valor (teste t)	0,11		
ICAM-1	PA	14,168 ± 7,599	32,579 ± 24,815	<0,001*
	Controle	2,757 ± 2,987		
	p-valor (teste t)	<0,001*		
IL1-β	PA	4,473 ± 3,643	2,293 ± 1,451	<0,001*
	Controle	0,385 ± 0,318		
	p-valor (teste t)	<0,001*		
IL-4	PA	0,010 ± 0,009	0,043 ± 0,031	<0,001*
	Controle	0,009 ± 0,768		
	p-valor (teste t)	0,37		
IL-8	PA	1,341 ± 0,927	1,134 ± 0,956	0,15
	Controle	0,825 ± 0,768		
	p-valor (teste t)	0,07		
IL-10	PA	0,0001 ± 0,0008	0,005 ± 0,004	<0,001*
	Controle	0,001 ± 0,001		
	p-valor (teste t)	0,006*		

IL-17	PA	$0,007 \pm 0,005$	$0,018 \pm 0,013$	$<0,001^*$
	Controle	$0,004 \pm 0,003$		
	p-valor (teste t)	0,03*		
MCP-1	PA	$0,017 \pm 0,015$	$0,047 \pm 0,035$	$<0,001^*$
	Controle	$0,013 \pm 0,014$		
	p-valor (teste t)	0,24		
M-CSF	PA	$1,079 \pm 0,688$	$1,152 \pm 0,663$	0,30
	Controle	$0,227 \pm 0,264$		
	p-valor (teste t)	$<0,001^*$		
TNFα	PA	$0,016 \pm 0,008$	$0,027 \pm 0,017$	$<0,001^*$
	Controle	$0,009 \pm 0,015$		
	p-valor (teste t)	0,03*		

* diferença significativa ao nível alfa de 5% (teste t pareado)

6 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi verificar, no fluido gengival, os níveis de algumas citocinas e quimiocinas que poderiam estar relacionadas à patogênese da PA, comparando os dados obtidos antes do tratamento com os dados obtidos um ano após o tratamento. A intenção do estudo longitudinal foi observar, através de análises clínicas e imunológicas, se o tratamento periodontal não cirúrgico associado ao uso de antibióticos sistêmicos e às consultas de manutenção regulares seria capaz de impedir a progressão da doença nesses pacientes ou pelo menos estabilizar os níveis de inserção.

A meta da terapia periodontal nos pacientes que apresentam periodontite é alterar o ambiente subgengival, restabelecendo uma microbiota compatível com saúde (Badersten et al., 1984; Westfelt et al., 1998). Geralmente isso é conseguido através da instrumentação mecânica, mas em algumas formas mais graves de doença periodontal, como é o caso da PA, o uso de antibióticos tem se mostrado extremamente benéfico (van Winkelhoff et al., 1996; Mestnik et al., 2010).

O tratamento periodontal básico realizado nesse estudo consistiu de motivação, orientação de higiene, raspagens, remoção de fatores de retenção do biofilme bacteriano e uso de antibióticos sistêmicos (associação de amoxicilina 500 mg + metronidazol 400 mg, 3 x ao dia por 7 dias).

Os parâmetros clínicos de PCS apresentaram redução após o período de um ano, assim como ocorreu ganho ou estabilização dos níveis clínicos de inserção na grande maioria dos sítios. Outro dado que também apresentou uma grande redução foi índice de sangramento à sondagem. Desta forma ficou evidente em nosso estudo que o tratamento mecânico associado ao uso de antibióticos sistêmicos mostrou-se eficaz em relação aos parâmetros clínicos como demonstrado no estudo de Oliveira et al. (2012). Logo a utilização de amoxicilina + metronidazol levou à melhora significativa dos parâmetros periodontais em indivíduos portadores de PA, resultado também observado por Lang et al. (2015).

A tabela 5.2 mostra o número de sítios que permaneceram iguais ou que tiveram aumento ou redução da PCS e perda ou ganho no NCI. A grande porcentagem dos sítios teve ou permaneceu com a mesma PCS (50,58%) ou teve redução (41,69%). Em relação ao NCI, 48,81% dos sítios permaneceram estáveis enquanto 36,05% dos sítios ganharam inserção.

Quando os pacientes foram subdivididos em PAG e PAL, ambos os grupos

apresentaram redução de PCS, NCI e SS, mas a redução no grupo PAG foi mais significativa do que no grupo PAL (figuras 5.1 e 5.2).

Em relação aos biomarcadores analisados, primeiramente foi feita uma comparação com um grupo controle formado por indivíduos jovens periodontal e sistemicamente saudáveis. Depois foi feita uma comparação entre os níveis iniciais dos biomarcadores e os níveis obtidos um ano após o tratamento. A tabela 5.4 apresenta estes resultados. Surpreendentemente alguns biomarcadores não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle, formado por pacientes periodontalmente saudáveis, e o baseline do grupo de pacientes com PA. Além disso, os valores de alguns biomarcadores, no grupo PA, aumentaram após o tratamento.

Embora o grupo controle tenha apresentado valores médios menores do que o grupo de pacientes com PA, não houve diferença estatística em relação aos marcadores GM-CSF, IL-4, IL-8, MCP-1. Thunell et al. (2010) avaliando pacientes com PC também não encontrou diferenças entre sítios doentes e sítios saudáveis em relação à GM-CSF e IL-4.

Os níveis de ICAM-1, IL-1 β , IL-17, M-CSF e TNF- α estavam mais elevados nos pacientes com PA do que nos pacientes saudáveis, com diferenças estatisticamente significantes, resultados semelhantes a outros estudos (Duarte et al, 2010; Shaddox et al., 2007; Ertugrul et al., 2013; Cifcibasi et al., 2015), Apenas a IL-10 foi estatisticamente maior no grupo saudável, como esperado, já que é uma citocina anti-inflamatória.

Durante a doença periodontal, células inflamatórias do hospedeiro são recrutadas e citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α são liberados de fibroblastos, tecido conjuntivo, macrófagos e células do epitélio juncional (Anil et al., 2013). Consequentemente, enzimas derivadas do hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz MMP-8, MMP-9 e calprotectina são liberadas por LPMNs e osteoclastos, levando à destruição do tecido conjuntivo e à reabsorção óssea.

Quimiocinas também são capazes de recrutar e ativar fagócitos (Mukada 1992). A MCP-1 é uma potente ativadora tanto do recrutamento quanto da ativação de monócitos. Ela é expressa por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células T. Altos níveis de MCP-1 têm sido reportados no FG de pacientes com PA e PC (Eminingil et al., 2004; Kurtis et al., 2005). Hanazawa et al. (1993) demonstraram que a atividade da MCP-1 no FG aumenta com o aumento da gravidade da doença.

Oliveira et al. (2012), que avaliaram o efeito do tratamento periodontal sobre os níveis de citocinas em pacientes com PAG, mostraram que o tratamento mecânico, associado ou não ao uso de antibióticos, foi capaz de diminuir significativamente os níveis de GM-CSF, IL-1 β

e a proporção IL-1 β /IL-10. Em relação ao GM-CSF, estes dados diferem dos dados encontrados em nosso estudo, que apresentou valores mais altos um ano após o tratamento. Essa diferença pode ser atribuída talvez ao período de avaliação, já que o estudo de Oliveira et al., (2012) fez um acompanhamento por seis meses.

Interessantemente, com exceção de IL-1 β , todos os demais marcadores apresentaram-se aumentados na análise de um ano após o tratamento. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória com atividade pleiotrópica no início e desenvolvimento da periodontite (Goutoudi et al., 2004). Normalmente é produzida por monócitos e macrófagos (Matsuki et al., 1991, 1992), mas também por fibroblastos e células ósseas (Horowitz, 1993). Sua produção pode ser induzida por micro-organismos, produtos microbianos, agentes e antígenos anti-inflamatórios (Preiss; Meyle, 1994). As quantidades de IL-1 β têm sido associadas à gravidade da doença periodontal e segundo Masada et al. (1990) ela pode servir como um marcador de destruição periodontal. A redução da IL-1 β , obtida um ano após o tratamento foi um bom resultado já que ela é uma citocina pró-inflamatória extremamente associada à atividade de doença. Outros estudos demonstraram redução significativa da IL-1 β após tratamento (Oliveira et al., 2012; Yue et al., 2013).

Em relação a IL-4 e IL-10 o aumento encontrado após um ano, estatisticamente significativo, foi muito bom, já que ambas são consideradas citocinas anti-inflamatórias. Ambas foram associadas à supressão da destruição periodontal (Giannopoulou et al., 2003; Goutoudi et al., 2004). Os resultados de nosso estudo foram semelhantes ao da literatura (Yue et al., 2013) apesar de uma revisão sistemática não ter encontrado correlação entre a periodontite e a IL-4 (Jain et al., 2013).

Para os demais marcadores os resultados foram muito intrigantes porque todos os níveis dos marcadores aumentaram um ano após o tratamento apesar da terapia de manutenção periodontal realizada em todos os pacientes a cada três meses e das melhoras clínicas apresentadas tanto em relação à redução da PCS quanto à estabilidade ou ganho nos NCI.

Os pacientes com PA apresentaram um aumento nos valores de TNF- α um ano após o tratamento, resultado que difere de outros encontrados na literatura (Oliveira et al., 2012; Yue et al., 2013). TNF- α é um mediador pró-inflamatório que estimula a produção de collagenase, prostaglandinas, quimio e citocinas, moléculas de adesão celular e fatores relacionados à reabsorção óssea (Wajant et al., 1998; Boyce et al., 2005).

GM-CSF e M-CSF são biomarcadores pró-inflamatórios capazes de estimular neutrófilos e macrófagos, assim como a produção de IL-1 β e TNF- α . Em estudos realizados

em pacientes com PA foi observado que as concentrações de GM-CSF e M-CSF estavam elevadas em relação aos controles. Nosso estudo obteve valores elevados de MCS-F no baseline, semelhantes aos encontrados após um ano. Entretanto os resultados longitudinais demonstraram um aumento de GM-CSF, dados não obtidos em outros estudos (Umeda et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Shaddox et al.; 2013; Rhim et al., 2013).

Os valores de ICAM-1 também tiveram um aumento expressivo um ano após o tratamento. ICAM-1 é citocina pró-inflamatória de células epiteliais de vasos sanguíneos. Seu aumento pode ter correlação com o aumento do TNF- α (Kato et al. 2014). IL-8 é uma citocina associada com fase aguda da inflamação. Não houve diferença entre os valores iniciais e finais de IL-8.

A MCP-1 foi correlacionada com a gravidade da periodontite em diversos estudos (Longo et al., 2014; Gupta et al. 2013; Üstün et al., 2013). Novamente após o no tratamento de um ano houve aumento nos níveis de MCP-1, o que não ocorreu no soro de indivíduos com PA no estudo de Shaddox et al. (2013).

IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que é produzida por um grupo de células T helper, denominadas Th17, que promove rápido recrutamento de neutrófilos (Tesmer et al., 2008). Ela também estimula vários tipos de células a produzirem mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , e proteína C reativa (Patel et al., 2007; Tesmer et al., 2008).

Como esse é o primeiro estudo a fazer uma avaliação de biomarcadores em pacientes com PA, comparando os dados iniciais aos dados obtidos após um ano do tratamento, não existem informações na literatura para serem comparadas as encontradas aqui. Não se sabe se esses valores aumentados dos biomarcadores poderiam significar atividade de doença, mesmo que clinicamente os sítios estivessem aparentemente controlados e sadios.

Talvez esses pacientes precisem de um intervalo menor do que três meses para suas consultas de manutenção, ou talvez esses resultados aumentados realmente não tenham significância clínica. O que se sabe é que os estudos de acompanhamento longitudinal de pacientes com PA mostram uma pequena porcentagem de sítios com progressão de doença (Buchmann et al., 2002; Kamma; Boehni, 2003) e esses biomarcadores poderiam funcionar como indicativos dessa progressão. Estudos longitudinais com mais tempo de acompanhamento precisam ser realizados para verificarem esses achados tem ou não verdadeira significância clínica.

7 CONCLUSÕES

Em relação aos parâmetros clínicos periodontais, conforme esperado, o grupo com periodontite agressiva apresentou maiores valores para PCS, NCI e SS quando comparados aos sujeitos periodontalmente saudáveis. Para as citocinas analisadas, não houve diferenças significantes entre doentes e saudáveis para GM-CSF, IL-4, IL-8 e MCP-1.

Quando foram comparados os dados iniciais aos finais, obtidos após um ano, notou-se que houve uma melhora em todos os parâmetros clínicos periodontais e, mesmo assim houve um aumento de alguns biomarcadores inflamatórios.

Pacientes com PA apresentavam piores parâmetros clínicos e altos valores de ICAM-1, IL-1 β , IL-10, IL-17, M-CSF e TNF α no baseline, em relação aos saudáveis. Embora o tratamento periodontal tenha melhorado os parâmetros clínicos de PCS, NCI e SS, bem como favorecido o aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, as citocinas pró-inflamatórias ICAM-1, IL-17, MCP-1 e TNF α também apresentaram índices aumentados no longitudinal de um ano. A correlação entre os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em locais de destruição periodontal indicam que serão necessárias mais pesquisas para um melhor entendimento desta questão.

REFERÊNCIAS¹

Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol* 2000. 2002;29:153-76.

Anil S, Preethanath RS, Alasqah M, Mokeem SA, Anand PS. Increased levels of serum and gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 in smokers with periodontitis. *J Periodontol*. 2013 Sep;84(9):e23-8. Epub 2013 Jan 31.

Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1984 Jan;11(1):63-76.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):347-51.

Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Xing L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):127-31.

Buchmann R, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE. Aggressive periodontitis: 5-year follow-up of treatment. *J Periodontol*. 2002 Jun;73(6):675-83.

Cifcibasi E, Koyuncuoglu C, Ciblak M, Badur S, Kasali K, Firatli E, Cintan S. Evaluation of Local and Systemic Levels of Interleukin-17, Interleukin-23, and Myeloperoxidase in Response to Periodontal Therapy in Patients with Generalized Aggressive Periodontitis. *Inflammation*. 2015 May 5. [Epub ahead of print]

Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease

in a general adult population. *J Clin Periodontol*. 2001 Dec;28(12):1137-44.

de Lima Oliveira AP, de Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Socransky SS, Teles RP. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):295-302.

Dong R, Zheng S. Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jun;30(6):970-6.¹

Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol*. 2010 Jul;81(7):1056-63.

Emingil G, Atilla G, Hüseyinov A. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004 Oct;31(10):829-34.

Engelbrecht SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2002 Jan;29(1):48-53.

Erdemir EO, Hendek MK, Keceli HG, Apan TZ. Crevicular fluid levels of interleukin-8, interleukin-17 and soluble intercellular adhesion molecule-1 after regenerative periodontal therapy. *Eur J Dent*. 2015 Jan-Mar;9(1):60-5.

Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013 Feb;48(1):44-51.

Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):411-21.

Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003 Nov;30(11):996-1002.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004 Sep;32(7):511-20.

Gümüş P, Nizam N, Nalbantsoy A, Özçaka Ö, Buduneli N. Saliva and serum levels of pentraxin-3 and interleukin-1 β in generalized aggressive or chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):e40-6.

Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Feb;85(2):270-80.

Gupta M, Chaturvedi R, Jain A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*. 2013 Mar;61(3):892-7.

Hartner A, Veelken R, Wittmann M, Cordasic N, Hilgers KF. Effects of diabetes and hypertension on macrophage infiltration and matrix expansion in the rat kidney. *BMC Nephrol*. 2005 May 27;6:6.

Hanazawa S, Kawata Y, Takeshita A, Kumada H, Okithu M, Tanaka S, Yamamoto Y, Masuda T, Umemoto T, Kitano S. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infect Immun*. 1993 Dec;61(12):5219-24.

Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S11-26.

Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, Tabeta K, Okui T, Kajita K, Domon H, Yamazaki K. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 2008 Sep;395(1-2):137-41.

Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*. 1993 Apr 30;260(5108):626-7.

Imatani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 Apr;16(2):65-72.

Jain N, Joseph R, Balan S, Arun R, Banerjee M. Association of interleukin-4 and interleukin-17F polymorphisms in periodontitis in Dravidian ethnicity. *Indian J Hum Genet.* 2013 Jan;19(1):58-64.

Kamma JJ, Baehni PC. Five-year maintenance follow-up of early-onset periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2003 Jun;30(6):562-72.

Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, Isoda R, Sugiura S, Komatsu T, Ishida N, Noguchi T, Matsushita K. TNF- α augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. *BMC Microbiol.* 2014 Sep 3;14:229.

Kotteas EA, Boulas P, Gkiozos I, Tsagkouli S, Tsoukalas G, Syrigos KN. The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis. *Anticancer Res.* 2014 Sep;34(9):4665-72.

Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, Bal B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11):1849-55.

Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:216-29.

Lang N, Bartold P, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, and Dyke T. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Annals of Periodontology.* 1999 4(1):53.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res.* 2000 Apr;35(2):102-7.

Lang N, Feres M, Corbet E, Ding Y, Emingil G, Faveri M, Humagain M, Izumi Y, Kamil W, Kemal Y, Mahanonda R, Rajpal J, Sakellari D, Tan WC, Yamazaki K. Group B. Consensus paper. Non-surgical periodontal therapy: mechanical debridement, antimicrobial agents and other modalities. *J Int Acad Periodontol.* 2015 Jan;17(1 Suppl):34-6.

Li S, Huang X, Zhong H, Chen Z, Peng Q, Deng Y, Qin X. Tumour necrosis factor α (TNF- α) genetic polymorphisms and the risk of autoimmune liver disease: a meta-analysis. *J Genet.* 2013 Dec;92(3):617-28.

Liu J, Duan J, Wang Y, Ouyang X. Intracellular adhesion molecule-1 is regulated by porphyromonas gingivalis through nucleotide binding oligomerization domain-containing proteins 1 and 2 molecules in periodontal fibroblasts. *J Periodontol*. 2014 Feb;85(2):358-68.

Longo PL, Artese HP, Rabelo MS, Kawamoto D, Foz AM, Romito GA, Dib SA, Mayer MP. Serum levels of inflammatory markers in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2014 Apr;22(2):103-8.

Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jul;11(7):415-29.

Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1990 May;25(3):156-63.

Mattuella LG, Campagnaro MB, Vargas AE, Xavier LL, Oppermann RV, Chies JA, Miranda LA. Plasma cytokines levels in aggressive and chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):683-8.

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am J Pathol*. 1991 Jun;138(6):1299-305.

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*. 1992 May;76(1):42-7.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010 Apr;37(4):353-65.

Mukaida N. [Inflammation and pro-inflammatory cytokine]. *Nihon Rinsho*. 1992 Aug;50(8):1724-9.

Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis*. 2012 Apr;18(3):236-43.

Özer Yücel Ö, Berker E, Mesci L, Eratalay K, Tepe E, Tezcan İ. Analysis of TNF- α (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF- α levels in aggressive and chronic periodontitis: A preliminary report. *Cytokine*. 2015 Apr;72(2):173-7.

Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta*. 2004 May;343(1-2):1-16.

Patel DN, King CA, Bailey SR, Holt JW, Venkatachalam K, Agrawal A, Valente AJ, Chandrasekar B. Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF-kappaB and C/EBPbeta activation. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27229-38.

Paul WE. History of interleukin-4. *Cytokine*. 2015 Sep;75(1):3-7.

Prakasam S, Srinivasan M. Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2014 Mar;20(2):171-7.

Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol*. 1994 May;65(5):423-8.

Rhim EM, Ahn SJ, Kim JY, Chang YR, Kim KH, Lee HW, Jung SH, Kim EC, Park SH. Cryopreservation induces macrophage colony stimulating factor from human periodontal ligament cells in vitro. *Cryobiology*. 2013 Oct;67(2):156-62.

Rosalem W, Rescala B, Teles RP, Fischer RG, Gustafsson A, Figueredo CM. Effect of non-surgical treatment on chronic and aggressive periodontitis: clinical, immunologic, and microbiologic findings. *J Periodontol*. 2011 Jul;82(7):979-89.

Schenkein HA, Sabatini R, Koertge TE, Brooks CN, Purkall DB. Anti-cardiolipin from periodontitis patients induces MCP-1 production by human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Periodontol*. 2013 Mar;40(3):212-7.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61.

Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1140-4.

Shaddox LM, Gonçalves PF, Vovk A, Allin N, Huang H, Hou W, Aukhil I, Wallet SM. LPS-induced inflammatory response after therapy of aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2013 Aug;92(8):702-8.

Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992 Dec;39(4):319-22.

Spitler LE, Cao H, Piironen T, Whiteside TL, Weber RW, Cruickshank S. Biological Effects of Anti-Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Antibody Formation in Patients Treated With GM-CSF (Sargramostim) as Adjuvant Therapy of Melanoma. *Am J Clin Oncol*. 2014 Oct 3. [Epub ahead of print]

Souza DM, Prado Fde A, Prado Mde A, Rocha RF, Carvalho YR. Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations. *J Appl Oral Sci*. 2010 Sep-Oct;18(5):493-7.

Takahara N, Kashiwagi A, Nishio Y, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Hidaka H, Kikkawa R. Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Diabetologia*. 1997 Jun;40(6):662-70.

Teles RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles FR, Feres M, Socransky SS, Haffajee AD. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010 Apr;37(4):313-23.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008 Jun;223:87-113.

Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontal Res*. 2010 Feb;45(1):148-52.

Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(1):36-48.

Umeda JE, Demuth DR, Ando ES, Faveri M, Mayer MP. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Feb;27(1):23-33.

Üstün K, Erciyas K, Kısacık B, Sezer U, Pehlivan Y, Öztüzcu S, Gündoğar H, Onat AM. Host modulation in rheumatoid arthritis patients with TNF blockers significantly decreases biochemical parameters in periodontitis. *Inflammation*. 2013 Oct;36(5):1171-7.

van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000. 1996 Feb;10:45-78.

Wajant H, Pfeffer K, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factors in 1998. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998 Sep-Dec;9(3-4):297-302.

Westfelt E, Rylander H, Dahlén G, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998 Jul;25(7):536-41.

Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, Makita Z. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem.* 2002 Jun 7;277(23):20309-15.

Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3794-802.

Yue Y, Liu Q, Xu C, Loo WT, Wang M, Wen G, Cheung MN, Bai LJ, Dou YD, Chow LW, Hao L, Tian Y, Li JL, Yip AY, Ng EL. Comparative evaluation of cytokines in gingival crevicular fluid and saliva of patients with aggressive periodontitis. *Int J Biol Markers.* 2013 Apr 23;28(1):108-12.

Zhao R, Zhou H, Su SB. A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2013 Nov;17(3):658-69.

Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1 β , prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol.* 2007 Apr;34(4):285-93.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de citocinas e de patógenos periodontais de pacientes com Periodontite Agressiva. Estudo longitudinal.

Pesquisador: LUCIANA SARAIVA DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18045113.0.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

ANEXO A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 350.873

Data da Relatoria: 02/08/2013

Apresentação do Projeto:

A Periodontite Agressiva (PA) é um tipo específico de periodontite, com achados clínicos e laboratoriais específicos, que são suficientes para diferenciá-la de outras formas de periodontites. Normalmente ocorre em indivíduos jovens, afetando inicialmente incisivos e primeiros molares e é caracterizada por uma perda óssea e de inserção relativamente rápidas e por ter uma propensão ao envolvimento familiar. Muitas pesquisas sobre a doença periodontal têm buscado uma correlação entre fatores locais e sistêmicos. Na periodontite agressiva (PA), uma hiper-resposta inflamatória sistêmica a alguns micro-organismos já foi relatada, no entanto, sabe-se pouco ainda, sobre os mecanismos que interligam esses fatores. A hipótese é a de que os indivíduos com PA apresentam elevados níveis plasmáticos de fatores inflamatórios, devido à destruição tecidual local, que por sua vez, está associada a níveis elevados de citocinas, quando comparados com os indivíduos saudáveis. Até onde se tem conhecimento, não há estudos que avaliam a resposta imune em pacientes portadores de PA e sua relação com perda de inserção adicional pós tratamento, procurando contribuir com o conhecimento sobre o papel dos fatores inflamatórios na progressão da doença. Os objetivos deste estudo serão delinear algumas citocinas no fluido gengival (FG) e no soro de pacientes portadores de PA (localizada e generalizada) e de indivíduos saudáveis. Além dos dados clínicos, serão obtidas amostras de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 350.873

sangue periférico e FG de dois sítios doentes para análise das citocinas, e amostras de biofilme subgingival para detectar e quantificar, por meio da PCR-Real Time (qPCR), quatro patógenos periodontais: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. As citocinas serão quantificadas, através de ELISAs, no FG e no soro, a fim de se verificar a existência de uma associação entre os mediadores locais e séricos nos indivíduos saudáveis e periodontalmente doentes.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem por objetivo verificar, em pacientes portadores de periodontite Agressiva, se o nível local de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias corresponde ao nível sérico das mesmas analisando os dados pré (baseline) e pós-tratamento (1 ano).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Por se tratar de procedimentos intervencionais, podem levar a algum desconforto. Em relação à coleta sanguínea, a área pode apresentar um hematoma pós-coleta e o paciente poderá ter dor ou sensibilidade após a raspada. Porém, esses desconfortos serão avisados no TCLE e os pesquisadores farão o possível para minimizá-los.

BENEFÍCIOS

Além de melhorar a situação local dos dentes e gengivas, o paciente continuará a receber tratamento periodontal adequado e gratuito.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante para a área de periodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou TCLE bem elaborado e com todas as informações necessárias, folha de rosto, cópia do projeto e autorização da Clínica Odontológica da FOU SP para realização da pesquisa.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 350.873

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa se encontra adequado para aprovação do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 06 de Agosto de 2013

Assinador por:

**Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)**

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

As informações contidas neste documento têm por objetivo informá-lo (a) sobre a pesquisa de nome “Análise de citocinas (no fluido gengival e no soro) e de patógenos periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) de pacientes com Periodontite Agressiva. Estudo longitudinal”, coordenada pela Professora Doutora Luciana Saraiva de Campos, cirurgiã-dentista e pesquisadora da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

TÍTULO DO PROJETO: “Análise de citocinas (no fluido gengival e no soro) e de patógenos periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) de pacientes com Periodontite Agressiva. Estudo longitudinal”

NOME DOS PESQUISADORES:

- Prof. Dra. Luciana Saraiva de Campos (coordenadora) - Profa. Ass. Márcia Pinto Alves Mayer.
- Profa. Dra. Marinella Holzhausen
- PA: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito
- PA: Doutor Ricardo Takiy Sekiguchi
- PA: CD Éder de Souza Martins

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO: Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) – Av. Professor Lineu Prestes, 2227 – Butantã, São Paulo.

CONVITE: convidamos você a participar deste projeto, de maneira voluntária, esclarecendo que este consentimento pode ser retirado a qualquer momento, e isto não trará nenhum prejuízo a você, podendo continuar a receber seu tratamento.

JUSTIFICATIVA: A doença periodontal (gengival) é uma inflamação que deixa a gengiva inchada, vermelha e, em alguns casos, pode causar o amolecimento e perda dos dentes. A periodontite agressiva, que é o seu caso, normalmente é ainda mais severa. Essa doença é causada por bactérias (germes) da boca que vivem ao redor dos dentes e gengiva. Estas bactérias produzem algumas substâncias que de alguma forma, podem irritar a gengiva. Além disso, seu tipo de doença também está relacionado ao seu sistema imunológico (defesa do corpo). Como sua doença deixa sequelas, às vezes bastante severas, procedimentos cirúrgicos podem ser necessários para melhorar a situação de sua gengiva/dentes, facilitando inclusive, a higienização.

OBJETIVOS: As informações descritas abaixo têm por finalidade avaliar se a periodontite agressiva que você possui está relacionada ao tipo de bactéria ou substâncias relacionadas a elas ou ainda se o seu mecanismo de defesa (sistema imunológico) está relacionado a tudo isso. Além disso, gostaríamos de fazer uma avaliação de algumas substâncias presentes no fluido gengival (líquido que existe entre a gengiva e o dente) e no sangue. Nosso objetivo é estudar todas essas substâncias procurando correlacioná-las entre si e à presença de determinadas bactérias. Como temos a necessidade comparar os dados iniciais aos dados pós-tratamento, todos os procedimentos de coleta e exame clínico serão repetidos ao término de 1 ano.

PROCEDIMENTOS: Neste estudo serão incluídos sujeitos já diagnosticados com Periodontite Agressiva, com a finalidade de coletar algumas bactérias da boca (à procura de algumas espécies bacterianas específicas relacionadas à sua doença) e também coletar fluido gengival e um pouco de sangue, para verificar quais os possíveis mecanismos envolvidos na sua doença. Esses mecanismos podem ser bacterianos, inflamatórios ou uma combinação dos dois.

Após a realização da anamnese, você será submetido a um exame periodontal completo (dente por dente) e coleta do fluido gengival e da placa bacteriana dos dentes e de um pouco de sangue (procedimento que será executado por um enfermeiro). Depois das coletas você iniciará seu tratamento conosco. Ao término do tratamento básico (orientação de higiene, raspagens, controle de placa) você será colocado em um regime de manutenção periodontal a cada três meses, a fim de que sua doença não se instale novamente. Ao término de um ano os mesmos dados iniciais serão coletados, ou seja, novo exame clínico periodontal completo (dente por dente), nova coleta de fluido gengival e de placa bacteriana dos dentes e nova coleta de um pouco de sangue

RISCOS E DESCONFORTOS: Todos os procedimentos acima descritos serão realizados por profissionais qualificados e preparados para isso. Mas são procedimentos intervencionais e, por isso, podem levar a algum desconforto. Em relação à coleta sanguínea, a área pode apresentar um hematoma pós-coleta. Para que isso não ocorra, evitar pegar peso deste lado no dia da coleta. Em relação às demais coletas, elas são relativamente simples, sem maiores problemas. Quanto à raspada, você poderá ter dor ou ainda apresentar sensibilidade dentária pós-tratamento. Faremos todo o possível para minimizar esses desconfortos e prescreveremos medicações, quando necessário. Estaremos também à disposição se houver necessidade.

TEMPO: A duração deste estudo dependerá da sua necessidade de tratamento de cada caso. Você ficará conosco por no mínimo um ano e se quiser, após este período continuará fazendo suas consultas de manutenção periodontal.

BENEFÍCIOS: O tratamento periodontal visa melhorar a situação local de seus dentes e gengivas, diminuindo a profundidade das bolsas periodontais, o sangramento e facilitando os procedimentos de higienização.

Você continuará a receber tratamento periodontal adequado e gratuito para sua doença e talvez, com nossas pesquisas, possamos descobrir novos métodos para auxiliar o diagnóstico e tratamento da Periodontite Agressiva.

Sempre que possível procuraremos encaminhá-lo (a) para realização de outros procedimentos odontológicos como restaurações, canais e extrações.

GARANTIA DO SIGILO: As informações obtidas não serão utilizadas para divulgar sua identidade, somente o resultado global do estudo. Elas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores.

DIREITO DE DESISTIR: A qualquer momento, se você preferir desistir do mesmo, saiba que isso não acarretará qualquer prejuízo para você, podendo continuar seu tratamento.

REUTILIZAÇÃO DOS DADOS OU MATERIAL BIOLÓGICO: no decorrer de nossas pesquisas, às vezes nos deparamos com novas ideias que podem ser testadas com materiais (biológicos) como saliva, fluido gengival, sangue e placa bacteriana, que já foram coletados anteriormente e que não foram utilizados. Você permitiria a utilização desses materiais em outras pesquisas?

(☐) NÃO autorizo a utilização de dados ou material biológico (sangue, saliva, placa bacteriana e fluido gengival) em outras pesquisas.

(☐) SIM autorizo a utilização de dados ou material biológico (sangue, saliva, placa bacteriana e fluido gengival) em outras pesquisas.

Para utilizar os dados ou material biológico (sangue, saliva, placa bacteriana e fluido gengival) em outra pesquisa o sujeito da pesquisa quer ser consultado?

(☐) NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (sangue, saliva, placa bacteriana e fluido gengival) em outras pesquisas, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa,

(☐) SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (sangue, saliva, placa bacteriana e fluido gengival) em outra pesquisa

FORMA DE CONTATO: Se você tiver qualquer dúvida quanto ao estudo, favor entrar em contato com a pesquisadora no telefone 3091-7833 - secretaria da Periodontia ou no celular da professora Luciana Saraiva de Campos: 99204-3839.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FOU SP: para eventuais esclarecimentos sobre a ética desta pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia

da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, CEP: 05508-000, Butantã, São Paulo, telefone: 3091-7960 ou pelo e-mail: cepfo@usp.br

CONSENTIMENTO VOLUNTÁRIO

Você deve ter entendido tudo que leu. Uma cópia deste termo será entregue para você e a outra ficará arquivada com os professores responsáveis. A assinatura abaixo significa que você concorda em participar deste estudo.

DECLARAÇÃO

Eu,....., nacionalidade.....,

portador do R.G.nº e C.P.F. nº....., estado civil

....., profissão....., nascido (a) em// , na cidade de

....., no estado de, residente a

.....

Declaro ter sido inteiramente esclarecido (a) sobre o estudo, ter lido e entendido o termo que estou assinando abaixo e ter recebido uma cópia deste termo.

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do paciente ou responsável

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO C – Ficha de anamneses da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Departamento de Estomatologia

Disciplina de Periodontia

PACIENTE:.....R.G.....

SEXO.....DATA DE NASCIMENTO...../...../.....ESTADO CIVIL.....

NACIONALIDADE.....NATURALIDADE.....

ENDEREÇO:Res.....CEP.....TEL:.....

Com.....CEP.....TEL:.....

PROFISSÃO:.....EXAMINADO POR:.....

SAÚDE GERAL

1. Está em tratamento médico? sim () não ()
Em caso positivo, descreva:

.....

2. Foi submetido a alguma cirurgia? sim () não ()

3. Teve alguma destas doenças:

• Hepatites sim () não ()

• Tuberculose sim () não ()

• Ataque Cardíaco sim () não ()

• Diabetes? sim () não () Nível de glicemia:

• Febre Reumática sim () não ()

4. Toma anticoagulante (AAS)? sim () não ()

5. É fumante? sim () não () Quantos cigarros/dia? Há quanto tempo?

6. Pressão alta? sim () não ()

7. Sofre dos rins ou bexiga? sim () não ()

8. Tem com frequência algum tipo de hemorragia sim () não ()

9. Aparecem manchas roxas no corpo com frequência sim () não ()

10. Anemia? sim () não ()

11. Tem alguma alergia? (aspirina, penicilina, látex, frutos do mar...) sim () não ()

Em caso positivo, descreva:

12. Já recebeu transfusão de sangue? sim () não ()

13. Tem doença sexualmente transmissível (AIDS) sim () não ()

14. Tem tonturas? sim () não ()

15. Tem convulsões? sim () não ()

16. Está grávida? sim () não ()

17. Toma anticoncepcional? sim () não ()

18. Está na menopausa? sim () não ()

19. Tem osteoporose? sim () não ()

20. Faz uso de bisfosfonatos? sim () não ()

21. Medicamento em uso:

.....

.....

.....

PARTE ODONTOLÓGICA

- 1 Queixa do Paciente:
.....
.....
.....
- 2 Já teve feridas nos lábios ou língua que demoraram para sarar? sim () não ()
- 3 Come muito doce? sim () não () Refrigerantes: sim () não ()
- 4 Tem hábito de ranger ou apertar os dentes? sim () não ()
- 5 Tem sangramento gengival? sim () não ()
- 6 Tem dor nas gengivas? sim () não ()
- 7 Tem dentes abalados? sim () não ()
- 8 Quantas vezes por dia escova os dentes?
- 9 Usa escova: dura () média () mole () Pasta:
- 10 Utiliza fio ou fita dental? sim () não () Quantas vezes por dia?
- 11 Usa outros métodos de limpeza? sim () não ()
- 12 Quais?
- 13 Bochechos? Sim () não () Qual?.....

ANEXO D – Periograma da disciplina de periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINAS DE PERIODONTIA

PACIENTE: _____ Nº: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ RAÇA: _____ DATA DO EXAME: ____/____/____

FICHA INICIAL () REAVALIAÇÃO () FINAL ()

UEC – MG
PCS / SS
NCI

VESTIBULAR

PALATINA

UEC – MG
PCS / SS
NCI

UEC – MG
PCS / SS
NCI

LINGUAL

VESTIBULAR

UEC – MG
PCS / SS
NCI

Índice de
Sangramento: ____%

Professor Responsável

Aluno

Data: ____/____/____