**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

FABÍOLA PONTES AZEVEDO

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO COMPORTAMENTO
ADAPTATIVO DE FIBROBLASTOS HUMANOS
CULTIVADOS DE MUCOSA PALATINA NÃO MARGINAL E
DE ENXERTO GENGIVAL EM ÁREA MARGINAL**

**BAURU
2013**

FABÍOLA PONTES AZEVEDO

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO COMPORTAMENTO
ADAPTATIVO DE FIBROBLASTOS HUMANOS CULTIVADOS DE
MUCOSA PALATINA NÃO MARGINAL E DE ENXERTO
GENGIVAL EM ÁREA MARGINAL**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de MESTRE em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greggi

**BAURU
2013**

Azevedo, Fabíola Pontes
az25a Avaliação comparativa do comportamento adaptativo
de fibroblastos humanos cultivados de mucosa palatina
não marginal e de enxerto gengival em área marginal /
Fabíola Pontes Azevedo. – Bauru, 2013.
98 p.: il.; 30cm.

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos da FOB-USP
Número do processo: 055/2011
Data: 25/05/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Fabiola Pontes Azevedo

22 de Março de 1986	Nascimento Belém - Pará
Filiação	Ademir Azevedo Maria José Pontes Azevedo
2004 – 2009	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Pará - UFPA
2009 – 2011	Especialização em Periodontia pela Sociedade de Promoção Social do Fissurado Lábio-palatal/Profis
2010 – 2011	Programa de Capacitação Profissional na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
2011 – 2013	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração Reabilitação Oral, Disciplina de Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo

Trabalho realizado na Disciplina de Periodontia, Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Farmacologia e Genética do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente de sua realização.

À minha querida mãe, Maria José Pontes Azevedo, pessoa fundamental em minha vida que me incentivou a correr atrás dos meus objetivos e sempre me ensinou a importância do conhecimento.

Ao meu pai, Ademir Azevedo, dedico esta dissertação como forma de agradecimento eterno pelo incentivo, reconhecimento e esforços realizados durante todos esses anos para que eu conquistasse mais uma etapa da minha vida pessoal e profissional.

As minhas irmãs, Angela Rita Pontes Azevedo e Camilla Pontes Azevedo, pela admiração e por serem as minhas fontes inspiradoras nessa caminhada profissional que eu escolhi.

Aos meus sobrinhos, Rafael e Gabriel, por representarem o amor e a felicidade da minha família.

Ao meu cunhado, Marcelo Manzano, pelos conselhos e oportunidades concedidas para que eu pudesse aprender um pouco da Odontologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a vida terrestre e por ter achado que fui merecedora desta trajetória.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, pela possibilidade de realização de um sonho que foi ter me tornado aluna de pós-graduação desta casa.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de mestre a ser seguido e pelo qual tenho uma consideração eterna.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, pela ajuda e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho. Sem ele esse trabalho não seria possível de ser realizado. Minha gratidão é eterna.

À colaboradora direta deste trabalho, pós-doutoranda Ana Carolina de Faria Morandini, pela ajuda, paciência, conhecimento e confiança imensuráveis, sem a qual não seria possível a concretização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

A todos do laboratório de Farmacologia, que me ajudaram nos momentos de dúvidas, além de terem compartilhado da convivência agradável. Adorei ter dividido momentos de laboratório com vocês.

Aos professores do Departamento de Prótese e Disciplina de Periodontia, pelos conhecimentos transmitidos e pela convivência, que permitiram que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Aos meus Mestres, Prof. Dra. Ana Lúcia Raphaelli Nahás Nogueira, Prof. Dr. Daniel Romeu Benchimol de Resende (Manaus) e Prof. Dra. Alíne Franco Siqueira, que me ajudaram nesta caminhada profissional, pela confiança em mim depositada, amizade e ensinamentos transmitidos, pessoas que me proporcionaram o melhor da Periodontia, pois todo o meu conhecimento eu devo a vocês, a minha gratidão e consideração são eternas.

Denise “Alegria” e ao Marcão, por todos os momentos agradáveis, amizades e ajudas prestadas nesta disciplina.

À Ivânia pelo carinho, atenção, momentos de consolo e conselhos dados, uma pessoa que sempre me ajudou e nunca deixou que os percalços da vida se tornassem maiores que a minha capacidade de vencê-los, a minha gratidão por você, e sua família, é para sempre.

À Edilaine, pela qual tenho uma imensa gratidão, por ter compartilhado bons momentos, além de ter me ajudado dentro do departamento, estando ao meu lado em todas as situações e sempre me protegendo. Meu muitíssimo obrigado!

A todos os meus colegas de pós-graduação, especialmente, à Roberta, Mônica, Larissa, João, Jorge e Alejandra pela cumplicidade, amizade e convivência agradabilíssima e conhecimentos compartilhados. Adoro vocês!

Aos alunos da Capacitação Profissional em Periodontia, Lucas, Luíza e Martha, pela amizade, momentos de ajuda e de descontração.

À Eliene e Leuci, do Setor de Triagem, que ajudaram na seleção dos pacientes para a realização deste trabalho.

Aos meus pacientes, que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho e para o meu enriquecimento profissional.

À minha Família, o pilar da minha vida, formadores do meu caráter e dos meus princípios, a qual teve que conviver com a saudade e a distância, porém nunca deixaram de me incentivar e apoiar as minhas escolhas e que sempre torceram por mim na minha caminhada, eu amo vocês.

Aos meus sobrinhos, Rafael e Gabriel, anjos que Deus me permitiu ter nessa vida pra alegrar o meu coração, aos quais me apegava em pensamento para continuar a trajetória, como eu amo vocês.

Ao meu querido, Jefferson, por ter me acompanhado nesta trajetória, abdicando da companhia diária em prol da minha realização pessoal e profissional, agradeço sempre a atenção, carinho, admiração, companheirismo e por me deixar fazer parte da sua vida, os meus agradecimentos se estendem à toda sua família, que pôde assistir a minha caminhada.

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante”

Paulo Coelho

RESUMO

Enxertos gengivais livres são importantes para garantir condições necessárias para o estabelecimento da homeostasia do periodonto de proteção. O processo de inflamação não ocorre por igual em todos os tecidos conjuntivos do organismo e os fibroblastos têm a capacidade de reagir a estímulos agressivos por meio de liberação de diversas citocinas, que desempenham importante função na formação do infiltrado inflamatório. Até o presente trabalho, não há relatos na literatura acerca da comparação do comportamento dos fibroblastos que compõem a mucosa palatina não marginal e dos fibroblastos provenientes de enxerto gengival livre (EGL) marginal em resistir aos estímulos agressores que ocorrem na doença periodontal. Dessa forma, a proposta do presente trabalho foi investigar se os fibroblastos da mucosa palatina não marginal mudariam seu perfil de secreção de citocinas quando enxertados na margem gengival. Foram coletadas biópsias da mucosa palatina no momento da cirurgia de EGL (período inicial) e após 4 meses (período final) no momento da cirurgia para recobrimento radicular. Os fibroblastos foram cultivados e estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis* (**Pg**) e de *Escherichia coli* (**Ec**) por 24h e 48h para avaliação comparativa da expressão de citocinas e mediadores do reparo tecidual, como: IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16. As citocinas foram quantificadas no sobrenadante das células por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para a citocina IL-6, os fibroblastos da mucosa palatina não marginal mantiveram o mesmo perfil de secreção quando enxertados na área gengival marginal; para MIP-1 α a secreção se mostrou aumentada de forma estatisticamente significativa pelos fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal após 48h de estímulo por **Pg** em comparação com os fibroblastos da área palatina não marginal; a secreção de IL-8 pelos fibroblastos da mucosa palatina não marginal foi maior em resposta ao desafio por LPS de **Pg** e os fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal exibiram secreção até mesmo sem o estímulo de LPS; apenas os fibroblastos do enxerto gengival marginal apresentaram secreção de TGF- β , mesmo na ausência de estímulo por LPS; a secreção de VEGF e CXCL16 não foi detectada pelos fibroblastos analisados. Conclui-se que os fibroblastos provenientes de uma mucosa palatina não marginal parecem se adaptar às condições locais quando enxertados na área gengival marginal, oferecendo evidência de sua participação efetiva na produção de mediadores inflamatórios importantes para o processo de homeostasia do periodonto marginal.

Palavras-chave: Gengiva. Periodontite. Fibroblastos. Citocinas.

ABSTRACT

Comparative evaluation of the adaptive behavior between cultivated fibroblasts from human palatal mucosa and from gingival graft in marginal area

Free gingival grafts are important to ensure conditions for the establishment of homeostasis of the periodontal soft tissues. The process of inflammation does not occur the same way in all connective tissues and fibroblasts have the ability to respond to aggressive stimuli through the release of various cytokines, which play an important role in the inflammatory infiltrate formation. In literature, there are no studies comparing the behavior of fibroblasts from palatal mucosa (not marginal) and fibroblasts from marginal free gingival graft (FGG) regarding their resistance towards periodontal disease aggressive stimuli. Thus, the purpose of this study was to investigate whether fibroblasts from the palatal mucosa behave differently when grafted to the gingival margin considering their mechanism of cytokine secretion. Biopsies from the palatal mucosa were collected at the time of FGG surgery (initial period) and after 4 months (final period) when surgery for root coverage was performed. The fibroblasts were cultured and stimulated with LPS of *Porphyromonas gingivalis* (**Pg**) and *Escherichia coli* (**Ec**) for 24 and 48 hours in order to make a comparative evaluation of cytokines and mediators of tissue repair expression, such as IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF and CXCL16. Cytokines were measured in the cell supernatant by enzyme immunoassay (ELISA). For cytokine IL-6, fibroblasts from palatal mucosa maintained the same secretion pattern when grafted to the gingival margin; for MIP-1 α the secretion was significantly increased by fibroblasts from the marginal gingival graft after 48 hours of stimulation with Pg when compared to palatal mucosa fibroblasts; IL-8 secretion by palatal mucosa fibroblasts did not increase in response to **Pg** LPS challenge and fibroblasts from marginal gingival graft showed secretion even without the stimulus of LPS; only fibroblasts from marginal gingival graft showed secretion of TGF- β , even in the absence of LPS stimulation; VEGF and CXCL16 secretion by fibroblasts was not detected. It was concluded that fibroblasts from palatal mucosa seem to adapt to local conditions when grafted to the gingival margin area, providing evidence of its effective participation in the homeostasis of marginal periodontium through the production of important inflammatory mediators.

Keywords: Gingiva. Periodontitis. Fibroblasts. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Imagens de um dos casos clínicos da fase inicial, referente à cirurgia de EGL para criação de MC43
- Figura 2 - Imagens de um dos casos clínicos da fase final, referente à cirurgia de recobrimento radicular.....45
- Figura 3 - Marcação celular da proteína FPS em fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) para confirmação da fenotipagem celular por Imunofluorescência, em um aumento de 63x.....55

- GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 24hs.....53
- Gráfico 2 - Análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 48hs.....54
- Gráfico 3 - Comparação entre os grupos (controle, **Pg** LPS e **Ec** LPS) para análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT em ambos os tempos de 24 e 48hs54
- Gráficos 4 - Secreção de IL-6 no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B).....59
- Gráficos 5 - Secreção de IL-8 no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B).....62
-

Gráficos 6 - Secreção de MIP-1 α no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de Pg (A) e de Ec (B).....	65
Gráficos 7 - Secreção de TGF- β no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de Pg (A) e de Ec (B).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina IL-6 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Pg	57
Tabela 2 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina IL-6 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Ec	58
Tabela 3 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da quimiocina IL-8 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Pg	60
Tabela 4 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da quimiocina IL-8 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Ec	61
Tabela 5 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina MIP-1 α secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Pg	63
Tabela 6 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina MIP-1 α secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Ec	64
Tabela 7 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina TGF- β secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Pg	66
Tabela 8 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina TGF- β secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de Ec	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .
BSA	albumina do soro bovino.
CPS	polissacarídeo capsular.
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol - fluoróforo orgânico de ácido nucleico.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> - Meio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
Ec	<i>Escherichia coli</i> .
EGL	Enxerto gengival livre.
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> – Ensaio imuno-enzimático.
et al	e colaboradores.
FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo.
FPS	marcador de superfície de fibroblasto.
IL	Interleucina
JCE	junção cimentoesmalte.
LPS	Lipopolissacarídeo.
MC	mucosa ceratinizada.
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> - Proteína inflamatória para macrófago.
MTT	Ensaio colorimétrico para medir a atividade enzimática.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão fosfato salina.
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i> .
PMN	polimorfonucleares.
RPC	retalho posicionado coronalmente.
RPL	retalho posicionado lateralmente.
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de crescimento transformador.
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de necrose tumoral.
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Fator de crescimento vascular endotelial.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Enxerto Gengival Livre e a Importância da Mucosa Ceratinizada.....	25
2.2	Doença periodontal e a resposta dos fibroblastos frente aos estímulos agressores.....	29
2.3	O papel das citocinas IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3 e mediadores de reparo TGF- β , VEGF e CXCL16	31
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Coleta das amostras de mucosa palatina (área doadora; período inicial) e do enxerto gengival marginal (área receptora; período final).....	41
4.2	Cultura de fibroblastos.....	47
4.3	Estimulação dos fibroblastos de mucosa palatina e do enxerto gengival marginal por LPS de <i>Porphyromonas gingivalis</i> e <i>Escherichia coli</i>	47
4.4	Avaliação da viabilidade celular através de ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene OR).....	47
4.5	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	48
4.6	Imunofluorescência.....	49
4.7	Análise Estatística.....	49

5	RESULTADOS	51
5.1	Análise da atividade enzimática celular pela técnica do MTT	53
5.2	Confirmação do fenótipo fibroblástico das células cultivadas por imunofluorescência.....	55
5.3	Deteção da secreção de IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16 por fibroblastos provenientes da mucosa palatina não marginal (período inicial) e por fibroblastos obtidos de enxertos gengivais da margem vestibular (período final) por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	57
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS.....	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Cirurgias mucogengivais, atualmente nomeadas de cirurgias plásticas periodontais, são procedimentos cirúrgicos que visam a correção de defeitos na morfologia, posição e/ou quantidade de gengiva ao redor de dentes, ou seja, corrigir ou eliminar deformidades anatômicas, de desenvolvimento ou traumáticas da gengiva e da mucosa alveolar (CONSENSUS REPORT, 1996; WENNSTRÖM, 1996), visto que o papel fisiológico primordial do complexo mucogengival é proteger os tecidos periodontais subjacentes, pois representa uma barreira física entre o meio interno e o meio externo.

De acordo com a Academia Americana de Periodontia, as cirurgias plásticas periodontais possuem indicação para promover o aumento gengival, criando uma profundidade de vestíbulo adequada em sítios com inserção anômala de freios e faixa de gengiva inserida inadequada (GREENWELL et al., 2005), facilitando o posicionamento apropriado da escova dental, proporcionando o conforto e manutenção do procedimento de higienização oral (BAINS et al., 2011).

O aumento da faixa de mucosa ceratinizada, que é medida da margem gengival à linha da junção mucogengival, em milímetros, realizado através de procedimentos cirúrgicos plásticos periodontais, possui alta taxa de sucesso, principalmente quando se leva em consideração o ganho em espessura de tecido gengival (WENNSTRÖM, 1996) e redução da quantidade de raiz exposta com diminuição da hiperestesia dentinária, que pode acontecer tanto em casos que se tem como objetivo principal o recobrimento radicular, ou apenas o simples ganho de gengiva inserida (AGUDIO et al., 2008; BAINS et al., 2011).

A técnica cirúrgica de enxerto gengival livre (EGL), epitélio-conjuntivo, é um tipo de cirurgia plástica periodontal, amplamente utilizada e a mais previsível, que tem como objetivo primário criar uma faixa adequada de gengiva inserida, tanto em altura como em espessura (HAERI & SERIO, 1999). É um procedimento altamente versátil, com potencial ilimitado, para prevenção e tratamento de recessões gengivais (MATTER, 1982). Esta técnica cirúrgica pode ser utilizada para casos de recobrimento radicular em uma única etapa (NABERS, 1966) ou em duas etapas, na qual se estabelece, primeiramente, uma maior faixa de gengiva ceratinizada,

seguido de posterior posicionamento coronal do retalho para recobrir a recessão (HARVEY, 1970; BERNIMOULIN et al., 1975).

A vantagem e a necessidade da presença de tecido ceratinizado na manutenção da saúde periodontal ainda é discutida. Entretanto, diversos estudos mostram que a presença de uma faixa adequada de gengiva inserida, tanto em altura como em espessura, promove a estabilização gengival, auxiliando o selamento da margem gengival ao dente, favorecendo a saída do fluido gengival via sulco, e todos esses aspectos em conjunto ajudam na diminuição da penetração de bactérias pela formação de placa bacteriana em casos de higienização oral inadequada, principalmente, ou pela presença de restaurações subgengivais (LANG & LÖE, 1972; STETLER & BISSADA, 1987; LAGOS, 2003; RESENDE, 2004).

As indicações do recobrimento radicular pela técnica do EGL são idênticas às outras técnicas de recobrimento, com exceção das áreas estéticas, já que o EGL promove como resultado cicatricial, uma gengiva com aspecto “quelóide” (HARRIS, 2001). Entretanto, as indicações clássicas são sítios que apresentam desnudações radiculares com ausência de gengiva inserida, tendo-se a necessidade de aumentar ou criar um tecido ceratinizado em altura e em espessura, e esta forma de tratamento proporciona resultados de recobrimento radicular na ordem de 11 a 100%, dependendo das dimensões das recessões e das características anatômicas presentes (WENNSTRÖM, 1996; HARRIS, 2001).

Quando um tecido ceratinizado se encontra presente apicalmente à recessão gengival e proporciona uma gengiva mais espessa, todas as técnicas para recobrimento radicular são aplicáveis, pois uma gengiva mais espessa aumenta a previsibilidade e a taxa de sucesso do recobrimento radicular total, já que um aporte tecidual é proporcionado (BALDI et al., 1999; DA SILVA et al., 2004; HWANG & WANG, 2006). Assim, pode-se empregar a técnica de retalho posicionado coronalmente (RPC), em uma única ou em uma segunda fase cirúrgica no tratamento de recessões gengivais, que proporciona um recobrimento radicular um pouco superior ao retalho posicionado lateralmente (RPL) (SANTANA et al., 2010).

Assim, independente do procedimento cirúrgico executado para o recobrimento radicular, a importância do resultado em longo prazo é a eliminação ou controle dos fatores etiológicos do desenvolvimento da recessão gengival, como escovação traumática e inflamação gengival induzida por placa (WENNSTRÖM, 1996).

A exposição do tecido gengival à placa bacteriana resulta na inflamação do tecido, que manifesta sinais clínicos de alterações de cor, tamanho, forma, consistência e sangramento do sulco gengival, que pode ocorrer durante a escovação, com possibilidade de perdas ósseas alveolares como resultado da progressão da doença periodontal (MARIOTTI, 1999). O efeito cumulativo desses eventos patológicos repetitivos à gengiva pode levar ao aparecimento ou progressão de recessões gengivais (LÖE et al., 1992; KASSAB & COHEN, 2003; TOKER et al., 2009), principalmente em situações com uma faixa estreita ou ausente de gengiva inserida. Os sinais clínicos são decorrentes de alterações vasculares, como mudanças na permeabilidade das paredes dos vasos, acarretando em troca de fluidos e de células entre o sangue e o tecido conjuntivo, o qual acaba por apresentar destruição das fibras colágenas, as quais compõem grande parte do volume tecidual, sendo que os fibroblastos são os principais responsáveis pela produção dos vários tipos de fibras encontradas e com participação direta na síntese da matriz do tecido conjuntivo (BARTOLD et al., 2000).

Sendo assim, o fato da inflamação não ocorrer por igual em todos os tecidos conjuntivos do organismo e pelas evidências de que o fibroblasto do tecido gengival é capaz de reagir a estímulos diversos por meio da liberação de citocinas, dentre elas quimiocinas, que desempenham importante função na formação do infiltrado inflamatório (BARTOLD et al., 2000; MORANDINI et al., 2010, 2011), torna-se necessário conhecer se os fibroblastos, antes presentes na mucosa palatina, onde não estavam expostos aos estímulos agressores que ocorrem na doença periodontal, sofrem algum tipo de modificação quanto ao perfil de secreção de mediadores da inflamação e reparo, quando são enxertados na margem gengival, por meio de um EGL.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxerto Gengival Livre e a Importância da Mucosa Ceratinizada:

A gengiva é parte da mucosa mastigatória que recobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Ela é dividida em gengiva marginal livre, que se estende a partir da margem gengival em direção apical até a ranhura gengival livre, a qual se acha posicionada em um nível correspondente à junção cimento-esmalte (JCE), e gengiva inserida, com textura firme, segue da margem gengival em direção apical até a junção mucogengival, onde se torna contínua com a mucosa alveolar (SCHROEDER et al., 1997).

A mucosa ceratinizada (MC), ou gengiva ceratinizada, compreende a faixa de tecido mole recoberto por epitélio ceratinizado, estendendo-se da margem gengival até a linha da junção mucogengival, composta por um tecido conjuntivo denso e rico em fibras colágenas (CONSENSUS REPORT, 1996). Apesar da faixa de mucosa ceratinizada e gengiva inserida serem determinadas geneticamente, elas podem ser afetadas pela presença de placa bacteriana associada à inflamação ou pela intervenção de ações mecânicas (MARQUEZ, 2004).

A presença de uma faixa estreita de mucosa ceratinizada não pode, por si só, justificar a intervenção cirúrgica (MIYASATO et al., 1977). O aumento gengival deve ser considerado em situações nas quais o paciente possui uma faixa estreita de mucosa ceratinizada com um biotipo periodontal fino e controle inadequado da higiene oral (LANG & LÖE, 1972; MAYNARD & WILSON, 1980). Quando o movimento dentário ortodôntico é planejado e pode-se esperar que o posicionamento final do dente resulte em deiscência do osso alveolar, um aumento da espessura do periodonto de proteção pode reduzir o risco de desenvolvimento de recessão gengival (COATOAM et al., 1981; NEWMAN et al., 1994). Um aumento da espessura da margem gengival também pode ser considerado quando restaurações subgengivais são colocadas em áreas com um delgado tecido marginal, visto que restaurações com margens subgengivais podem resultar em retração do tecido mole ao longo do tempo (STETLER & BISSADA, 1987). A espessura da gengiva marginal, ou mucosa ceratinizada, influencia a magnitude da recessão que acontece em

consequência do trauma mecânico direto durante a escovação e o acúmulo de placa (LANG & LÖE, 1972; TENENBAUM, 1982; KENNEDY et al., 1985). Logo, para impedir a recessão progressiva do tecido marginal, um aumento gengival está indicado (CONSENSUS REPORT, 1996).

O trabalho de Lang e Løe (1972) procurou estabelecer uma relação entre largura de mucosa ceratinizada e saúde gengival após avaliar a condição gengival de 1.406 faces vestibulares e linguais de 32 indivíduos após seis semanas de higienização supervisionada, utilizando como critérios de avaliação o índice gengival e o índice de placa. Os resultados mostraram que uma faixa estreita é compatível com saúde gengival, entretanto, verificou-se que a inflamação persistia em áreas com menos de 2 mm de mucosa ceratinizada, independentemente da higienização oral do paciente. Como conclusão, eles sugeriram que 2mm de mucosa ceratinizada, com pelo menos 1mm de gengiva inserida, seria uma quantidade adequada para a manutenção da saúde gengival.

Maynard e Wilson (1979) afirmaram que cerca de 5 mm de mucosa ceratinizada, sendo 2 mm de gengiva livre e 3 mm de gengiva inserida, seria necessária se a margem da restauração ficar subgengivalmente, aumentando, assim, a previsibilidade de sucesso do tratamento. Entretanto, a espessura do tecido ceratinizado também deve ser avaliada, pois a dimensão vertical do tecido não necessariamente indica que o tecido é suficientemente espesso para tolerar o posicionamento subgengival das restaurações.

Outro estudo (STETLER & BISSADA, 1987) com o objetivo de avaliar a condição periodontal de dentes com restaurações subgengivais em 58 dentes de 26 indivíduos, mostrou que em dentes com restaurações subgengivais e uma faixa estreita de mucosa ceratinizada tiveram índice gengival significativamente maior do que dentes com restaurações subgengivais e uma faixa mais larga de mucosa ceratinizada. Os dentes que não possuíam restaurações subgengivais não diferiram estatisticamente quanto à quantidade de mucosa ceratinizada. Dessa forma, o estudo sugeriu que pacientes que receberem restaurações subgengivais em áreas com faixa estreita de mucosa ceratinizada, e que não conseguem manter um nível ótimo de controle de placa, uma cirurgia para aumento da faixa de gengiva se torna desejável.

O estudo de Dorfman et al. (1980) observou que gengiva inserida com menos de 1 mm é adequada quando a inflamação está sobre controle. Já o estudo de

Schrott et al. (2009), que investigou a influência da mucosa ceratinizada na saúde e estabilidade do tecido mole peri-implantar ao longo prazo de um período de avaliação de 5 anos, mostrou que sítios vestibulares com uma faixa estreita de mucosa ceratinizada exibiram recessões peri-implantares e que a presença de pelo menos 2 mm de mucosa ceratinizada se mostrou vantajosa, concluindo que pacientes que possuíam uma boa higienização oral e recebiam regularmente terapia de manutenção, uma faixa de 2 mm de mucosa ceratinizada se mostrou benéfica na redução do acúmulo de placa e sangramento lingual peri-implantar como também de recessão vestibular em implantes com próteses fixas tipo protocolo.

O aumento da largura de gengiva inserida é indicado em áreas com perda constante de inserção (HAERI & SERIO, 1999), assim como para aumento de rebordo edêntulo, no qual houve reabsorção da crista óssea de forma desarmoniosa e grave, a fim de facilitar a confecção de próteses fixas ou removíveis, ou até de futuras próteses sobre implantes, que atenda aos requisitos de função, fonética e estética (CONSENSUS REPORT, 1996).

Mudanças de quantidade de mucosa ceratinizada e de posição da margem gengival em sítios tratados com procedimentos de enxerto de gengiva foram relatadas em diversos estudos. O trabalho de Agudio et al. (2008) mostrou que após cirurgia de enxerto gengival livre e de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, através de um acompanhamento dos casos por um período de 10 a 25 anos, houve aumento da faixa de mucosa ceratinizada com redução de recessões gengivais ao longo do tempo nos sítios tratados, onde antes havia uma associação de ausência de gengiva inserida com recessões gengivais. A migração coronal da margem gengival ocorreu 1 ano após o procedimento cirúrgico e uma migração adicional foi observada durante o período de acompanhamento do estudo. Este fato foi atribuído ao que se chama de “creeping attachment”, uma migração “pós-operatória” da margem gengival na direção coronal em raízes antes desnudas, que ocorre entre 1 mês e 1 ano após procedimento cirúrgico, mas que no presente estudo não parou de migrar após 1 ano. O estudo mostrou também que a cirurgia de enxerto gengival livre levou a um maior creeping attachment (0,8mm) do que a cirurgia de enxerto de conjuntivo subepitelial (0,5mm). Periodonto marginal fino não tratado, associado ou não a recessões gengivais, mesmo com saúde periodontal, pode submeter-se a uma migração apical da margem gengival, aumentando a recessão presente ou

desenvolvendo uma, por isso cirurgias para aumento da faixa de mucosa ceratinizada são indicadas (AGUDIO et al., 2009).

Atualmente, há diversas técnicas cirúrgicas que podem ser executadas com a finalidade de aumentar o tecido gengival tanto em altura como em espessura (HARRIS, 2001; THOMA et al., 2009). Dentre elas, tem os enxertos gengivais livres, de epitélio-conjuntivo, que foram inicialmente descritos por Bjorn (1963) e sedimentados por meio dos fundamentos biológicos de Sullivan & Atkins (1968). São usados para criar uma zona mais larga de gengiva inserida tanto em qualidade quanto em quantidade na área marginal, importante para garantir condições mínimas necessárias e suficientes para o estabelecimento da homeostasia do periodonto de proteção (GRIFFIN et al., 2006).

O trabalho de Harris (2001) comparou a capacidade de três técnicas cirúrgicas diferentes em aumentar a faixa de mucosa ceratinizada, as quais eram cirurgia de enxerto gengival livre, enxerto de tecido conjuntivo subepitelial e enxerto com matriz dérmica acelular. Pode-se concluir que os três tipos de técnicas cirúrgicas empregadas aumentaram a faixa de mucosa ceratinizada sem diferença estatisticamente significativa. Entretanto, a cirurgia de enxerto gengival livre foi, dentre as técnicas cirúrgicas empregadas no estudo, a mais simples e a que menos consumiu tempo.

Para a realização da técnica, uma área doadora intra-oral é necessária para a remoção do tecido autógeno podendo ser do palato duro, de áreas de rebordo edêntulo, da região retromolar e de tecidos removidos de áreas de gengivectomias ou gengivoplastias. A utilização de tecido autógeno pode trazer algumas complicações pós-operatórias e desconforto adicional ao paciente, já que há duas áreas cirúrgicas, riscos de acidentes hemorrágicos nas áreas doadoras, além da dificuldade de padronização da espessura do tecido, da diferença de cor/espessura que podem resultar em alterações estéticas nas áreas receptoras, e nos casos com várias áreas que necessitam de intervenção cirúrgica há a necessidade de grande disponibilidade de tecido doador aumentando os riscos relatados (RESENDE et al., 2009). As vantagens desse tipo de terapia incluem o alto grau de previsibilidade, simplicidade da técnica, capacidade de tratar vários dentes ao mesmo tempo, pode ser realizado quando a gengiva ceratinizada adjacente à área envolvida é insuficiente e possibilidade de recobrimento radicular, em um segundo estágio ou em um único estágio (HAERI & SERIO, 1999).

2.2 Doença periodontal e a resposta dos fibroblastos frente aos estímulos agressores:

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos, membros de espécies consideradas patógenos periodontais, que colonizam a superfície dentária supra ou subgengivalmente. São doenças relacionadas ao indivíduo, sendo que somente uma parcela passará pela destruição avançada que irá afetar vários dentes. A progressão da doença periodontal é contínua, com episódios curtos de exacerbação e remissão em sítios localizados (SOCRANSKY et al., 1984).

Um estudo clínico experimental mostrou que quando o indivíduo se abstém da limpeza mecânica dos dentes, os microrganismos começam a colonizar a superfície dentária rapidamente e em poucos dias sinais clínicos de inflamação gengival são perceptíveis. Entretanto, esse quadro inflamatório é reversível a partir do momento em que medidas adequadas de higiene oral são retomadas (LÖE et al., 1965). A gengivite se desenvolve a partir do acúmulo de placa bacteriana, que pode se limitar à área gengival por muito tempo ou progredir para uma doença periodontal destrutiva, ocasionando perda óssea alveolar, a partir de alterações na condição microbiológica que levam ao aumento da complexidade e heterogeneidade da placa (LINDHE et al., 1975, DARVEAU et al., 1997).

A periodontite crônica se caracteriza, clinicamente, pela perda de inserção, perda óssea alveolar, formação de bolsas periodontais, inflamação gengival, sangramento e mobilidade dentária a partir de endotoxinas produzidas pelos microrganismos presentes na bolsa periodontal (FLEMMIG, 1999). A doença se desenvolve como resultado da resposta inflamatória mediada pelo hospedeiro frente a uma microflora patogênica que reside nas bolsas periodontais (DARVEAU et al., 1997). *Porphyromonas gingivalis* (**Pg**) é um dos patógenos periodontais frequentemente isolado de bolsas periodontais de pacientes com doença periodontal agressiva ou crônica (WANG & OHURA, 2002). Isolados dessa espécie são bastonetes anaeróbicos, não-móveis, Gram-negativos, que geralmente exibem morfologia de cocos ou bastonetes pequenos, formando colônias de pigmento castanho a negro (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; SOUKOS et al., 2005). É considerado o maior agente causador da doença periodontal (BRUNNER, 2010;

OUHARA et al., 2012). O lipopolissacarídeo (LPS) da *Porphyromonas gingivalis* é o fator chave no desenvolvimento da periodontite (WANG & OHURA, 2002) e um de seus fatores de virulência é o polissacarídeo capsular (CPS) que atua na interface patógeno-hospedeiro, reduzindo a resposta imune pró-inflamatória e permitindo que a bactéria invada o sistema imune do hospedeiro (BRUNNER, 2010). A reabsorção do osso alveolar e perda dentária podem ser consequências finais da doença periodontal destrutiva (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994).

Tem sido demonstrado que os fibroblastos estão envolvidos na resposta imune e inflamatória do hospedeiro na periodontite. Eles estão entre as primeiras células encontradas em infecções periodontais por bactérias anaeróbicas como *Porphyromonas gingivalis*, sendo estimulados a liberar citocinas inflamatórias (BRUNNER et al., 2010).

Os fibroblastos são considerados importantes células nesse contexto, pois são as células predominantes do tecido conjuntivo do periodonto e estão relacionadas com a síntese de vários tipos de fibras, como as fibras elásticas, fibras colágenas e síntese da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Esta característica parece ser consistente para todos os “tipos” de fibroblastos, porém com uma variação nos tipos e quantidades de proteínas sintetizadas na matriz que ocorre de acordo com o tecido de origem e a função da célula dentro do tecido. Essas células estão localizadas entre as fibras, exercendo um papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e reparo do tecido conjuntivo gengival. *In vitro*, estas células podem variar, ligeiramente, nas suas aparências, incluindo uma maior expressão de microfilamentos intracelulares, nas fibras e no contato íntimo célula-célula através de junções tipo gap. As diferenças nas populações de fibroblastos identificados dentro dos tecidos e em cultura de tecidos, indicam uma variabilidade das características, incluindo a morfologia, ultraestrutura, proliferação, comportamento migratório, síntese da matriz e resposta à fatores de crescimento e citocinas. (BARTOLD et al., 2000; MORANDINI et al., 2010).

O processo de inflamação não ocorre por igual em todos os tecidos conjuntivos do organismo. Os fibroblastos têm a capacidade de reagir a estímulos agressivos por meio de liberação de diversas citocinas, dentre elas as quimiocinas que desempenham importante função na formação do infiltrado inflamatório (TAMURA et al., 1992; MORANDINI et al., 2010, 2011, 2012). Além disso, são células sensíveis às próprias citocinas e a fatores de crescimento (BARTOLD et al.,

2000). Podem interagir diretamente com bactérias e seus fatores de virulência, incluindo o LPS, em lesões periodontais. Fibroblastos gengivais assim como fibroblastos do ligamento periodontal expressam receptores aos quais o LPS de **Pg** se liga, ativando vários sistemas segundo-mensageiros, estimulando a liberação de citocinas inflamatórias como as interleucinas IL-6 e IL-8, principalmente via toll-like 2 (TLR2) (MORANDINI et al., 2012, 2012), como também fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e MIP-1 α (WANG & OHURA, 2002; MORANDINI et al, 2010).

2.3 O papel das citocinas IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3 e mediadores de reparo TGF- β , VEGF e CXCL16:

A inflamação é uma resposta protetora local contra invasão bacteriana ou injúria, durante a qual mediadores celulares como as citocinas, dentre elas as interleucinas e quimiocinas, são liberadas e capazes de reagir com receptores específicos das membranas celulares. As citocinas ao interagir com receptores de superfície podem induzir fenômenos diferentes e até mesmo antagônicos em células morfológica e funcionalmente diferentes. A interpretação da mensagem vai depender da célula alvo, ou seja, da via metabólica a ser ativada em um determinado tipo celular (CONSOLARO, 2009).

As quimiocinas e seus receptores são reguladores chave na migração leucocitária tanto em condições inflamatórias como também homeostáticas. A regulação de respostas dependentes de quimiocinas, principalmente relativas à inflamação, é essencial para se evitar o desenvolvimento de patologias inflamatórias e autoimunes (GRAHAM & LOCATI, 2013).

MIP (Proteína inflamatória para macrófago) -1 α /CCL3, da família de quimiocinas CC, é uma citocina pro-inflamatória que possui um importante papel na indução e modulação das respostas imune e inflamatória (MORANDINI et al., 2010), sendo um potente quimiotático para células mononucleares (LAING et al., 2004). Células epiteliais de tecido gengival inflamado são capazes de secretar essa quimiocina, promovendo o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) nas fases iniciais da doença. Esses mesmos leucócitos podem ser estimulados por LPS bacteriano e outras citocinas, como IL-1 β , a expressar mais quantidades de

MIP-1 α /CCL3 auxiliando no recrutamento e retenção de PMN para o sulco gengival (RYU et al., 2007). Outros tipos celulares, como os fibroblastos gengivais, podem produzir e secretar MIP-1 α /CCL3 (MORANDINI et al., 2010) em tecidos periodontais de paciente com periodontite agressiva, implicando na quimioatração de monócitos circulantes que expressam receptores para essa quimiocina (GARLET et al., 2003).

Tipos celulares da gengiva inflamada expressam RNA mensageiro (RNAm) de citocinas inflamatórias, sugerindo o envolvimento desses mediadores no início e progressão da doença periodontal. IL-1, IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α são exemplos típicos de citocinas multifuncionais que estão envolvidas na regulação da resposta imune e da inflamação (MATSUKI et al., 1992).

IL-6 é uma citocina que atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células, em resposta a microrganismos e a outras citocinas, como por exemplo, IL-1 e TNF- α . É conhecida por ser um dos maiores mediadores na regulação da resposta imune frente à inflamação (HEINRICH et al., 1990; ROTHWELL, 1991). Quando os fibroblastos são desafiados por LPS de **Pg** eles são capazes de liberar diversos mediadores, como IL-6, MIP- α , SDF-1 (EKHLASSI et al., 2008; MORANDINI et al., 2010), IL-8 (ARA et al., 2009; THANUJA et al., 2011), IL-1 β (SCHERES et al., 2010) e TGF- β (MORANDINI et al., 2011). IL-6 tem o maior número de tipos celulares produtores: células T e B, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. A IL-6 induz a maturação de células B em células secretoras de imunoglobulinas (MATSUKI et al., 1992).

A citocina IL-8/CXCL8 é uma quimiocina CXC que recruta células de defesa para áreas onde elas são necessárias e são importantes nas respostas mediadas por células (LAING et al., 2004). Essa quimiocina se liga com alta afinidade a dois receptores: CXCR1 e CXCR2, estimulando a migração celular (THELEN, 2001). É quimiotática para basófilos, estimulada por citocinas, eosinófilos e linfócitos T de sangue periférico. Promove a adesão de neutrófilos às células endoteliais e migração subsequente para os locais da inflamação (LAING et al., 2004). Atua como citocina pró-inflamatória, ajudando a formar a primeira barreira de defesa do hospedeiro (ZEHNDER et al., 1999) e tem sido descrita como a principal e potente quimiotática para neutrófilos (BICKEL et al., 1996; THELEN, 2001). Desempenha um papel de mediadora inicial da doença periodontal devido à quimiotaxia para neutrófilos (MATSUKI et al., 1992). Fontes de IL-8 incluem células sanguíneas e

células do tecido conjuntivo. Monócitos e macrófagos, células T e também neutrófilos pode ser induzidos a produzir IL-8 (BICKEL et al., 1996), assim como fibroblastos gengivais e fibroblastos do ligamento periodontal (ARA et al., 2009; SCHERES et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; THANUJA et al., 2011; ARA et al., 2012).

O TGF- β (Fator de crescimento transformador – β) é uma proteína que controla a proliferação e diferenciação celular. Algumas células, como fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (MORANDINI et al., 2011), secretam e também possuem receptores para TGF- β . É uma proteína secretada que existe em três isoformas chamada TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. O TGF- β liberado por fibroblastos possui tanto efeito autócrino como parácrino que promove a síntese de colágeno (NISHI et al., 2010). É um polipeptídeo multifuncional potente, abundante na matriz óssea, que estimula fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal a expressar e produzir IL-11, uma citocina pleitrópica com efeitos em múltiplas células (YASHIRO et al., 2006), além de induzir a expressão de pró-colágeno tipo I, molécula precursora para colágeno tipo I, em fibroblastos gengivais (ARANCIBIA et al., 2012). A expressão de TGF- β por fibroblastos gengivais está também relacionada a eventos moleculares associados ao crescimento gengival induzido por ciclosporina e a super-expressão de Smad7, um inibidor da sinalização de TGF- β , é eficaz no bloqueio desses eventos, incluindo a proliferação celular, síntese de colágeno tipo I e MMP2 (SOBRAL et al., 2012).

O processo de formação de novos vasos sanguíneos é necessário para o funcionamento normal do organismo, inclusive na patogênese de diversas doenças e desordens malignas e inflamatórias. O VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) é um dos principais estimuladores da formação de novos vasos, sendo produzido por células como osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal. VEGF induz a angiogênese através da formação de estruturas tubulares e proliferação de células endoteliais linfáticas, através de receptores específicos, desempenhando um papel essencial na reparação e regeneração tecidual. No entanto a super-expressão de VEGF tem participação patológica na iniciação e progressão da destruição dos tecidos (NISHI et al., 2010; AGIS et al., 2011).

Derivado de matriz de esmalte, um potente agente terapêutico de origem porcina utilizado para promoção da regeneração de tecidos periodontais, também

induz a secreção de VEGF via TGF- β 1 e FGF-2 por fibroblastos gengivais, auxiliando na cicatrização periodontal através da angiogênese (SAKODA et al., 2012). Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α e TNF- α , induzem a expressão de mRNA de VEGF em fibroblastos gengivais e de polpa, sendo que IL-1 α é mais efetivo em induzir a expressão gênica de VEGF por fibroblastos gengivais, contribuindo parcialmente para a destruição dos tecidos pulpare e periapicais a medida que a expansão da rede vascular ocorre em conjunto com a progressão da inflamação (CHU et al., 2004). Isso demonstra que a capacidade do VEGF em aumentar a permeabilidade vascular contribui para a extensão da inflamação, além do que, tecidos inflamados aumentam a expressão de mediadores inflamatórios, que por sua vez podem promover a angiogênese (JOHNSON et al., 1999).

CXCL16 é uma quimiocina expressa na forma solúvel ou como proteína transmembrana por fibroblastos gengivais humanos, que possui produção controlada por citocinas na doença periodontal com capacidade de induzir a proliferação de fibroblastos gengivais, migração de leucócitos para os tecidos inflamados, assim como também a migração de células T helper 1 e natural killer, desempenhando um papel importante na patogênese e remodelação dos tecidos periodontais doentes (HOSOKAWA et al., 2007, 2009). A expressão de mRNA de CXCL16 é induzida por citocinas, como IFN-gamma e TNF- α e secretada através da ação do ADAM10, a partir do qual a expressão e a função do CXCL16 é controlada nos tecidos inflamados (ABEL et al., 2004). Existe uma correlação significativa entre doença periodontal e níveis sistêmicos de IL-8 e CXCL16 em pacientes submetidos à angiografia coronariana (SCHALLHORN et al., 2010).

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo da presente pesquisa foi comparar a resposta dos fibroblastos obtidos da área palatina não marginal, onde não há contato íntimo com estímulos agressores bacterianos da doença periodontal (correspondendo ao período inicial) com a resposta de fibroblastos obtidos das áreas enxertadas na margem vestibular (através de enxerto gengival livre, epitélio-conjuntivo), onde os estímulos agressores bacterianos da doença periodontal estão íntimos e continuamente presentes (correspondendo ao período final), quanto à produção de citocinas e mediadores do reparo. Especificamente, o objetivo foi:

- Avaliar se os fibroblastos cultivados da mucosa palatina não marginal (área doadora; período inicial) sofrem modificação quanto ao perfil de secreção dos mediadores da inflamação (IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3) e reparo (TGF- β , VEGF e CXCL16), quando o tecido é enxertado na margem gengival vestibular (área receptora; período final).
-

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras de mucosa palatina (área doadora; período inicial) e do enxerto gengival marginal (área receptora; período final):

Foram selecionados para este estudo 3 (três) pacientes que procuraram tratamento nas clínicas da Disciplina de Periodontia, do Departamento de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB-USP). O tamanho da amostra foi estipulado conforme a literatura presente (OUHARA et al., 2012) e também sob a orientação de um estatístico. Os pacientes foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal e radiográfico. Foram incluídos no estudo pacientes com idade entre 28 e 50 anos, que precisavam de procedimentos cirúrgicos para recobrimento radicular em áreas com ausência de mucosa ceratinizada, com a necessidade de criar uma faixa de gengiva ceratinizada, tanto em quantidade como em qualidade, em uma primeira fase cirúrgica a partir de um enxerto gengival livre, epitélio-conjuntivo (Figura 1) (SULLIVAN & ATKINS, 1968), e uma segunda fase com o procedimento de deslize coronal para o recobrimento radicular em si (Figura 2), e que apresentavam condições de saúde sem nenhuma complicação sistêmica que contraindicasse procedimentos cirúrgicos. Os critérios de exclusão compreenderam o não consentimento dos pacientes quanto à participação neste estudo, a presença de doença autoimune, diabetes mellitus, desordem pulmonar, renal ou cardiorrespiratória, doenças hematológicas, neoplasias, hepatite, usuários de drogas, que tivessem passado por tratamentos de quimioterapia, radioterapia ou terapia imunossupressora, que foram submetidos a transplante, fumantes ou que foram submetidos a algum tratamento nutricional.

A biópsia da mucosa palatina (período inicial), no tamanho de 3x3mm, foi obtida imediatamente após a remoção de um enxerto da área doadora palatina, correspondente à região de pré-molares, durante cirurgia de enxerto gengival livre, epitélio-conjuntivo. Essa biópsia foi removida do lado do enxerto mais distante da margem gengival (aproximadamente 9-10 mm distante da margem). Biópsias do enxerto gengival marginal (área receptora - gengiva marginal enxertada saudável – período final) foram obtidas da margem do tecido enxertado desses mesmos

doadores em uma segunda etapa cirúrgica, após 4 meses, na fase de cirurgia para recobrimento radicular, através do reposicionamento coronal do retalho, associado ao enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, com ancoragem do retalho na região papilar (procedimento padrão da técnica cirúrgica). A autorização para as biópsias foram formalizadas para os pacientes em documento específico devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP. As biópsias colhidas foram armazenadas imediatamente em meio para cultura de células – *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) com 20% de SBF (Soro Bovino Fetal). Os tecidos coletados foram picotados, com auxílio de tesoura para tecido e lâmina de bisturi número 15c, no menor tamanho possível, para o cultivo dos fibroblastos pela técnica de explants e imersos separadamente (mucosa palatina doadora e enxerto gengival marginal receptora) em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SBF acondicionado numa placa de Petri de 100x10mm (diâmetro x altura) e mantido a 37°C e 5% de CO₂.

Figura 1 (A-F) – Imagens de um dos casos clínicos da fase inicial, referente à cirurgia de EGL para criação de MC. A – imagem vestibular inicial do caso clínico, mostrando a área a ser submetida ao procedimento cirúrgico, correspondente ao dente 24 que exibia a margem gengival tracionada pela inserção alta de um freio. B – confecção do leito receptor. C – remoção do enxerto livre, epitélio-conjuntivo, a partir do qual a biópsia foi obtida para cultivo dos fibroblastos. D – Enxerto suturado no leito receptor. E – Pós-operatório após 10 dias. F – pós-operatório após 30 dias.

Figura 2 (A-H) – Imagens de um dos casos clínicos da fase final, referente à cirurgia de recobrimento radicular. A – imagem vestibular do caso inicial após 120 dias. B – confecção do leito receptor, sem incisões relaxantes. C – remoção da biópsia do enxerto da margem gengival, a partir da qual os fibroblastos foram cultivados. D – lavagem da biópsia para remoção da maior quantidade possível de sangue (o mesmo passo foi realizado na fase inicial). E – armazenamento imediato da biópsia em DMEM suplementado com 20% de SBF. F – remoção do enxerto de tecido conjuntivo do palato. G – retalho suturado. H – pós-operatório após 30 dias.

4.2 Cultura de fibroblastos:

As células foram obtidas pelo método de explante. Os tecidos provenientes de mucosa palatina (período inicial) e enxerto gengival marginal (período final) foram picotados com lâmina de bisturi nº15c (BD, São Paulo, Brasil), permanecendo imersos em meio de cultura DMEM suplementado com SBF 20% (Invitrogen, Califórnia, EUA), penicilina 100mg/mL, estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 0,5mg/mL (Invitrogen, Califórnia, EUA). Os fragmentos foram centrifugados, armazenados em novo meio de cultura e mantidos na incubadora a 37°C e a 5% de CO₂. As culturas foram mantidas até que os fibroblastos alcançassem confluência, com troca de meio a cada 2-3 dias. Após confluência, os fibroblastos foram tripsinizados e utilizados entre a 4^a e 8^a passagem (MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011).

4.3 Estimulação dos fibroblastos de mucosa palatina e do enxerto gengival marginal por LPS de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*:

As células foram distribuídas em duplicata de acordo com os grupos (controle, LPS de **Pg** e de **Ec**) em uma placa de 24 poços na concentração de 2x10⁴ células por poço e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂, durante 18h, para propiciar a adesão. O meio de cultura contendo 1µg/mL de LPS de **Pg** e 1µg/mL de LPS de **Ec** (Invivogen, San Diego, Califórnia), conforme protocolos já descritos na literatura (SUGIYAMA et al., 2000; MORANDINI et al., 2010), foi adicionado aos poços. Foram empregados os tempos experimentais de 24 e 48 horas.

4.4 Avaliação da viabilidade celular através de ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene OR):

Para análise da viabilidade celular, a partir da atividade enzimática após a estimulação, todos os poços foram lavados com PBS 1x para que o MTT pudesse ser incorporado aos grupos (controle, LPS de **Pg** e LPS de **Ec**) da placa e esta foi

incubada por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada (a 200 rcf, durante 7 minutos a uma temperatura de 21°C) e toda solução removida para adição de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Em uma nova placa de 96 poços, todos os grupos foram distribuídos em duplicata para a realização da leitura a 570 nm em leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA):

A secreção de IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16 solúvel foram quantificadas no sobrenadante das células usando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram incubadas com anticorpos de captura anti- IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16 diluídos em tampão PBS 1x. Após 18h, as placas foram lavadas com tampão de lavagem PBS tween 20 a 0,05% e bloqueadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com solução para bloqueio de PBS BSA 1%. As placas, após terem sido lavadas, foram incubadas com os sobrenadantes das células ou com quantidades conhecidas de IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16 recombinantes (curvas-padrão), durante 18h à 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo de detecção para cada alvo, durante 2 horas, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e após a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase as placas foram novamente lavadas e o substrato adicionado. De acordo com a mudança de coloração a solução de paralisação de reação (ácido sulfúrico 2N) foi adicionada e a leitura realizada em espectrofotômetro (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader. BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EUA) ajustado para o comprimento de onda de 450 nm. Os seguintes Kits de ELISA foram utilizados: para IL-6, IL-8 e MIP-1 α , R&D System (Minneapolis, MN, EUA), para TGF- β , eBioscience (San Diego, CA, EUA) e para VEGF e CXCL16, PeproTech (London, UK).

4.6 Imunofluorescência:

Para confirmação da fenotipagem dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (período inicial) e de enxerto gengival marginal (período final), as células foram semeadas em uma placa de 8 poços, com 1×10^4 células por poço, e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 18h para se aderirem em subconfluência. Posteriormente, os poços foram divididos em grupos (controle, **Pg** LPS, **Ec** LPS e controle negativo, o qual é sem o anticorpo primário), em duplicata, para estimulação das células. Após o período de incubação a 37°C com 5% de CO₂ por 18h, foi realizada a fixação com paraformaldeído 4% (durante 15 minutos) e os poços lavados 3 vezes com PBS 1x e incubados com PBS BSA 3% (30 minutos em temperatura ambiente), seguida da incubação com anticorpo monoclonal primário para marcação de superfície de fibroblastos diluído a 1:100, concentração final 2µg/mL, anti-proteína humana de superfície de fibroblastos (FSP; ab 11333, Abcam, Cambridge, UK), em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e depois com PBS BSA 3% (15 minutos) e incubados com o Anticorpo Secundário *Fluorescein Anti-Goat IgG* (H+L) (FI-5000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) na diluição de 1:200, por 1 hora à temperatura ambiente. Após 5 lavagens com PBS 1x, as lamínulas foram montadas com o meio de montagem VECTASHIELD *Hard-Set Mounting Medium with DAPI* (H-1500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e analisadas no microscópio confocal a laser (TCS model, SPE, Leica Mannheim, Germany).

4.7 Análise Estatística:

A análise estatística foi usada para avaliar a significância estatística das diferenças intra e intergrupos, assim como as alterações entre os períodos experimentais (24h e 48h). Valores de $P < 0,05$ foram considerados com indicativo de significância. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por meio da análise de variância a 1 critério (1 way-ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise da atividade enzimática celular pela técnica do MTT:

Foi avaliada a viabilidade celular, nos tempos de 24 e 48h, nos grupos controle (não estimulados) e testes (grupos estimulados com LPS de **Pg** e de **Ec**). No tempo de 24hs, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos testes e controle quanto à alteração da viabilidade celular (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 24hs ($P < 0,05$).

Já após 48hs, o grupo teste estimulado com LPS de **Ec** mostrou diminuição da viabilidade celular, enquanto o grupo teste estimulado com LPS de **Pg** não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 48hs. (*) diferença estatisticamente significativa, $P < 0,05$.

Na análise comparativa da atividade enzimática entre os tempos, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre 24h e 48h para todos os grupos (controle e estimulados) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Comparação entre os grupos (controle, **Pg LPS** e **Ec LPS**) para análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT em ambos os tempos de 24 e 48hs.

5.2 Confirmação do fenótipo fibroblástico das células cultivadas por imunofluorescência.

A marcação celular, com um conhecido marcador da superfície de fibroblastos, foi realizada para confirmar a fenotipagem celular. Os fibroblastos foram analisados por imunofluorescência em todos os grupos (controle, **Pg** LPS, **Ec** LPS e controle negativo - da técnica/sem o anticorpo primário). Observou-se marcação positiva para todos os grupos (Figura 3), sendo que os grupos testes, estimulados por LPS de **Pg** (Figura 3C) e de **Ec** (Figura 3B), mostraram-se com marcação ligeiramente mais pronunciada, principalmente o grupo com LPS de **Pg**. No controle negativo da técnica (Figura 3D), o qual não recebeu o anticorpo primário, não foi detectada fluorescência. Este resultado confirma a caracterização das células cultivadas como fibroblastos.

Figura 3. Confirmação do fenótipo fibroblástico das células cultivadas por Imunofluorescência, em um aumento de 63x. (A) controle; (B) estimulado por LPS de **Ec**; (C) estimulado por LPS de **Pg** e (D) controle negativo, núcleos marcados em azul (DAPI).

5.3 Detecção da secreção de IL-6, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, TGF- β , VEGF e CXCL16 por fibroblastos provenientes da mucosa palatina não marginal (período inicial) e por fibroblastos obtidos de enxertos gengivais da margem vestibular (período final) por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

A análise mostrou que tanto os fibroblastos no período inicial (obtidos da região palatina não marginal) quanto os fibroblastos no período final (obtidos da margem gengival após 4 meses da realização de EGL) apresentaram secreção de IL-6 com estímulos de LPS de **Pg** (Gráfico 4A; Tabela 1) e de **Ec** (Gráfico 4B; Tabela 2), sendo que a secreção estatisticamente significativa foi constatada no tempo experimental de 48h tanto pelos fibroblastos no período inicial quanto no período final com ambos os estímulos. Foi constatada secreção constitutiva pelos fibroblastos não estimulados tanto no período inicial quanto no período final, no entanto, a secreção para IL-6 foi maior pelos fibroblastos não estimulados no período final do que pelos fibroblastos não estimulados no período inicial (Gráficos 4, A e B; Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina IL-6 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Pg**.

	INICIAL				FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	1,41	6,00	283,15	586,82	55,99	89,49	296,41	412,88
	1,41	5,49	291,14	567,78	49,19	96,12	212,93	382,79
	8,38	20,79	277,20	283,83	86,09	112,44	215,65	407,44
	14,50	28,45	240,98	294,88	95,95	112,78	228,23	400,98
Média	6,43a	15,18a	273,12bf	433,33cg	71,80de	102,71e	238,30f	401,02g
DPM	6,31	11,34	22,17	166,49	22,72	11,75	39,31	13,09

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina IL-6 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Ec**.

INICIAL					FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	1,41	6,00	25,38	136,92	55,99	89,49	70,61	186,23
	1,41	5,49	23,00	152,06	49,19	96,12	82,69	190,48
	8,38	20,79	79,79	169,23	86,09	112,44	69,93	143,90
	14,50	28,45	86,26	194,56	95,95	112,78	68,23	131,48
Média	6,43 ^a	15,18 ^a	53,61 ^{acd}	163,19 ^{be}	71,80 ^{cd}	102,71 ^{cd}	72,87 ^d	163,02 ^e
DPM	6,31	11,34	34,08	24,73	22,72	11,75	6,62	29,74

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24H C = Controle inicial com 24horas; 48H C = Controle inicial com 48horas; 24H = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 24horas; 48H = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 48horas; 24H C- = Controle final com 24horas; 48H C- = Controle final com 48horas; 24H- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 24horas; 48H- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 48h. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráficos 4 – Secreção de IL-6 no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B). 24h C e 48h C = controle inicial, respectivamente nos tempos de 24h e 48h; 24h, 48h = fibroblastos estimulados em 24h e 48h, respectivamente; 24h C- e 48h C- = controle final com 24h e com 48h, respectivamente. $P < 0,05$.

No período inicial foi constatada secreção da quimiocina IL-8/CXCL8 pelos fibroblastos estimulados por LPS de **Pg**, assim como pelos fibroblastos no período final, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os tempos experimentais (24h e 48h) e controle (não estimulados). No entanto, os fibroblastos no período inicial, estimulados por LPS de **Pg**, apresentaram no tempo experimental de 48h uma secreção significativamente maior de IL-8/CXCL8 do que os fibroblastos no período final nos tempos experimentais de 24h e 48h (Gráfico 5A; Tabela 3).

Os fibroblastos estimulados com LPS de **Ec** no período inicial apresentaram secreção de forma significativa com 24h e 48h. Já os fibroblastos não estimulados, no período final, apresentaram secreção desta quimiocina, assim como os fibroblastos estimulados por LPS de **Ec**, porém sem diferença estatisticamente significativa. Observou-se secreção semelhante de IL-8/CXCL8, sem diferença estatisticamente significativa, por fibroblastos no período inicial e no período final (Gráfico 5B; Tabela 4). Os fibroblastos não estimulados no período inicial não exibiram secreção para IL-8/CXCL8, diferentemente dos fibroblastos no período final que exibiram secreção para essa citocina semelhante aos estimulados com LPS de **Ec**.

Tabela 3 – Valores das duplicatas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da quimiocina IL-8 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Pg**.

INICIAL					FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	0,00	0,00	1065,29	1782,19	387,07	368,35	401,31	462,73
	0,00	0,00	1032,39	1726,88	323,77	376,96	369,84	458,99
	0,00	0,00	664,83	811,15	475,10	361,23	666,87	626,79
	0,00	0,00	642,43	809,05	497,94	352,99	692,34	669,49
Média	0,00 ^a	0,00 ^a	851,23 ^{bc}	1282,32 ^b	420,97 ^c	364,88 ^c	532,59 ^c	554,50 ^c
DPM	0,00	0,00	228,75	545,74	80,52	10,21	170,56	109,53

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da quimiocina IL-8 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Ec**.

	INICIAL				FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	0,00	0,00	372,89	598,32	387,07	368,35	611,06	377,34
	0,00	0,00	371,49	428,20	323,77	376,96	449,63	320,78
	0,00	0,00	164,26	369,39	475,10	361,23	182,19	278,83
	0,00	0,00	302,88	369,39	497,94	352,99	178,44	304,67
Média	0,00 ^a	0,00 ^a	302,88 ^{bc}	441,33 ^{bc}	420,97 ^c	364,88 ^c	355,33 ^c	320,40 ^c
DPM	0,00	0,00	98,02	108,27	80,52	10,21	212,57	41,70

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráficos 5 – Secreção de IL-8 no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B). 24h C e 48h C = controle inicial, respectivamente nos tempos de 24h e 48h; 24h, 48h = fibroblastos estimulados em 24h e 48h, respectivamente; 24h C- e 48h C- = controle final com 24h e com 48h, respectivamente. $P < 0,05$.

Quanto à secreção de MIP-1 α /CCL3, observamos que fibroblastos no período inicial e no período final tiveram uma secreção constitutiva (pelas células não estimuladas) sem diferença estatisticamente significativa entre 24h e 48h. Na análise intragrupos, não houve diferença de secreção de MIP-1 α /CCL3 entre as células não estimuladas e as células estimuladas, assim como entre os diferentes tempos experimentais, para ambos os estímulos (Gráficos 6, A e B; Tabelas 5 e 6) com exceção para as células no período final que secretaram significativamente mais MIP-1 α /CCL3 no tempo experimental de 48h do que os fibroblastos no período inicial, mediante o estímulo por LPS de **Pg** (Gráfico 6A; Tabela 5).

Tabela 5 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina MIP-1 α /CCL3 secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Pg**.

	INICIAL				FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	7,57	8,06	11,43	12,39	8,33	13,13	7,64	6,95
	7,57	4,68	10,95	6,61	4,90	4,21	9,01	24,10
	11,43	2,76	22,03	2,76	19,30	6,27	17,24	46,72
	0,00	0,00	19,62	6,13	15,18	25,47	12,44	25,47
Média	6,64 ^a	3,87 ^a	16,01 ^{ab}	6,97 ^a	11,9 ^{ab}	12,2 ^{ab}	11,58 ^a	25,81 ^b
DPM	4,79	3,39	5,65	4,00	6,51	9,59	4,28	16,29

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

Tabela 6 – Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina MIP-1 α secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Ec**.

	INICIAL				FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	7,57	8,06	5,65	10,95	8,33	13,13	9,70	0,78
	7,57	4,68	11,43	9,02	4,90	4,21	19,30	10,38
	11,43	2,76	3,72	5,17	19,30	6,27	77,58	15,18
	0,00	0,00	0,00	0,00	15,18	25,47	14,50	15,18
Média	6,64 ^a	3,87 ^a	5,20 ^a	6,28 ^a	11,93 ^a	12,27 ^a	30,27 ^a	10,38 ^a
DPM	4,79	3,39	4,77	4,83	6,51	9,59	31,78	6,79

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráficos 6 – Secreção de MIP-1 α no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B). 24h C e 48h C = controle inicial, respectivamente nos tempos de 24h e 48h; 24h, 48h = fibroblastos estimulados em 24h e 48h, respectivamente; 24h C- e 48h C- = controle final com 24h e com 48h, respectivamente. $P < 0,05$.

Já em relação ao mediador TGF- β , os fibroblastos no período inicial não apresentaram nenhuma secreção, nem mesmo quando estimulados por LPS de **Pg** e de **Ec**. Entretanto, no período final os fibroblastos apresentaram aumento da secreção de TGF- β , porém sem diferença estatisticamente significativa entre os estimulados e os não estimulados (controles 24h e 48h) tanto para LPS de **Pg** quanto para **Ec** (Gráficos 7, A e B).

Tabela 7 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina TGF- β secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Pg**.

INICIAL					FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	0,00	0,00	0,00	0,00	341,76	317,14	288,57	504,29
	0,00	0,00	0,00	0,00	176,27	119,14	181,20	231,44
	0,00	0,00	0,00	0,00	348,66	395,94	316,15	228,48
	0,00	0,00	0,00	0,00	166,42	305,31	135,89	204,84
Média	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	258,28 ^b	284,38 ^b	230,45 ^b	292,26 ^b
DPM	0,00	0,00	0,00	0,00	100,50	117,28	85,81	141,85

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Pg** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Pg** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 8 - Valores das duplicadas em pg/mL após a leitura do ELISA, representando a quantidade da citocina TGF- β secretada no sobrenadante dos fibroblastos cultivados mediante estímulo por LPS de **Ec**.

	INICIAL				FINAL			
	24h C	48h C	24h	48h	24h C-	48h C-	24h-	48h-
	0,00	0,00	0,00	0,00	341,76	317,14	327,97	236,36
	0,00	0,00	0,00	0,00	176,27	119,14	84,66	323,05
	0,00	0,00	0,00	0,00	348,66	395,94	298,42	135,89
	0,00	0,00	0,00	0,00	166,42	305,31	299,40	216,66
Média	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	258,28 ^b	284,38 ^b	252,61 ^b	227,99 ^b
DPM	0,00	0,00	0,00	0,00	100,50	117,28	112,80	76,85

Inicial = fibroblastos da mucosa palatina não marginal; final = fibroblastos do enxerto gengival marginal; 24h C = Controle inicial com 24horas; 48h C = Controle inicial com 48horas; 24h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 24horas; 48h = Estímulo inicial por LPS de **Ec** com 48horas; 24h C- = Controle final com 24horas; 48h C- = Controle final com 48horas; 24h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 24horas; 48h- = Estímulo final por LPS de **Ec** com 48horas. DPM = desvio padrão da média. Valores referentes às duplicatas de dois experimentos independentes. Letras iguais significam sem diferença estatisticamente significativa; letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráficos 7 – Secreção de TGF- β no período inicial (fibroblastos da mucosa palatina não marginal) e no período final (fibroblastos do enxerto gengival marginal), com estimulação por LPS de **Pg** (A) e de **Ec** (B). 24h C e 48h C = controle inicial, respectivamente nos tempos de 24h e 48h; 24h, 48h = fibroblastos estimulados em 24h e 48h, respectivamente; 24h C- e 48h C- = controle final com 24h e com 48h, respectivamente. $P < 0,05$.

Não foi detectada a secreção de VEGF e nem de CXCL16 no sobrenadante dos fibroblastos cultivados quando estimulados e até quando não estimulados por LPS de **Pg** e de **Ec**, tanto no período inicial quanto no período final.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os fibroblastos são as células predominantes no tecido conjuntivo do periodonto (BARTOLD et al., 2000), estando envolvidas na reposta imune do hospedeiro, pois estão entre as primeiras células encontradas em infecções periodontais, sendo estimuladas a liberar citocinas inflamatórias (BRUNNER et al., 2010). Como os fibroblastos não constituem um grupo celular único entre as diferentes regiões anatômicas (HOSOKAWA et al., 2005; UEHARA & TAKADA et al., 2007; MORANDINI et al., 2011, 2012; SCHERES et al., 2011) e como o processo de inflamação não ocorre por igual em todos os tecidos conjuntivos do organismo, torna-se interessante conhecer a sua participação nos fenômenos inflamatórios e imunológicos, por serem células capazes de produzir citocinas e quimiocinas (TAMURA et al., 1992), além de mediadores do reparo (NISHI et al., 2010; AGIS et al., 2011).

A escolha da utilização do estímulo com LPS de *Porphyromonas gingivalis* neste trabalho deu-se à importância que esse microrganismo possui na etiopatogenia da doença periodontal, visto que a severidade da doença periodontal se dá, principalmente, pelas bactérias do complexo vermelho, sendo a *Porphyromonas gingivalis* uma das constituintes deste complexo e uma das mais comprometedoras para a ocorrência e evolução da periodontite (DARVEAU et al., 1997; OFFENBACHER et al., 2007, 2008). O destaque que esse microrganismo recebe se dá pelo fato de ser a espécie oportunista mais apta a causar periodontite, além da capacidade que possui em secretar uma variedade de proteases extracelulares, que proporcionam o aumento da permeabilidade vascular, resultando em aumento do fluxo do fluido crevicular gengival, proporcionando assim uma rica fonte de nutrientes para a placa subgengival (DARVEAU et al., 1997, 2012; HAJISHENGALLIS et al., 2012). Já a escolha do estímulo com LPS de *Escherichia coli*, foi feita por este se tratar de um estímulo potente (JONES et al., 2010), induzindo a expressão de citocinas, funcionando no presente estudo como uma referência de estimulação para secreção de citocinas e mediadores de reparo. A concentração de 1µg/mL de LPS, de ambas as espécies bacterianas, foi utilizada por não ser uma concentração alta demais, capaz de comprometer a viabilidade

celular, mas o suficiente para induzir a expressão de citocinas e mediadores de reparo pelos fibroblastos, de acordo com as concentrações utilizadas em estudos prévios (SUGIYAMA et al., 2000; MORANDINI et al., 2010; MORSCZECK et al., 2012; MORANDINI et al., 2012, 2012) .

Devido à importância que os fibroblastos possuem na resposta inflamatória às bactérias patogênicas da cavidade oral, as quais são cruciais para o desenvolvimento da periodontite, e como os diferentes “tipos” de fibroblastos podem responder a esses patógenos de forma distinta (MORANDINI et al., 2010, 2011), torna-se válido avaliar comparativamente a resposta de fibroblastos da área palatina não marginal, onde não havia contato íntimo com estímulos agressores bacterianos da doença periodontal, com a resposta dos fibroblastos do tecido gengival palatino enxertado na área marginal vestibular (pela realização de enxerto gengival livre, epitélio-conjuntivo), onde os estímulos agressores bacterianos da doença periodontal estão presentes, a partir da estimulação por LPS de **Pg** e de **Ec** para a mensuração da secreção de citocinas e mediadores do reparo.

Os dados do presente estudo mostraram, em relação à atividade enzimática para análise da viabilidade celular, que não houve morte celular com os estímulos utilizados nos tempos experimentais de 24h e 48h, porém as células se comportaram de maneira diferente quando os tempos experimentais foram comparados, com uma maior atividade enzimática dos fibroblastos no tempo de 48h. Uma explicação para esse comportamento celular talvez esteja ligado ao aumento da atividade metabólica celular com passar do tempo de exposição aos estímulos.

A caracterização das células como fibroblastos, realizada através da imunofluorescência, confirmou que o protocolo utilizado para a cultura celular no presente estudo foi efetivo para selecionar os fibroblastos como as únicas células em crescimento. Pode-se dizer que uma maior marcação dessas células estimuladas por LPS de **Pg** e de **Ec** ocorreu em razão de uma maior atividade metabólica dessas células que produziram mais proteínas devido à estimulação. As células do controle negativo da técnica não tiveram os seus citoplasmas marcados porque o anticorpo primário não foi utilizado e o anticorpo secundário recebido não marcou nenhum outro citoplasma, confirmando a especificidade do anticorpo.

Os dados do presente trabalho mostraram que tanto os fibroblastos da mucosa palatina não marginal quanto os fibroblastos do enxerto gengival marginal secretaram de forma semelhante a citocina IL-6 quando estimulados por LPS de **Pg**

e de **Ec**. Estudos prévios (KOKA et al., 1997; EKHLASSI et al., 2008; MORANDINI et al., 2010; SCHERES et al., 2010; HERATH et al., 2011) mostraram que quando fibroblastos se encontravam expostos a estímulos bacterianos, como LPS, apresentavam uma expressão significativa de IL-6, evidenciando a importância que essa citocina possui na resposta imune e inflamatória do hospedeiro na periodontite.

Observou-se também, no presente estudo, que a secreção de IL-6 esteve aumentada no tempo experimental de 48h para ambas as fontes de fibroblastos. Pode-se supor que isso ocorreu porque o sinal para a secreção efetiva dessa citocina aumenta com o tempo de exposição ao estímulo; entretanto esse sinal “demorado” não significa uma facilitação de colonização pelos microrganismos, já que uma secreção prévia dessa citocina (constatada no controle e no tempo experimental de 24h) foi observada apesar de ter sido em baixas concentrações.

Houve no atual estudo uma secreção constitutiva de IL-6 tanto pelos fibroblastos não estimulados provenientes da mucosa palatina não marginal quanto pelos fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal, no entanto, essa secreção foi estatisticamente significativa pelos fibroblastos do enxerto gengival marginal. O estudo de Scheres et al. (2010) mostrou que os fibroblastos gengivais não estimulados secretaram e expressaram mais mRNA para IL-6 do que os fibroblastos do ligamento periodontal. Pode-se sugerir que a maior secreção de IL-6, no presente estudo, pelos fibroblastos não estimulados obtidos do enxerto gengival marginal esteja talvez relacionada com um contato mais contundente desses fibroblastos com patógenos provenientes da placa bacteriana.

Quanto à secreção da quimiocina IL-8/CXCL8, os dados mostraram que os fibroblastos provenientes da mucosa palatina não marginal se comportaram de maneira diferente após terem sido enxertados na área gengival marginal, quando estimulados por LPS de **Pg** e de **Ec**. Os fibroblastos da mucosa palatina não marginal só secretaram IL-8/CXCL8 quando foram estimulados pelos LPSs bacterianos. Quando enxertados na área gengival marginal após 4 meses (período final), os fibroblastos não estimulados já apresentaram secreção para esta quimiocina, mesmo não estimulados por LPS. Talvez isso possa ser uma expressão do contato com fatores de virulência bacterianos que essas células já tiveram na área marginal periodontal. Por outro lado, quando estimulados por LPS de **Pg** essa secreção no período final foi menor do que a secreção do período inicial, tanto com 24h como com 48h. Quando estimulados por LPS de **Ec**, os fibroblastos da mucosa

palatina não marginal e os fibroblastos enxertados na área gengival marginal não diferiram quanto à secreção de IL-8/CXCL8. Estudos prévios (TAMURA et al., 1992; ARA et al., 2009; SCHERES et al., 2010; HERATH et al., 2011; MORANDINI et al., 2011) mostraram que os fibroblastos, quando estimulados por LPS, são capazes de produzir IL-8, sendo que fibroblastos de regiões anatômicas diferentes apresentam uma heterogeneidade quanto ao perfil de secreção dessa quimiocina (SCHERES et al., 2010), corroborando com os resultados para LPS de **Pg** do presente estudo.

Os resultados deste estudo mostraram que os fibroblastos se comportaram de maneira diferente mediante os estímulos utilizados, com maior secreção de IL-8/CXCL8 pelo estímulo de **Pg**. Esse achado não vai de encontro com os resultados de estudos prévios (IMATANI et al., 2001; JONES et al., 2010), os quais mostraram que uma quantidade maior de citocinas, como IL-6 e IL-8/CXCL8, foi secretada quando fibroblastos gengivais foram estimulados por LPS de **Ec** do que por LPS de **Pg**.

Os resultados do presente estudo também mostraram que os fibroblastos que normalmente não entram em contato direto com produtos bacterianos da doença periodontal, é que tiveram uma secreção maior de IL-8/CXCL8 quando estimulados por LPS de **Pg** no tempo de 48h, talvez pelo fato de normalmente não serem (área não marginal) submetidos a esses estímulos e, quando do estímulo, essas células acabam por secretar maiores concentrações desta quimiocina.

A secreção em menores concentrações de IL-8/CXCL8 pelos fibroblastos estimulados por LPS de **Pg** obtidos de enxerto gengival marginal pode indicar que essas células normalmente já possuem um estágio ativo de secreção, que talvez possa ser modificado pelo contato com outras células e outras citocinas na área marginal do periodonto, modulando o processo de secreção. Tanto que os fibroblastos não estimulados do enxerto gengival marginal apresentaram secreção de IL-8/CXCL8, enquanto os fibroblastos não estimulados da mucosa palatina não marginal não secretaram essa quimiocina, pressupondo-se que, devido à sua localização anatômica, entram em contato mais facilmente com patógenos periodontais. Este resultado pode ser justificado pelos resultados do estudo de Scheres et al. (2010), o qual mostrou que os fibroblastos gengivais não estimulados secretaram e expressaram mais mRNA para IL-6 do que os fibroblastos do ligamento periodontal, sugerindo que os fibroblastos gengivais possuem um maior estado de atividade por serem mais suscetíveis de entrarem em contato com

patógenos periodontais. Pode-se sugerir que essa heterogeneidade quanto ao perfil de secreção de IL-8/CXCL8, no presente estudo, talvez ocorra pela influência que o meio exerce sobre o comportamento de secreção de mediadores celulares por fibroblastos de um tecido gengival transplantado que passa a se adaptar e a se proliferar em uma nova região anatômica.

Os dados mostraram que quando os fibroblastos provenientes da mucosa palatina não marginal são enxertados na área gengival marginal mantém o mesmo perfil de secreção constitutiva para a citocina MIP-1 α /CCL3 na ausência de estimulação bacteriana. Quando essas células passaram a ser sensibilizadas por subprodutos bacterianos, como o LPS, elas continuaram a secretar MIP-1 α /CCL3, sendo que os fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal apresentaram uma secreção mais efetiva com diferença estatisticamente significativa no tempo experimental de 48h do que os fibroblastos da mucosa palatina não marginal quando sensibilizados por LPS de **Pg**, exibindo um possível aumento de expressão tempo-dependente pelos fibroblastos do enxerto gengival marginal. Uma maior secreção de MIP-1 α /CCL3 pelos fibroblastos da área marginal, talvez seja pelo fato de já sofrerem uma estimulação prévia na área marginal pela placa bacteriana presente no sulco, mesmo em tecidos clinicamente saudáveis e aptos a responderem a um novo estímulo.

O estudo de Morandini et al. (2010) mostrou que os fibroblastos analisados, gengivais e de ligamento periodontal, comportaram-se de maneira diferente quanto ao perfil de secreção de MIP-1 α /CCL3, SDF-1 e IL-6 quando estimulados por LPS de **Pg**, sendo que a maior secreção de MIP-1 α /CCL3 foi detectada em baixas concentrações, 0,1 μ g/mL, do LPS de **Pg**, que aumentou ao longo do tempo, porém na concentração de 1 μ g/mL, que foi a mesma utilizada no presente estudo, essa secreção não se mostrou tempo-dependente. Já os resultados do estudo de Ryu et al. (2007) mostraram que os fibroblastos gengivais não secretaram e nem tiveram expressão gênica para MIP-1 α /CCL3 mediante estímulos com IL-1 β , LPS de **Pg** e de **Aa**. Essa expressão foi somente detectada de forma significativa na camada basal epitelial de tecido gengival inflamado.

Talvez a secreção constitutiva de MIP-1 α /CCL3 pelos fibroblastos no presente estudo possa ter ocorrido por se tratar de cultura de células provenientes de tecidos clinicamente saudáveis. No estudo de Garlet et al. (2003) níveis de MIP-1 α /CCL3 foram constitutivamente baixos ou ausentes em tecidos periodontais saudáveis, sem

inflamação, porém se mostraram elevados em biopsias de tecidos gengivais de pacientes com periodontite crônica e principalmente agressiva.

Quanto à secreção de TGF- β , os fibroblastos cultivados da mucosa palatina não marginal e os fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal exibiram um comportamento muito diferente. Os fibroblastos da mucosa palatina não marginal não apresentaram nenhuma secreção desta citocina, nem mesmo frente aos estímulos utilizados (LPS). Já os fibroblastos do enxerto gengival secretaram TGF- β , mesmo não tendo diferença significativa entre os estimulados e não estimulados. O estudo de Yamaji et al. (1995) que investigou os efeitos de LPS de **Pg** e de **Ec** na expressão gênica e na produção de citocinas inflamatórias de fibroblastos do ligamento periodontal examinadas por ensaio de Northern (RNA blot) e ELISA, mostrou que fibroblastos do ligamento periodontal expressaram TGF- β , porém sua produção não foi influenciada por LPS bacteriano, sugerindo que o TGF- β se acumula nas lesões inflamatórias, suprimindo a função imune das células, mas sem levar à destruição tecidual por estimulação com LPS bacteriano. Já o estudo de Morandini et al. (2011), que teve como objetivo quantificar e comparar a secreção de TGF- β , IL-8 e IL-10 por fibroblastos do ligamento periodontal e gengivais, estimulados por LPS de **Pg**, verificou que a secreção de TGF- β dependeu da concentração do estímulo, principalmente pelos fibroblastos gengivais, sendo significativamente maior quando desafiados por 10 μ g/mL de LPS, enquanto que a concentração de 1 μ g/mL, que foi a mesma utilizada no presente estudo, não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle.

Essa diferença quanto ao perfil de secreção do TGF- β entre os fibroblastos do presente estudo, talvez possa indicar que os fibroblastos tiveram seu comportamento secretor influenciado pelo meio quando passaram a se adaptar em uma nova região anatômica, apresentando um estado mais ativo das células do enxerto gengival marginal, uma vez que estes fibroblastos são mais suscetíveis a entrar em contato com os subprodutos de patógenos da doença periodontal. Além disso, a maior secreção de TGF- β , já que está diretamente relacionada ao reparo tecidual, pode ter ocorrido pela contínua necessidade de reparo de possíveis alterações que a microbiota do sulco possa induzir por sua presença constante ou ainda para suprir a necessidade de reparação após o tecido ser enxertado, mesmo após 4 meses.

Os resultados mostraram que nem os fibroblastos da mucosa palatina não marginal e nem os fibroblastos enxertados na área gengival marginal secretaram VEGF e CXCL16 frente aos estímulos utilizados. Já o estudo de Sakoda et al. (2012) mostrou que fibroblastos gengivais secretaram VEGF via TGF- β 1 e FGF-2 quando estes foram estimulados por um derivado de matriz de esmalte. O VEGF está relacionado também à etiologia da doença periodontal pela capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, o que contribui para o aumento e extensão da inflamação, permitindo que mediadores inflamatórios sejam liberados por células do tecido inflamado, favorecendo assim a formação de novos vasos (JOHNSON et al., 1999). Estudos mostraram (SUTHIN et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2010) que fibroblastos gengivais humanos estimulados por LPS, vesículas e proteínas da membrana extracelular de **Pg** e de **Aa** foram capazes de produzir VEGF, principalmente e de forma significativa quando estimulados com vesículas e proteínas da membrana extracelular.

No estudo de Abel et al. (2004) foi possível verificar que a expressão de CXCL16 foi induzida por outras citocinas, como IFN-gamma e TNF- α , e a sua secreção mediada por um receptor de membrana, ADAM 10, que regula a função de CXCL16 nos tecidos inflamados. O estudo de Hosokawa et al. (2007) que através de análise de reação em cadeia de polimerase (PCR) e imuno-histoquímica também revelou que CXCL16, assim como seu receptor CXCR6, foram expressos por fibroblastos gengivais em tecidos periodontais doentes, sendo que a expressão de CXCL16 foi controlada por diversas citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IFN-gama. Pode-se especular que a secreção de CXCL16 não foi detectada no atual estudo porque os fibroblastos foram estimulados apenas por LPS bacteriano e talvez a ação de outras citocinas ou outros estímulos seja necessária para que os fibroblastos secretem CXCL16.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições que este trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

Parece que os fibroblastos provenientes de uma mucosa palatina não marginal se adaptam às novas condições locais quando enxertados na área gengival marginal, mostrando diferença no perfil de secreção de mediadores inflamatórios importantes para o processo de homeostasia do periodonto marginal.

Especificamente:

- Para a citocina IL-6, os fibroblastos da mucosa palatina não marginal mantiveram o mesmo perfil de secreção quando enxertados na área gengival marginal;
 - Para MIP-1 α a secreção se mostrou aumentada de forma estatisticamente significativa pelos fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal após 48h de estímulo por **Pg** em comparação com os fibroblastos da área palatina não marginal.
 - A secreção de IL-8 pelos fibroblastos da mucosa palatina não marginal foi maior em resposta ao desafio por LPS de **Pg**. Entretanto, os fibroblastos obtidos do enxerto gengival marginal exibiram secreção até mesmo sem o estímulo de LPS.
 - Apenas os fibroblastos do enxerto gengival marginal apresentaram secreção de TGF- β , mesmo na ausência de estímulo por LPS.
 - A secreção de VEGF e CXCL16 não foi detectada pelos fibroblastos analisados.
-

Assim, a resposta heterogênea do perfil de secreção de mediadores da inflamação e do reparo pode significar que esses fibroblastos que passaram a ocupar e a se proliferar em uma nova região anatômica (margem gengival), através de enxertia tecidual, possam ter sido influenciados pelo meio a partir do momento em que entraram em contato de forma contundente com produtos bacterianos de agentes patogênicos, participando mais efetivamente no contexto da resposta inflamatória.

Referências

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, et al. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol*. 2004;172(10):6362-72.

Agis H, Watzek G, Gruber R. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor by periodontal fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2012;47(2):165-3.

Agudio G, Nieri M, Rotundo R, Cortellini P, Pini Prato G. Free gingival grafts to increase keratinized tissue: a retrospective long-term evaluation (10 to 25 years) of outcomes. *J Periodontol*. 2008;79(4):587-94. Erratum in: *J Periodontol*. 2008;79(7):1312.

Agudio G, Nieri M, Rotundo R, Cortellini P, Prato GP, Franceschi D. Periodontal conditions of sites treated with gingival-augmentation surgery compared to untreated contralateral homologous sites: a 10 to 27-year long-term study. *J Periodontol*. 2009;80(9):1399-05.

Ara T, Fujinami Y, Urano H, Hirai K, Hatori T, Miyazawa H. Protein kinase A enhances lipopolysaccharide-induced IL-6, IL-8, and PGE₂ production by human gingival fibroblasts. *J Negat Results Biomed*. 2012;27;11:10.

Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009;44(1):21–7.

Arancibia R, Oyarzún A, Silva D, Tobar N, Martínez J, Smith PC. Tnf- α Inhibits Tgf- β -Stimulated Myofibroblastic Differentiation and Extracellular Matrix Production in Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol*. 2012 Jul 19. Epub ahead of print.

Bains VK, Gupta V, Singh GP, Bains R. Mucogingival surgery: where we stand today. *J Calif Dent Assoc*. 2011;39(8):573-83.

Baldi C, Pini-Prato G, Pagliaro U, Nieri M, Saletta D, Muzzi L, et al. Coronally advanced flap procedure for root coverage. Is flap thickness a relevant predictor to achieve root coverage? A 19-cases series. J Periodontol. 1999;70(9):1077-84.

Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. Periodontol 2000. 2000;24:28-5.

Bernimoulin JP, Lüscher B, Mühlemann HR. Coronally repositioned periodontal flap. Clinical evaluation after one year. J Clin Periodontol. 1975;2(1):1-13.

Bickel M, Nöthen SM, freiburghaus K, Shire D. Chemokine expression in human oral keratinocyte cell lines and keratinized mucosa. J Dent Res. 1996;75(11):1827-34.

Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. BMC Microbiology. 2010;10(5):1-11.

Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF, Hsieh YS, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. J Endod. 2004;30(10):704-7.

Coatoam GW, Behrents RG, Bissada NF. The width of keratinized gingiva during orthodontic treatment: its significance and impact on periodontal status. J Periodontol. 1981;52(6):307-13.

Consensus report. Mucogingival therapy. Ann Periodontol. 1996;1(1):702-6.

Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press; 2009.

da Silva RC, Joly JC, de Lima AF, Tatakis DN. Root coverage using the coronally positioned flap with or without a subepithelial connective tissue graft. J Periodontol. 2004;75(3):413-9.

Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. J Dent Res. 2012;91(9):816-20.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000. 1997;14(1):12-32.

Dorfman HS, Kennedy JE, Bird WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival autografts. J Clin Periodontol. 1980;7(4):316-24.

Ekhlassi S, Scruggs LY, Garza T, Montufar-Scolis D, Moretti AJ, Klein JR. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor- α and interleukin-6 (IL-6) secretion and CCL25 gene expression in mouse primary gingival cell lines: IL-6-driven activation of CCL2. J Periodontal Res. 2008;43(4):431-9.

Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol. 1999;4(1):32-8.

Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J Periodontal Res. 2003;38(2):210-7.

Graham GJ, Locati M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. J Pathol. 2013;229(2):168-75.

Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, Townsend C, et al. Oral reconstructive and corrective considerations in periodontal therapy. J Periodontol. 2005;76(9):1588-00.

Griffin, TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative Complications Following Gingival Augmentation Procedures. J Periodontol. 2006;77(12):2070-9.

Haeri A, Serio FG. Mucogengival surgical procedures: a review of the literature. Quintessence International. 1999;30(7):475-83.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. Periodontology 2000. 1994;5(1):78-111.

Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. Nat Rev Microbiol. 2012;10(10):717-25.

Harris R J. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. J Periodontol. 2001;72(7):932-8.

Harvey PM. Surgical reconstruction of the gingiva. II. Procedures. N Z Dent J. 1970;66(303):42-52.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. Biochem J. 1990;265(3):621-36.

Herath TDK, Wang Y, Seneviratne CJ, Lu Q, Darveau RP, Wang CY, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. J Clin Periodontol. 2011;38(8):694-01.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. CXC chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. Clin Exp Immunol. 2007;149(1):146-54.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Human gingival fibroblasts express functional chemokine receptor CXCR6. Clin Exp Immunol. 2009;156(3):413-8.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. Clin Exp Immunol. 2005;141(3):467-74.

Hwang D, Wang HL. Flap thickness as a predictor of root coverage: a systematic review. J Periodontol. 2006;77(10):1625-34.

Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. J Periodontol. 1999;70(8):848-52.

Jones KJ, Ekhlassi S, Montufar-Solis D, Klein JR, Schaefer JS. Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblasts after stimulation with *porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J Periodontol. 2010;81(12):1850-57.

Kassab MM, Cohen RE. The etiology and prevalence of gingival recession. JADA. 2003;134(2):220-25.

Kennedy JE, Bird WC, Palcanis KG, Dorfman HS. A longitudinal evaluation of varying widths of attached gingiva. J Clin Periodontol. 1985;12(8):667-75.

Koka S, Reinhardt RA. Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: Implications for oral health disease. *J Prosthet Dent*. 1997;77(2):191-96.

Lagos MLEP. Participação da mastigação e da gengiva ceratinizada na fisiologia do sulco gengival, SP [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2003.

Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol*. 2004;28(5):443-60.

Lang NP, Löe H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. *J Periodontol*. 1972;43(10):623-7.

Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res*. 1975;10(5):243-55.

Loe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. *J Periodontol*. 1992;63(6):489-95.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965;36:177-87.

Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):7-19.

Marquez IC. The role of keratinized tissue and attached gingiva in maintaining periodontal/peri-implant health. *Gen Dent*. 2004;52(1):74-8; quiz 79.

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; 76(1):42-7.

Matter J. Free gingival grafts for the treatment of gingival recession. A review of some techniques. *J Clin Periodontol*. 1982;9(2):103-14.

Maynard JG, Wilson RD. Diagnosis and management of mucogingival problems in children. *Dent Clin North Am*. 1980;24(4):683-03.

Maynard JG, Wilson RD. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. J Periodontol. 1979; 50(4):170-4.

Miyasato M, Crigger M, Egelberg J. Gingival condition in areas of minimal and appreciable width of keratinized gingival. J. Clin Periodontol. 1977;4(3):200-9.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. Braz Oral Res. 2011;25(2):157-62.

Morandini AC, Souza PPC, Ramos-Junior ES, Costa CAS, Santos CF. MyD88 or TRAM Knockdown Regulates Interleukin (IL)-6, IL-8 and CXCL12 mRNA Expression in Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. J Periodontol. 2012 Nov 8. Epub ahead of print.

Morandini ACF, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SLA, Passanezi E, Resende MLR, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein 1- α , stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. J Periodontol. 2010;81(2):310-7.

Morandini ACF, Souza PPC, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Costa CAS, et al Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates Interleukin (IL)-6 and IL-8 but not Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) in Human Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts. J Periodontol 2012 Jun 9. Epub ahead of print.

Morsczeck CO, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from Escherichia coli but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. Arch Oral Biol. 2012;57(12):1595-01.

Nabers JM. Free gingival grafts. Periodontics. 1966;4(5):243-5.

Newman GV, Goldman MJ, Newman RA. Mucogingival orthodontic and periodontal problems. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1994;105(4):321-7.

Nishi H, Ohta K, Takechi M, Yoneda S, Hiraoka M, Kamata N. Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. Oral Dis. 2010;16(5):438-44.

Núñez MJ, Novío S, Balboa J, Seoane J, Suárez JA, Freire-Garabal M. Effects of resveratrol on expression of vascular endothelial growth factor in human gingival

fibroblasts stimulated by periodontal pathogens. *Acta Odontol Scand*. 2010;68(4):239-47.

Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1577-84.

Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol*. 2007;78(10):1911-25.

Ouhara K, Kawai T, Silva MJ, Fujita T, Hayashida K, Karimbux NY, et al. Expression levels of novel cytokine IL-32 in periodontitis and its role in the suppression of IL-8 production by human gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Microbiol*. 2012; 4. Epub 2012 Mar 16.

Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, Leung WK, Jin L J. The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):619–26.

Resende DRB, Greggi SLA, Siqueira AF, Benfatti CAM, Pereira KKY. Comparative clinical evaluation of postoperative morbidity after autogenous free gingival graft and dermal matrix allograft to gain and maintain keratinized tissue. *Innov Implant J Biomater Esthet*. 2009;4(2):31-6.

Resende DRB. Avaliação comparativa clínica e histológica de enxertos gengivais livres autógenos e de matriz dérmica acelular alógena na criação e manutenção de uma faixa de mucosa ceratinizada em humanos, SP [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2004.

Rothwell NJ. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12(11):430-6.

Ryu OH, Choi SJ, Linares AM, Song IS, Kim YJ, Jang KT, et al. Gingival epithelial cell expression of macrophage inflammatory protein-1alpha induced by interleukin-1beta and lipopolysaccharide. *J Periodontol*. 2007;78(8):1627-34.

Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(6):513-19.

Santana RB, Furtado MB, Mattos CM, de Mello Fonseca E, Dibart S. Clinical evaluation of single-stage advanced versus rotated flaps in the treatment of gingival recessions. *J Periodontol*. 2010;81(4):485-92.

Schallhorn RA, Patel DN, Chandrasekar B, Mealey BL. Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXCL16 in patients undergoing cardiac catheterization. *J Periodontol*. 2010;81(8):1180-6.

Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2010; 45(2):262–70.

Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, et al. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2011;46(4):407–16.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000. 1997;13:91-20.

Schrott AR, Jimenez M, Hwang JW, Fiorellini J, Weber HP. Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(10):1170-7.

Sobral LM, Aseredo F, Agostini M, Bufalino A, Pereira MC, Graner E, et al. Molecular events associated with ciclosporin A-induced gingival overgrowth are attenuated by Smad7 overexpression in fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2012;47(2):149-58.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984;11(1):21-32.

Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, et al. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1391-6.

Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Periodontal Res*. 2010;37(1):24-9.

Stetler KJ, Bissada NF. Significance of the width of keratinized gingiva on the periodontal status of teeth with submarginal restorations. J Periodontol. 1987;58(10):696-00.

Sugiyama A, Ogawa T, Daikuhara Y, Takada H. Enhancement of hepatocyte growth factor (scatter factor) production by human gingival fibroblasts in culture stimulated with *Porphyromonas gingivalis fimbriae*. J Med Microbiol. 2000;49(4):319-25.

Sullivan HC, Atkins JH. Free autogenous gingival grafts. III. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. Periodontics. 1968;6:152-60.

Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2003;38(1):90-6.

Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun. 1992;60(11):4932-7.

Tenenbaum H. A clinical study comparing the width of attached gingiva and the prevalence of gingival recessions. J Clin Periodontol. 1982;9(1):86-92.

Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol. 2001;2(2):129-34.

Thoma DS, Benić GI, Zwahlen M, Hämmerle CH, Jung RE. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. Clin Oral Implants Res. 2009;20(Suppl 4):146-65.

Toker H, Ozdemir H. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a university dental hospital in Turkey. Int J Dent Hyg. 2009;7(2):115–20.

Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. J Dent Res. 2007;86(3):249-54.

Wang PL, Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fobroblasts – CD14 and toll-like receptors. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(2):132-42.

Wennström JL. Mucogingival therapy. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):671-01.

Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1995;63(9):3576-81.

Yashiro R, Nagasawa T, Kiji M, Hormdee D, Kobayashi H, Koshy G, et al. Transforming growth factor- β stimulates interleucine-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*. 2006;33(3):165-71.

Zehnder M, Greenspan JS, Greenspan D, Bickel M. Chemokine gene expression in human oral mucosa. *Eur J Oral Sci*. 1999;107(4):231-5.

Anexos

ANEXO A – Tabela referente à análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 24hs. $P < 0,05$. Os valores correspondem à densidade óptica (DO) das amostras.

	Controle	LPS Pg	LPS Ec
	1,321	1,364	1,547
	1,355	1,465	1,54
	1,167	1,451	1,309
	1,18	1,446	1,332
	1,435	1,522	1,488
	1,436	1,546	1,479
MÉDIA	1,32	1,47	1,45
DPM	0,12	0,06	0,10

ANEXO B – Tabela referente à análise da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT no tempo de 48hs. $P < 0,05$. Os valores correspondem à densidade óptica (DO) das amostras.

	Controle	LPS Pg	LPS Ec
	2,261	2,182	2,088
	2,176	2,097	2,124
	2,124	2,129	1,999
	2,159	2,117	1,897
	2,359	2,085	2,085
	2,33	2,109	1,938
MÉDIA	2,23*	2,12	2,02*
DPM	0,097	0,034	0,092

(*) diferença estatisticamente significativa.

ANEXO C – Tabela referente à análise comparativa entre grupos da atividade enzimática dos fibroblastos da mucosa palatina não marginal (área doadora) pela técnica do MTT em ambos os tempos de 24 e 48hs. $P < 0,05$. Os valores correspondem à densidade óptica (DO) das amostras.

	Controle	LPS Pg	LPS Ec	Controle	LPS Pg	LPS Ec
	1,321	1,364	1,547	2,261	2,182	2,088
	1,355	1,465	1,54	2,176	2,097	2,124
	1,167	1,451	1,309	2,124	2,129	1,999
	1,18	1,446	1,332	2,159	2,117	1,897
	1,435	1,522	1,488	2,359	2,085	2,085
	1,436	1,546	1,479	2,33	2,109	1,938
MÉDIA	1,32	1,47	1,45	2,23	2,12	2,02
DPM	0,12	0,06	0,10	0,10	0,03	0,09

ANEXO D – Carta de aprovação do Comitê de Ética.

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 055/2011

Bauru, 26 de maio de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Avaliação comparativa do comportamento adaptativo de fibroblastos humanos derivados de mucosa palatina e de áreas marginais periodontais submetidas a enxerto gengival livre"**, de autoria de Fabíola Pontes Azevedo, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia **25 de maio de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto **APROVADO** lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Sebastião Luís Aguiar Greghi

Docente do Departamento de Departamento de Periodontia