UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PRISCILA BRASIL DA NÓBREGA

**Detecção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes
com Periodontite**

Ribeirão Preto

2008

PRISCILA BRASIL DA NÓBREGA

Deteccção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes com Periodontite

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Jr.

Ribeirão Preto

2008

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Nóbrega, Priscila Brasil da

Detecção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes com Periodontite / Priscila Brasil da Nóbrega; orientador Mário Taba Jr. Ribeirão Preto, 2008.

84p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Periodontia. Área de concentração: Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1.Periodontite. 2.Saliva. 3. Quimiocinas. 4. Biomarcadores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Brasil da Nóbrega

Detecção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes com Periodontite

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2008

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Se eu pudesse...

"Se eu pudesse deixar algum presente a vocês...

Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

*Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se
repetissem.*

Deixaria a capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para vocês se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo,

a resposta e a força para encontrar a saída."

Gandhi

Dedicatória

Dedicatória

Aos que mais amo...

Meus Pais

Everaldo A. Teixeira da Nóbrega e Maria Telma Brasil da Nóbrega

e Irmãs

Martha E. Brasil da Nóbrega e Cynthia Brasil da Nóbrega

Dedico essa vitória a quem devo tudo que sou!

Este momento que vivo agora é mágico e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Compartilharam comigo minhas alegrias e tristezas, incentivando-me a prosseguir. A vocês não bastam palavras para expressar meu mais sincero agradecimento.

Agradeço a compreensão, a força, o zelo, a admiração e o amor que vocês dedicaram a mim a partir de cada gesto de carinho e apoio. Desculpe-me a ausência nos nossos momentos familiares, com certeza vocês estiveram e sempre estarão no meu coração.

Agradecimentos

À Deus

Eu pedi Força...

e Deus me deu Dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi Sabedoria...

e Deus me deu Problemas para resolver.

Eu pedi Prosperidade...

e Deus me deu Cérebro e Músculos para trabalhar.

Eu pedi Coragem...

e Deus me deu Perigo para superar.

Eu pedi Amor...

e Deus me deu pessoas com Problemas para ajudar.

Eu pedi Favores...

e Deus me deu Oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi...

Mas eu recebi tudo de que precisava!

Ao meu orientador Prof^o.Dr. *Mário Taba Jr.*,

Pela confiança, respeito, apoio, incentivo... por me acolher durante todo meu curso de pós-graduação.

Obrigada por acreditar no meu potencial e me apresentar a vida científica.

Agradeço por me amparar nos momentos acadêmicos e pessoais.

Obrigada pela competência, dedicação e por todos os ensinamentos científicos, pessoais e espirituais. Pelos ensinamentos científicos e por sempre nos deixar a vontade para realização deste trabalho.

Obrigada!

À *minha família*, pelo incentivo, carinho, força, por entenderem minha ausência e por todo amor que sempre dedicaram em todos os momentos.

Aos meus amigos do coração *André, Rafaella, Kalizíia, Odete, Ingrid e Marínelle*, por partilharmos juntos momentos tão especiais e pela verdadeira amizade.

À minha amiga, “guru” e companheira de trabalho *Adriana Correa de Queiroz (Dri)*, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados, seja na clínica, no laboratório, nos coffee breaks, em nossas viagens, msn, enfim... por nos encontrarmos nesta vida. Agradeço o companheirismo, o carinho, a amizade, o amparo, o incentivo, a orientação durante esta fase acadêmica e por todo carinho no convívio diário.

À minha amiga *Germana (Gé)*, pela amizade, amparo, incentivo e por todo amor e carinho em todos os momentos, mesmo que por telefone, torpedos ou e-mails.

Aos amigos *Guilherme e Mônica e Pedrinho*, pela amizade e carinho demonstrados a cada dia, a cada coffee break. Obrigada pelo incentivo, amizade e paciência nos momentos de descontração e descobertas.

Às amigas que fizeram parte da minha querida turma de mestrado, *Anne, Dri, Flavínha, Gé e Pri* pelo convívio diário, finais de semana, horas em frente ao computador, momentos engraçadíssimos durante os créditos, viagens e por todas as horas “ganhas” em conversas, segredos e aprendizado... “Juntas somos fortes, unidas somos imbatíveis!” Obrigada por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Cada uma de vocês sabe o que significa para mim!

Aos amigos do curso de pós-graduação em Periodontia *Andréa, Guilherme, Rafael, Patrícia, Raquel*, por todos os momentos agradáveis e alegres, pela amizade e carinho.

Às amigas *Glauce Trevisan e Viviane Kawata*, por me receber com alegria, disposição e prontidão para realização deste trabalho. Pela maravilhosa convivência.

Aos amigos dos Laboratórios de Biologia Molecular e Cultura de Células *Fabiola, Grazi, Júnia, Lucas e Larissa*, pela companhia, paciência e incentivo.

Aos mestres e funcionários

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação – Área de Periodontia *Profº.*

Dr. Arthur Belém Novaes Jr., pela competência, dedicação e
responsabilidade.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação *Profº. Dr. Arthur Belém Novaes Jr., Profº. Dr. Mário Taba Jr., Profº. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi, Profº. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, Profª. Drª. Daniela Bazan Palioto*, pela formação e exemplo.

Às funcionárias *Tatí, Dulce, Sueli e Zilda*, pelo auxílio e atenção despendidos.

Aos meus pacientes, pela cooperação e esforço, sem os quais este trabalho não
seria possível.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho. Agradeço
de coração, vocês com certeza colaboraram para meu crescimento profissional e
pessoal.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

As doenças periodontais constituem uma variedade de condições patológicas que afetam os tecidos gengivais e os tecidos de suporte do dente levando, eventualmente, à perda do elemento dental ¹.

As diferenças na severidade e prevalência das doenças periodontais podem ser explicadas pelo efeito de fatores de risco tais como idade, padrão de higiene bucal, hábito de fumar, diabetes, microrganismos periodontopatogênicos, estresse, imunodeficiências, fatores genéticos e outros ².

O diagnóstico periodontal tradicional inclui a avaliação de parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa e perda óssea alveolar radiográfica. Estas medidas fornecem informações sobre a severidade das doenças periodontais, mas não permitem uma análise objetiva da atividade da doença ^{3, 4}. O diagnóstico da fase ativa e a identificação de pacientes susceptíveis representam uma mudança necessária nas investigações clínicas⁵. Avanços e evidências científicas estão direcionando os métodos de diagnóstico para busca de biomarcadores em amostras de fluido gengival, soro e saliva que permitam a identificação e quantificação da doença ^{6, 7}. Pacientes periodontais apresentam elevados níveis circulatórios de marcadores inflamatórios específicos que podem ser correlacionados com a severidade da doença ⁸.

A saliva é um fluido fisiológico, elaborado a partir das secreções de glândulas salivares e que contém proteínas produzidas localmente, bem como outras moléculas da circulação sistêmica. Isso a torna uma potencial candidata para apresentar biomarcadores que reflitam as alterações das doenças periodontais e de

outras doenças ⁹. Além disso, a coleta de saliva apresenta vantagens como fácil manipulação, característica não-invasiva, técnica simples e, geralmente, quantidade adequada ^{10, 11}. Os testes salivares já têm sido utilizados no diagnóstico e na identificação do risco ao desenvolvimento de determinadas doenças sistêmicas como Aids e hepatite, bem como na avaliação da atividade de cárie ⁷.

A análise da saliva pode ser especialmente benéfica na determinação da condição periodontal atual, por meio da busca de biomarcadores que possam melhor caracterizar a doença ⁷. Estudos têm indicado que a determinação dos níveis de mediadores inflamatórios em fluidos biológicos são bons indicadores da atividade inflamatória; além de mostrarem que esses marcadores bioquímicos e imunológicos encontrados na saliva e/ou no fluido gengival podem refletir a extensão da destruição periodontal e indicar a direção futura da progressão da doença ^{7, 12}

As quimiocinas são mediadores da inflamação responsáveis por recrutar e ativar uma variedade de células. A migração de células inflamatórias é um processo complexo que pode determinar o tipo específico de resposta ¹³.

Assim, o perfil dos níveis salivares de quimiocinas pode ser uma ferramenta útil para detectar as mudanças que precedem complicações clínicas e suas seqüelas como perda de suporte e perda dental.

REFERÊNCIAS

- [1] Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* 1997 Jun;14:202-15.
- [2] Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology 2000* 2003;32:11-23.
- [3] Greenstein G, Caton J. Periodontal disease activity: a critical assessment. *Journal of periodontology* 1990 Sep;61(9):543-52.
- [4] Griffiths GS, Wilton JM, Curtis MA, Maiden MF, Gillett IR, Wilson DT, et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Clinical assessment of the periodontium. *Journal of clinical periodontology* 1988 Aug;15(7):403-10.
- [5] Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *Journal of clinical periodontology* 2000 Jul;27(7):453-65.
- [6] Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clinical and experimental immunology* 1997 Feb;107(2):347-52.
- [7] Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005 Jul;49(3):551-71, vi.
- [8] Queiroz ATJ, M; O'Connell, PA; Nóbrega, PB; Costa, PP; Kawata, VKS; Trevisa, GL; Novaes Jr., AB; Souza, SLS; Palioto, DB; Grisi, MFM. Inflammation Markers in Healthy and Periodontitis Patients. A Preliminary Data Screening. *Brazilian Dental Journal* 2008;19(1):6.

- [9] Miller CS, King CP, Jr., Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *Journal of the American Dental Association* (1939) 2006 Mar;137(3):322-9.
- [10] Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *Journal (Canadian Dental Association)* 2002 Mar;68(3):170-4.
- [11] Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, Furuya Y, Yajima Y, Yamada S, et al. Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *Journal of periodontology* 2008 Feb;79(2):316-22.
- [12] Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004 May;343(1-2):1-16.
- [13] Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *Journal of periodontology* 1995 Jan;66(1):80-8.

Resumo

NÓBREGA, P. B. **Detecção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes com Periodontite**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A periodontite produz uma descarga de quimiocinas inflamatórias que pode ser refletida na saliva. Com base nisso, o objetivo desse estudo foi mensurar as concentrações salivares de interleucina-8 (IL-8), RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), MIG (*monokine induced by gamma interferon*), IP-10 (*interferon γ -inducible protein of 10 kD*), e MCP-1 (*macrophage chemotactic protein-1*) em pacientes com periodontite crônica e saudáveis. 32 indivíduos foram divididos em dois grupos: saudáveis (Controle, n=11) e pacientes com periodontite crônica (DP, n=21). Dados clínicos foram registrados. Amostras de saliva não-estimulada foram analisadas e biomarcadores inflamatórios na saliva foram identificados utilizando a citometria de fluxo em ensaios multiplex. Dos biomarcadores analisados, IL-8, MCP-1, PI e MIG-10 foram encontrados em maior abundância nas amostras da saliva. Verificou-se diferenças estatisticamente significativas entre as proteínas salivares: IL-8 ($p=0,0008$), MCP-1 ($p=0,0003$), e RANTES ($p=0,03$). Nenhuma diferença estatística entre grupos foi observada para IP-10 (Controle $193,85 \pm 64,21$; DP $423,78 \pm 85,67$, $p=0,08$), e MIG (Controle $173,33 \pm 79,28$; DP $341,26 \pm 77,23$, $p=0,05$). Todos os biomarcadores avaliados estavam mais elevados nos pacientes com DP em comparação com o grupo controle. Os dados sugerem que o aumento dos níveis de quimiocinas MCP-1, IL-8 e RANTES na DP podem ser responsáveis pela manutenção de leucócitos específicos no local. Esse mecanismo pode servir para promover a migração de leucócitos para os sítios de inflamação e a manutenção da cronicidade da periodontite.

Palavras-chave: Periodontite; Saliva; Quimiocinas; Biomarcadores

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FG: fluido gengival

IL-8: interleucina-8

CBA: Cytometric Bead Array

DP: pacientes com doença periodontal

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

MIG: monokine induced by gamma interferon

IP-10: interferon γ -inducible protein of 10 Kd

MCP-1: macrophage chemotactic protein-1

PS: profundidade de sondagem

PS $\leq$ 3: profundidade de sondagem $\leq$ 3mm

PS4-6: profundidade de sondagem entre 4 e 6mm

PS $\geq$ 7: profundidade de sondagem $\geq$ 7mm

NIC: nível clínico de inserção relativo

SS: sangramento à sondagem

SUP: supuração

n. dentes: número de dentes

mm: milímetro

°C: graus Celsius

pg/ml: picograma por mililitro

ng/ml: nanograma por mililitro

r: valor da correlação

Sumário

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA

RESUMO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 População do Estudo	29
2.2 Parâmetros Clínicos	30
2.3 Coleta das Amostras de Saliva	30
2.4 Análise das Proteínas Salivares	31
2.5 Análise Estatística	32
3 RESULTADOS	34
3.1 Características Demográficas e Clínicas	34
3.2 Concentração das Proteínas Salivares	35
3.3 Correlação entre Proteínas Salivares e Parâmetros Clínicos	35
4 DISCUSSÃO	43
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ARTIGO EM INGLÊS	56
ANEXOS	83

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica dos tecidos de suporte dos dentes causada por microrganismos específicos, resultando em destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar com formação de bolsa periodontal, retração gengival, ou ambos ¹⁴.

Métodos tradicionais de diagnóstico periodontal incluem avaliação de parâmetros clínicos e radiografias. Embora eficazes esses métodos são limitados e apenas uma perspectiva histórica da doença é determinada ¹⁵. Avanços no uso de fluidos orais, como amostras biológicas para detecção de marcadores específicos, com finalidade de monitorar o tratamento, determinar o prognóstico e servir como indicadores de risco têm colocado a saliva em posição de destaque. Fluidos orais contêm mediadores inflamatórios derivados da resposta do hospedeiro e marcadores específicos da reabsorção óssea ^{15, 16}.

A maioria dos estudos sobre biomarcadores e periodontite têm utilizado fluido gengival (FG) como amostra para análise ⁷. Contudo, a coleta de FG é dispendiosa e reflete a inflamação gengival do sítio específico analisado. O uso da saliva para analisar biomarcadores oferece várias vantagens em relação ao FG. Como a coleta de saliva não requer técnica ou equipamento especializado é mais rápida e mais conveniente para o paciente. Além disso, como a saliva representa uma amostra combinada de componentes de todos os sítios periodontais, pode indicar uma avaliação global do estado da doença, diferente da análise específica do FG ⁹.

Embora a maioria dos biomarcadores nos fluidos orais represente mediadores inflamatórios, o papel das quimiocinas na patogênese da doença periodontal permanece pouco explorado. Inflamação e destruição tecidual são eventos precoces e contínuos durante o processo de resposta do hospedeiro frente à infecção bacteriana ¹⁷. Nesses processos, fagócitos mononuclear e polimorfonucleares são componentes essenciais da defesa do hospedeiro ¹⁸. Após a estimulação por produtos bacterianos, essas e outras células residentes como fibroblastos, sintetizam e secretam uma ampla variedade de mediadores inflamatórios e imunológicos ¹⁹. O aparecimento de alguns tipos específicos de leucócitos no infiltrado inflamatório é mediado por citocinas quimiotáticas específicas, denominadas quimiocinas ^{18, 20}. Essas quimiocinas são responsáveis pela migração e ativação de subpopulações de leucócitos nos tecidos periodontais inflamados ²¹.

As quimiocinas são essenciais no processo inflamatório não só pelo seu papel no recrutamento de leucócitos, mas também por outras atividades fisiológicas e patológicas, tais como o trânsito de células linfóides, desenvolvimento de células T helper (Th)1/Th2, e cicatrização ^{22, 23}. As quimiocinas também são produzidas por monócitos e macrófagos ativados, células endoteliais e fibroblastos ²¹⁻²³ e exercem seus efeitos sobre células-alvo através da ligação a receptores específicos ²⁴. Quatro subfamílias de quimiocinas podem ser distinguidas com base em critérios estrutural, funcional e genético, dos quais existem dois grandes subgrupos, quimiocinas CXC e CC ²¹⁻²⁴.

Interleucina-8 (IL-8), um fator quimiotático CXC de leucócitos polimorfonucleares, e RANTES, uma quimiocina CC, que pode atrair células T, monócitos e eosinófilos, foram encontrados no fluido gengival de pacientes com

doença periodontal ^{25, 26}. Outras quimiocinas CC encontradas em tecidos periodontais doentes são as proteínas quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) ²⁷, e as quimiocinas de proteína 10 induzível por interferon gama (IP-10) ²⁸. As quimiocinas IP-10 têm sido associadas ao desenvolvimento de respostas Th1 ²⁹, enquanto a MCP-1 está ligada à resposta Th2 ³⁰. Diferentes quimiocinas estão presentes na doença periodontal e dentre elas já foi demonstrado que a MCP-1 é sintetizada por células endoteliais e fagócitos mononucleares em tecidos gengivais inflamados de pacientes com periodontite crônica ^{13, 30}.

Considerando o importante papel das quimiocinas na patogênese da doença periodontal, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis salivares de quimiocinas e sua relação com os parâmetros clínicos da doença periodontal.

2 Material e Métodos

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População do Estudo

Esse estudo foi conduzido na Clínica de Pós-graduação do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Universidade de São Paulo. Foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nº 2007.1.104.58.0 (Anexo A). Todos os indivíduos foram, individualmente, informados sobre o estudo proposto e os que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento.

Os indivíduos foram submetidos à anamnese, exame clínico e radiográfico. De acordo com a condição periodontal e o padrão geral de saúde, os indivíduos foram incluídos no estudo. Os critérios de inclusão foram: (i) presença de pelo menos 15 dentes; (ii) no mínimo, um sítio com profundidade de sondagem $\geq$ 5mm e dois dentes com perda de inserção $\geq$ 6mm; (iii) idade acima de 35 anos. Os critérios de exclusão foram: (i) uso de antibióticos ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; (ii) história de tabagismo recente ou nos últimos cinco anos; (iii) gestantes ou lactentes; (iv) medicamentos de uso continuado como anti-inflamatórios; (v) condições sistêmicas.

A amostra total ficou composta por 32 indivíduos que foram divididos em dois grupos: 11 indivíduos saudáveis (Controle) e 21 pacientes com doença periodontal (DP).

2.2 Parâmetros Clínicos

O exame clínico foi realizado por um único examinador experiente e registrado em seis sítios por dente, com auxílio de uma sonda periodontal computadorizada (Figura 1). Os parâmetros verificados foram: profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção relativo (NIC), sangramento à sondagem (SS), supuração (SUP) e número de dentes (n. dentes).

Figura 1. Sonda periodontal computadorizada

2.3 Coleta das Amostras de Saliva

Saliva total não-estimulada foi coletada (~5ml) de cada indivíduo, de acordo com o método descrito por Navazesh (1993)³¹. Os indivíduos enxaguaram a cavidade oral com água e, em seguida, coletaram a saliva em tubos estéreis. As amostras de saliva foram colocadas imediatamente no gelo e aliquotadas antes do congelamento a - 80°C (Figura 2).

Figura 2. Saliva não-estimulada em tubo estéril e aliquoteada

2.4 Análise das Proteínas Salivares

Os biomarcadores inflamatórios na saliva foram identificados simultaneamente utilizando a citometria de fluxo em ensaios multiplex (CBA- Cytometric Bead Array, BD Bioscience, San Jose, na Califórnia.). Foram analisados os seguintes mediadores: IL-8 (*interleucina 8*), RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), MIG (*monokine induced by gamma interferon*), IP-10 (*interferon γ -inducible protein of 10 kD*), e MCP-1 (*macrophage chemotactic protein-1*). A CBA foi utilizada de acordo com o protocolo do fabricante.

Resumidamente, as "curvas padrão" dos mediadores foram dissolvidas em tampão diluente. Diluições de 10-ml das amostras (padrões ou teste) foram adicionados à 50-ml de um mix contendo anticorpos de captura e de detecção e, a mistura foi incubada por 4 horas em temperatura ambiente no escuro. O excesso de anticorpos não ligantes foi lavado antes da aquisição dos dados. Análises "Two-color" foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo (FACScanto, Becton Dickinson, Sunnyvale, Califórnia) (Figura 3). Foi realizada a aquisição de 2000

eventos, segundo o protocolo fornecido. A conversão dos dados foi realizada utilizando o software CMA de análise (FCAP Array, Becton Dickinson).

Figura 3. FACSCanto, Becton Dickinson, Sunnyvale, Califórnia

2.5 Análise Estatística

Os parâmetros clínicos foram expressos como média $\pm$ erro padrão e comparações entre grupos foram verificados pelo teste Mann-Whitney. Análise de regressão múltipla foi utilizada para verificar a relação dos parâmetros avaliados com a condição da doença periodontal medida pela profundidade de sondagem e nível clínico de inserção. Valor p de 0,05 foi considerado como sendo estatisticamente significativo. O programa GraphPad InStat software foi usado para análise estatística.

3 Resultados

3 RESULTADOS

3.1 Dados demográficos e Parâmetros Clínicos

Trinta e dois pacientes com idade variando entre 37 e 63 anos foram avaliados segundo análise de quimiocinas na saliva e condição periodontal. Os parâmetros periodontais clínicos foram registrados durante o exame clínico e as concentrações de quimiocinas na saliva foram medidas de amostras de saliva de 11 indivíduos saudáveis (Controle) e 21 pacientes com doença periodontal (DP). Vinte e um eram do sexo feminino e 11 eram do sexo masculino (Tabela 1).

Os dados mostraram que os parâmetros clínicos avaliados PS, NIC, SUP e SS foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$).

As diferenças de 1,13 mm na PS e de 1,84 mm no NIC entre os grupos controle e DP demonstram condições clínicas diferentes entre eles. O número semelhante de dentes remanescentes e a mesma faixa etária nos grupos garantem comparações imparciais. O critério de inclusão de no mínimo 15 dentes remanescentes foi utilizado para minimizar, quando existente, o impacto adicional de fatores de risco como dos distúrbios oclusais nas condições periodontais e mediadores inflamatórios. Ambos os grupos apresentaram mais de 23 dentes em média.

O grupo Controle mostrou nenhum ou pouco sinal de inflamação ($SS=0.3\pm0.2\%$) e ausência de bolsas periodontais, considerando o grupo DP, que apresentou inflamação ($SS=18\pm4\%$) e presença de bolsas periodontais. A constatação de NIC e SS serem mais elevados nos pacientes com doença periodontal comparados com os pacientes saudáveis é uma confirmação do estado de periodontite. Os pacientes PD mostraram vários sítios com bolsas de 4 a 6 mm

(32.9 ± 4.2) e alguns sítios com bolsas periodontais $\geq 7\text{mm}$ (4.7 ± 1.1) em média, indicando uma periodontite estabelecida de condição moderada a severa.

3.2 Concentração de Biomarcadores encontrados na Saliva

Amostras de saliva não-estimulada de 32 pacientes foram analisadas por conteúdo protéico por um ensaio multiplex. As quimiocinas selecionadas foram medidas para identificar as diferenças entre os controles saudáveis e pacientes com doença periodontal. A média das concentrações de quimiocinas salivares está apresentada em picograma por mililitro (pg/mL) de saliva (Tabela 2).

As quimiocinas analisadas, IL-8, MCP-1, MIG e IP-10 foram encontradas em abundância nas amostras de saliva e apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos: IL-8 ($p=0.0008$), MCP-1 ($p=0.003$), e RANTES ($p=0.03$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados para IP-10 (Controle 193.85 ± 64.21 ; DP 423.78 ± 85.67 , $p=0.08$), e MIG (Controle 173.33 ± 79.28 ; DP 341.26 ± 77.23 , $p=0.05$). No entanto, todas as quimiocinas mostraram 2 a 7 vezes níveis de concentração mais elevados em pacientes com DP do que em amostras controle (Tabela 2).

3.3 Correlação entre Proteínas Salivares e Parâmetros Clínicos

Dois modelos de análise de regressão múltipla foram executados. No primeiro modelo, a PS foi utilizada como uma variável dependente e as seguintes variáveis preditoras, IL-8, IP-10, SUP e RANTES, foram inseridas no intuito de gerar um modelo estatisticamente significativo ($R=0.902$, $p<0.0001$). A relação de cada variável preditora com PS nesse modelo foi IL-8 ($B = 0,47$, $p < 0,0001$), IP-10 ($B = 0,48$, $p < 0,0001$), SUP ($B = 0,17$, $p = 0,06$) e RANTES ($B = 0,18$, $p = 0,07$). No

segundo modelo, NIC foi usado como variável dependente ($R = 0,916$, $p < 0,0001$). A relação entre NIC e cada variável preditora foi semelhante ao modelo PS: IL-8 ($B = 0,53$, $p < 0,0001$), IP-10 ($B = 0,45$, $p < 0,0001$), SUP ($B = 0,14$, $p = 0,09$) e RANTES ($B = 0,18$, $p = 0,05$). Os dois modelos de regressão indicam que tanto IL-8 e IP-10 são estatisticamente relacionadas com a evolução clínica da doença periodontal.

Tabelas

Tabela 1. Parâmetros clínicos e demográficos dos grupos (média $\pm$ erro padrão).

Teste Mann-Whitney, $p < 0.05$ são estatisticamente diferentes.

Parâmetros Clínicos	Controle (n=11)	PD (n=21)	Valor p Mann-Whitney
Idade	41.54 $\pm$ 1.20	45.19 $\pm$ 1.25	0.05
PS (mm)	1.93 $\pm$ 0.07	3.06 $\pm$ 0.14	<0.0001
NIC	1.97 $\pm$ 0.07	3.81 $\pm$ 0.25	<0.0001
SUP	0.0 $\pm$ 0.0	0.005 $\pm$ 0.003	-
SS	0.003 $\pm$ 0.002	0.18 $\pm$ 0.04	0.002
n. dentes	25.63 $\pm$ 1.29	23.73 $\pm$ 0.61	0.28

Tabela 2. Comparação de níveis de biomarcadores/quimiocinas entre pacientes com periodontite e controle. Dados representados em média, em picograma por mililitro de saliva derivada de 32 pacientes (média $\pm$ erro padrão). Teste Mann-Whitney, $p < 0.05$ são estatisticamente diferentes.

Biomarcadores Quimiocinas	Controle (n=11)	PD (n=21)	Valor p Mann-Whitney
IL-8	378.56 $\pm$ 119.85	2457.7 $\pm$ 523.44	0.0008
IP-10	193.85 $\pm$ 64.216	423.78 $\pm$ 85.67	0.088
MCP-1	362.42 $\pm$ 87.07	1269.30 $\pm$ 260.51	0.003
MIG	173.33 $\pm$ 79.283	341.26 $\pm$ 77.23	0.055
RANTES	1.88 $\pm$ 1.04	6.18 $\pm$ 2.14	0.03

Gráficos

Gráfico 1. Comparação de níveis de MIG e IP-10 entre pacientes com periodontite e controle. Dados representados em média, em picograma por mililitro de saliva derivada de 32 pacientes (média $\pm$ erro padrão). Teste Mann-Whitney, $p < 0.05$ são estatisticamente diferentes.

Gráfico 2. Comparação de níveis de MCP-1 e IL-8 entre pacientes com periodontite e controle. Dados representados em média, em picograma por mililitro de saliva derivada de 32 pacientes (média $\pm$ erro padrão). Teste Mann-Whitney, $p < 0.05$ são estatisticamente diferentes.

Gráfico 3. Comparação de níveis de RANTES entre pacientes com periodontite e controle. Dados representados em média, em picograma por mililitro de saliva derivada de 32 pacientes (média $\pm$ erro padrão). Teste Mann-Whitney, $p < 0.05$ são estatisticamente diferentes.

4 Discussão

4 DISCUSSÃO

Níveis elevados de quimiocinas, IL-8, MCP-1 ($p < 0,01$) e RANTES ($p < 0,05$), foram identificados na saliva de pacientes com periodontite em comparação com pacientes saudáveis. Todas as quimiocinas mostraram 2 a 7 vezes níveis de concentração mais elevados em pacientes com DP do que em amostras controle.

MCP-1 desempenha papel crucial na mediação da migração seletiva e recrutamento de monócitos para a área com inflamação¹³. Monócitos e macrófagos ativados são capazes de expressar MCP-1, levando ao acúmulo de monócitos adicionais. Acredita-se que um fenótipo específico de macrófago esteja envolvido no processo degenerativo e reparativo durante a renovação tecidual, bem como na inflamação³². Após a ativação pelo estímulo bacteriano, os macrófagos secretam uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento^{18, 19, 33}, atuando como células apresentadoras de antígeno e fagócitos que invadem as células bacterianas invasoras^{18, 19}. Garrison & Nichols 1989³⁴ foram os primeiros a sugerir que esta função dos monócitos pode facilitar a predisposição periodontal nesses indivíduos.

Já foi demonstrado que a MCP-1 se expressa nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite leve a moderada, e estes níveis estão correlacionados com o grau de inflamação e gravidade da doença^{13, 27, 35}. Em contraste com estes resultados, Gemmell 2001²⁸ revelaram que apenas poucos leucócitos expressam MCP-1 nos tecidos periodontais. Emingil 2004³⁶ revelaram que pacientes com doença periodontal agressiva têm níveis significativamente elevados MCP-1 em amostras de fluido gengival periodontal, quando comparados aos indivíduos saudáveis.

Em nosso estudo, observamos que pacientes com periodontite têm níveis significativamente elevados de MCP-1 na saliva quando comparados com amostras saudáveis. É possível que a liberação de MCP-1 por monócitos ativados nos sítios de inflamação poderiam indiretamente ampliar as funções adicionais dos monócitos, recrutando células inflamatórias para o local, contribuindo para a destruição periodontal severa. Assim, MCP-1 pode funcionar diretamente ou sinergicamente com outros mediadores inflamatórios, implicando, assim, na ampliação e manutenção da resposta inflamatória, e na conseqüente destruição tecidual.

RANTES partilha muita das suas funções com outras quimiocinas ²¹. Esta molécula tem sido implicada na complexa interação de diversos aspectos da biologia de linfócitos T através da mediação do recrutamento seletivo de subgrupos de células T na inflamação periodontal, e que poderia contribuir para os sintomas da doença ³⁷. Estudos têm mostrado níveis elevados de RANTES no fluido gengival em pacientes com periodontite crônica, estando relacionados à ativa perda de ligamento e avançada destruição periodontal ^{26, 38}. A presença de RANTES em fluidos salivares poderia indicar que esta molécula está envolvida no desenvolvimento da resposta inflamatória gengival pelo recrutamento e ativação leucocitária. RANTES é uma eficiente quimiocina para células Th1 (mas não para as células Th2), induzindo uma transmigração "dose-resposta" das células Th1 ³⁹.

Portanto, RANTES pode desempenhar um papel significativo na regulação das reações imunes locais controlando o equilíbrio entre subgrupos de células T pró- e antiinflamatórias. A presença de células T e macrófagos em biópsias de tecido conjuntivo em pacientes com periodontite ²⁶ implica o seu potencial papel nos mecanismos de destruição tecidual associada com periodontite, sugerindo que

RANTES poderia contribuir para o aumento da infiltração de macrófagos / monócitos em tecidos periodontais observados nesta patologia.

Em nosso estudo, elevados níveis de RANTES na saliva poderia contribuir para a gravidade da destruição tecidual em pacientes com doença periodontal. Geralmente, o aumento dos níveis de MCP-1 e RANTES em pacientes com DP sugerem que estas quimiocinas são importantes mediadores na patogênese da periodontite. Considerando-se o papel do MCP-1 e RANTES no recrutamento e ativação de células inflamatórias, pode-se especular que o nível de destruição periodontal em pacientes poderia ser um resultado da elevada produção de MCP-1 e RANTES por células mononucleares no ambiente periodontal. Por isso, estas quimiocinas podem desempenhar um papel local fundamental na amplificação da resposta imune, bem como na destruição tecidual severa que ocorre na periodontite. Em conclusão, hiperatividade das células mononucleares em pacientes com DP pode estar relacionado à produção local de MCP-1 e RANTES.

Nesse estudo indicam que tanto IL-8 e IP-10 são estatisticamente relacionadas com a evolução clínica da doença periodontal.

Observamos no nosso estudo níveis aumentados de IL-8 na saliva de pacientes com periodontite e também a presença de IL-8 em indivíduos controles. De fato, a expressão de IL-8 é encontrada nos tecidos periodontais saudáveis e está relacionado a um baixo estado inflamatório subclínico, que diz respeito basicamente à presença de leucócitos polimorfonucleares, nesses tecidos^{40, 41}. Foi descrito anteriormente⁴² que o aumento nos níveis de IL-8 em tecidos doentes pode contribuir para a atração de leucócitos polimorfonucleares expressando CXCR1, o receptor da molécula IL-8.

Outros autores também encontraram concentrações aumentadas de IL-8 no FG de pacientes saudáveis ^{43, 44}. Tal como foi sugerido ⁴⁴, uma possível explicação poderia ser atribuída aos mediadores ainda não identificados da secreção de IL-8 contribuindo para a diferença de concentração observada. Além disso, poderia ser devido ao aumento do volume FG encontrado em sítios doentes variar significativamente entre pacientes com periodontite e controles saudáveis. A diferença no volume FG poderia depender da duração da coleta das amostras; em alguns estudos ⁴⁴, FG foi coletado com tiras de um filtro durante um período de 3 minutos, enquanto que em outros relatos ⁴⁰, as tiras foram mantidas na região do sulco durante 20 segundos.

A saliva é uma combinação de fluido gengival, tendo composição semelhante ao soro, sendo liberada a partir das glândulas salivares, a parótida, submandibular e sublingual são as três principais fontes ³¹. Existem vários métodos disponíveis para a coleta de saliva. Estes incluem coleta de saliva total não-estimulada, saliva estimulada, usando materiais como parafina, goma com base de vera ou de ácido cítrico, ou a coleta específica pela glândula salivar. Ao realizar análise de saliva para a determinação de biomarcadores periodontais, a saliva total é a mais relevante, porque contém fluido gengival, metabólitos de tecidos e células imunitárias ^{5, 31}. Como o fluxo não estimulado representa a principal condição intra-oral, este seria o melhor indicador do ambiente oral e da composição da saliva para análise ⁴⁵. Além disso, a estimulação pode aumentar a expulsão do fluido gengival da bolsa periodontal por meio do processo de mastigação. Isto pode aumentar artificialmente a concentração dos componentes da saliva ^{46, 47}.

5 Conclusão

5 CONCLUSÃO

- Os dados indicam que a saliva é um identificador adequado dos biomarcadores inflamatórios da periodontite.
- Os dados sugerem que o aumento dos níveis de quimiocinas MCP-1, IL-8 e RANTES na doença periodontal podem ser responsáveis pela manutenção de leucócitos específicos.
- Esse mecanismo poderia servir para promover a migração de leucócitos para os sítios de inflamação e da cronicidade da doença periodontal.
- Os níveis elevados de quimiocinas estão relacionados com a perda do nível clínico de inserção e com a profundidade de sondagem
- Mais estudos sobre biomarcadores inflamatórios devem ser feitos para avaliar a susceptibilidade individual à periodontite bem como para o diagnóstico da periodontite.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hart, T.C. and K.S. Kornman, *Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 202-15.
2. Nunn, M.E., *Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors*. Periodontol 2000, 2003. **32**: p. 11-23.
3. Greenstein, G. and J. Caton, *Periodontal disease activity: a critical assessment*. J Periodontol, 1990. **61**(9): p. 543-52.
4. Griffiths, G.S., et al., *Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Clinical assessment of the periodontium*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(7): p. 403-10.
5. Kaufman, E. and I.B. Lamster, *Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review*. J Clin Periodontol, 2000. **27**(7): p. 453-65.
6. Ebersole, J.L., et al., *Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(2): p. 347-52.
7. Taba, M., Jr., et al., *Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases*. Dent Clin North Am, 2005. **49**(3): p. 551-71, vi.
8. Queiroz, A.T.J., M; O'Connell, PA; Nóbrega, PB; Costa, PP; Kawata, VKS; Trevisa, GL; Novaes Jr., AB; Souza, SLS; Palioto, DB; Grisi, MFM, *Inflammation Markers in Healthy and Periodontitis Patients. A Preliminary Data Screening*. Brazilian Dental Journal, 2008. **19**(1): p. 6.
9. Miller, C.S., et al., *Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study*. J Am Dent Assoc, 2006. **137**(3): p. 322-9.

10. Lawrence, H.P., *Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health*. J Can Dent Assoc, 2002. **68**(3): p. 170-4.
11. Ito, T., et al., *Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis*. J Periodontol, 2008. **79**(2): p. 316-22.
12. Ozmeric, N., *Advances in periodontal disease markers*. Clin Chim Acta, 2004. **343**(1-2): p. 1-16.
13. Yu, X. and D.T. Graves, *Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva*. J Periodontol, 1995. **66**(1): p. 80-8.
14. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. Ann Periodontol, 1999. **4**(1): p. 1-6.
15. Kinney, J.S., C.A. Ramseier, and W.V. Giannobile, *Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1098**: p. 230-51.
16. Frodge, B.D., et al., *Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva*. J Periodontol, 2008. **79**(10): p. 1913-9.
17. Listgarten, M.A., *Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms*. J Periodontal Res, 1987. **22**(3): p. 172-8.
18. Kornman, K.S., R.C. Page, and M.S. Tonetti, *The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players*. Periodontol 2000, 1997. **14**: p. 33-53.
19. Page, R.C., *The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease*. J Periodontal Res, 1991. **26**(3 Pt 2): p. 230-42.
20. Seymour, G.J. and E. Gemmell, *Cytokines in periodontal disease: where to from here?* Acta Odontol Scand, 2001. **59**(3): p. 167-73.

21. Graves, D.T., *The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(3): p. 482-90.
22. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 217-42.
23. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
24. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 593-620.
25. Tonetti, M.S., et al., *Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections*. Infect Immun, 1994. **62**(9): p. 4005-14.
26. Gamonal, J., et al., *Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis*. J Periodontal Res, 2001. **36**(3): p. 194-203.
27. Yu, X., H.N. Antoniades, and D.T. Graves, *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues*. Infect Immun, 1993. **61**(11): p. 4622-8.
28. Gemmell, E., C.L. Carter, and G.J. Seymour, *Chemokines in human periodontal disease tissues*. Clin Exp Immunol, 2001. **125**(1): p. 134-41.
29. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.

30. D'Ambrosio, D., et al., *Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5111-5.
31. Navazesh, M., *Methods for collecting saliva*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **694**: p. 72-7.
32. Kreutz, M., et al., *Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro*. Res Immunol, 1992. **143**(1): p. 107-15.
33. Shapira, L., et al., *The secretion of PGE2, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients*. J Periodontol, 1994. **65**(2): p. 139-46.
34. Garrison, S.W. and F.C. Nichols, *LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis*. J Periodontal Res, 1989. **24**(2): p. 88-95.
35. Hanazawa, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues*. Infect Immun, 1993. **61**(12): p. 5219-24.
36. Emingil, G., G. Atilla, and A. Huseyinov, *Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(10): p. 829-34.
37. Ward, S.G. and J. Westwick, *Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): p. 457-70.

38. Gamonal, J., et al., *Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment*. J Periodontol, 2000. **71**(10): p. 1535-45.
39. Siveke, J.T. and A. Hamann, *T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 550-4.
40. Mathur, A., et al., *Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid*. J Periodontal Res, 1996. **31**(7): p. 489-95.
41. Payne, J.B., et al., *Gingival crevicular fluid IL-8: correlation with local IL-1 beta levels and patient estrogen status*. J Periodontal Res, 1993. **28**(6 Pt 1): p. 451-3.
42. Tsai, C.C., Y.P. Ho, and C.C. Chen, *Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis*. J Periodontol, 1995. **66**(10): p. 852-9.
43. Chung, R.M., J.T. Grbic, and I.B. Lamster, *Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid*. J Clin Periodontol, 1997. **24**(3): p. 146-52.
44. Ozmeric, N., et al., *The correlation of gingival crevicular fluid interleukin-8 levels and periodontal status in localized juvenile periodontitis*. J Periodontol, 1998. **69**(11): p. 1299-304.
45. Edgar, W.M., *Saliva: its secretion, composition and functions*. Br Dent J, 1992. **172**(8): p. 305-12.
46. Chapple, I.L., et al., *Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid*. Ann Clin Biochem, 1997. **34** (Pt 4): p. 412-21.
47. Sculley, D.V. and S.C. Langley-Evans, *Salivary antioxidants and periodontal disease status*. Proc Nutr Soc, 2002. **61**(1): p. 137-43.

Artigo em Inglês

Detection of Salivary Chemokines in Patients with Chronic Periodontal Disease

Priscila B Nóbrega¹

Mario Taba Jr.¹

Glauce L Trevisan¹

Priscila P Costa¹

Viviane K S Kawata¹

Arthur B Novaes Jr.¹

Sergio L S Souza¹

Marcio F M Grisi¹

Daniela B Palioto¹

* Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry.

Department of Clinical Analysis, Toxicology and Bromatology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo-Ribeirão Preto.

Running title: Detection of Salivary Chemokines in Patients with Chronic Periodontal Disease

Correspondence: Mario Taba Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@forp.usp.br

Clinical Relevance

Saliva has the potential to be used as a diagnostic fluid for periodontal diseases. Though, the present study showed that the increased levels of chemokines MCP-1, RANTES and IL-8 in PD individuals may be responsible for maintaining the infiltration of specific leukocytes. This mechanism would serve to promote the migration of leukocytes into the sites of inflammation and the chronicity of inflammation in human periodontitis.

ABSTRACT

Objective: Periodontitis produces an inflammatory proteins discharge that can be reflected in saliva. The aim of this study was to measure salivary concentrations of interleukin-8 (IL-8), RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), MIG (*monokine induced by gamma interferon*), IP-10 (*interferon γ -inducible protein of 10 kD*), e MCP-1 (*macrophage chemotactic protein-1*) in patients with chronic periodontitis and healthy.

Material and Methods: A total of 32 subjects was divided in 2 groups: healthy (Control, n=11) and patients with periodontitis (PD, n=21). Clinical data were recorded. Non-stimulated saliva samples were analyzed and identified simultaneously using the human flow cytometry multiplex assays.

Results: Of the target biomarkers examined, IL-8, MCP-1, MIG and IP-10 were found in greatest abundance in the saliva samples. It was found statistically significant differences among screened salivary proteins: IL-8 ($p = 0.0008$), MCP-1 ($p = 0.003$), and RANTES ($p = 0.03$). No statistical differences between the groups were observed for IP-10 (Ctrl 193.85 ± 64.21 . PD 423.78 ± 85.67 , $p = 0.08$), and MIG (Ctrl 173.33 ± 79.28 ; PD 341.26 ± 77.23 . $p = 0.05$). All cytokines levels were higher on PD patients in comparison with controls samples. Only samples that stayed within the detection limit for the assay were considered for statistical analysis. For Control group, no correlation was found between clinical parameters and the chemokines levels. In PD group, positive Spearman correlation was observed between total amount of MCP-1 and Age ($r = 0.648$; $p < 0.001$) and negative correlation was observed between MCP-1 with PPD ($r = -0.462$, $p = 0.03$) and CAL ($r = -0.461$, $p = 0.003$). Significant negative

correlation was found between total amount of RANTES and the percentage of SUP ($r = -0.457$, $p = 0.03$).

Conclusion: The above results suggest that the increased levels of chemokines MCP-1, RANTES and IL-8 in PD individuals may be responsible for maintaining the infiltration of specific leukocytes. This mechanism would serve to promote the migration of leukocytes into the sites of inflammation and the chronicity of inflammation in human periodontitis.

INTRODUCTION

Chronic periodontitis is an inflammatory disease of the supporting tissues of the teeth caused by groups of specific microorganisms that triggers the host response, resulting in progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone with pocket formation, recession, or both (Armitage 1999).

Traditional periodontal diagnostic methods include assessment of clinical parameters and radiographs. Though efficient, these conventional techniques are inherently limited in that only a historical perspective, not current appraisal, of disease status can be determined. Advances in the use of oral fluids as possible biological samples for objective measures of current disease state, treatment monitoring, and prognostic indicators have boosted saliva and other oral-based fluids to the forefront of technology. Oral fluids contain locally and systemically derived mediators of periodontal disease, including microbial, host-response, and bone-specific resorptive markers (Kinney et al., 2007).

The majority of research reports of biomarkers and periodontitis have used GCF as a sample fluid (Taba et al., 2005). However, sampling of GCF is time consuming and reflects gingival inflammation at each specific site. The use of saliva to measure biomarkers offers several advantages over GCF. As collection of saliva requires no specialized equipment or techniques, it is faster and more convenient for the patient and the practitioner to collect. In addition, as whole saliva represents a pooled sample with contributions from all periodontal sites, analysis of biomarkers in saliva may provide an overall assessment of disease status as opposed to site-specific GCF analysis (Miller et al., 2006).

Although most biomarkers in oral fluids represent inflammatory mediators from peripheral blood (Queiroz et al., 2008), the role of chemokines molecules in the pathogenesis of periodontal disease remains unknown. Inflammation and tissue destruction are respectively early and continuing events during host mediated process in response to the bacterial infection (Listgarten 1987). In these processes, mononuclear and polymorphonuclear phagocytes are key components of host defenses (Kornman et al. 1997). Upon stimulation by bacterial products these cells and local resident cells such as fibroblasts synthesize and secrete a wide variety of inflammatory and immune mediators (Page 1991). The appearance of specific types of leukocytes in inflammatory infiltrate might be mediated by cell-specific chemotactic cytokines called chemokines that were recently identified (Kornman et al. 1997, Seymour & Gemmell 2001). These chemoattractant cytokines are responsible for the migration and subsequent activation of specific types of leukocyte populations into inflamed periodontal tissues (Graves 1999).

Chemokines are relevant in inflammatory process not only for their role in regulating leukocyte recruitment, but also for other physiological and pathological activities, such as lymphoid trafficking, T helper (Th) Th1/Th2 development and wound healing (Rossi & Zlotnik 2000, Baggiolini 2001). Chemokines are produced by activated monocyte/macrophage, endothelial cells and fibroblasts (Graves 1999, Rossi & Zlotnik 2000, Baggiolini 2001) and exert their effects on target cells by binding to specific receptors on the surface of a variety of cell types (Sallusto et al. 2000). They consist of about 40 small distinct, but structurally and functionally related secretory proteins (Baggiolini 2001) that can be distinguished in four subfamilies of chemokines on the basis of structural, functional and genetic criteria,

of which there are two major subgroups, the CXC and CC chemokines (Graves 1999, Rossi & Zlotnik 2000, Sallusto et al. 2000, Baggiolini 2001).

Interleukin-8 (IL-8), a CXC chemoattractant factor for polymorphonuclear leukocytes, and RANTES, a CC chemokine, which can attract T cells, monocytes and eosinophils, have been found in gingival crevicular fluid and in situ in periodontal disease patients (Tonetti et al, 1994; Gamonal et al, 2001).

Other CC chemokines found in diseased periodontal tissues are monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Xiaohui et al, 1993), and interferon gamma inducible protein 10 (IP-10) (Gemmell et al, 2001). The chemokines IP-10 have been associated with the development of Th1 responses (Sallusto et al, 1998), while MCP-1 is linked to Th2 responses (D'Ambrosio et al, 1998). Different chemokines that can attract a variety of cell subpopulations expressing chemokine receptors are present in periodontal disease. It has been previously shown that MCP-1 is synthesized in inflamed gingival tissues by endothelial cells and mononuclear phagocytes of patients with chronic periodontitis (Yu et al. 1993, Yu & Graves 1995).

Since inflammatory cell migration is a complex process that involves many different factors, the evaluation of the pattern of chemokines could be useful in determining their role in the pathogenesis of periodontal disease.

The purpose of this study was to assess the profile of salivary chemokines levels and its relationship with the clinical parameters of the disease and also whether it could be a useful diagnostic tool to detect changes preceding serious clinical complications.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This study was carried out in the Graduate Clinic of the Department of Oral Surgery and Periodontology of the University of São Paulo. It was reviewed and approved by the Institutional Human Research Committee. All subjects were, on an individual basis, informed about the nature of the proposed study and informed consent forms were signed.

Subjects underwent anamnesis, clinical and radiographic examination. According to their periodontal condition and general health status, they were invited to participate in the study if they fulfilled the entry criteria.

Inclusion criteria were: (i) presence of at least 15 teeth; (ii) at least one site with probing depth $\geq 5\text{mm}$ and two teeth with attachment loss $\geq 6\text{mm}$; (iii) to be 35 years or older. Exclusion criteria included: (i) use of antibiotics or periodontal treatment in the previous 6 months; (ii) smoking within the past 5 years; (iii) pregnancy or lactancy; (iv) concomitant medical therapy; (v) presence of inflammatory or other systemic conditions.

A total of 32 subjects were divided in two groups: 11 healthy subjects (Control) and 21 patients with periodontal disease (PD).

Clinical Parameters Collection

Clinical examination was performed by a single experienced examiner and recorded at six sites per tooth with the aid of a computerized periodontal probe⁸. The parameters recorded were: probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP), suppuration (SUP) and number of teeth (n. teeth).

Saliva Sample Collection

Non-stimulated whole expectorated saliva was collected (~5ml) from each subject according to a modified version of the method described by Navazesh (1993). Briefly, subjects rinsed their mouths with tap water and then expectorated the whole saliva into sterile tubes. Saliva samples were placed on ice immediately and aliquoted before freezing at -80°C.

Salivary Proteins Analysis

The salivary inflammatory markers were identified simultaneously using the human flow cytometry multiplex assays (CBA- Cytometric Bead Array, BD Bioscience, San Jose, CA.). The following mediators were analyzed: IL-8 (interleukin 8), RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted), MIG (monokine induced by INF gamma), IP-10 (interferon inducible protein), and MCP-1 (macrophage chemoattractant protein 1). The CBA was used according to the manufacturer's protocol.

Briefly, standard mediators were solubilized in assay diluent. Dilutions 10-ml samples (standards or test) were added to a 50-ml cocktail of capture beads and detector antibodies, and the mixture was incubated for 4 hours at room temperature in the dark. Excess unbound detector antibody was washed off before data acquisition. Two-color flow cytometric analyses were performed using a flow cytometer (FACSCanto, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA.). A total of 2,000 events were acquired following the supplied protocol. Analysis was performed using the appropriate CMA analysis software (FCap Array, Becton Dickinson.).

Statistical analysis

The clinical parameters were expressed as mean $\pm$ standard error and analysed by the ANOVA test. Because the data were not normally distributed, biomarkers levels in saliva were assessed using Mann-Whitney test to compare means of clinical parameters and of salivary proteins levels between groups. A *p* value of 0.05 was considered to be statistically significant. The non-parametric Spearman's coefficient was used to analyze the correlations between clinical parameters and salivary biomarkers cytokine levels. GraphPad InStat software package was used for statistical analysis.

RESULTS

Demographics and clinical characteristics

Thirty two patients ranging in age from 37 to 63 years were evaluated for salivary chemokines and periodontal condition. The periodontal clinical parameters were recorded during the clinical examination and the concentrations of salivary chemokines were measured in saliva samples of 11 healthy subjects (Control) and 21 patients with periodontal disease (PD). Twenty-one were women and eleven were men. (Table 1)

Data showed that the evaluated clinical parameters PPD, CAL, SUP and BOP were statistically different between groups ($p < 0.05$). The differences of 1.13mm in PPD and 1.84mm in CAL between control and PD groups demonstrate distinct clinical conditions and the similar amount of remaining teeth and age assure unbiased comparisons. The entry criterion of a minimum of 15 remaining teeth was used to minimize if any the impact of additional risk factors of an unbalanced occlusion on periodontal status and inflammatory mediators. Both groups presented more than 23 teeth in average.

The Control group showed no or few signs of inflammation ($BOP = 0.3 \pm 0.2\%$) and absence of periodontal pockets, whereas for PD group, inflammation ($BOP = 18 \pm 4\%$) and periodontal pockets were present. The observation that CAL and PPD were greater in diseased subjects as compared to healthy subjects is a confirmation of periodontitis. The PD patients showed several sites with periodontal pockets from 4 to 6mm (32.9 ± 4.2) and a few periodontal pockets ≥ 7 mm (4.7 ± 1.1) in average, indicating an established periodontitis from moderate to severe condition.

Concentration of chemokines in saliva

The non-stimulated saliva samples of 32 subjects were analyzed for protein content by a multiplex assay. Selected chemokines were measured to identify differences between healthy controls and periodontal patients. The mean concentrations of salivary chemokines are presented in picogram per milliliter (pg/ml) of saliva (Table 2).

Of the target examined chemokines, IL-8, MCP-1, MIG and IP-10 were found in greatest abundance in the saliva samples and there were statistically significant differences between groups for the following ones: IL-8 ($p=0.0008$), MCP-1 ($p=0.003$), and RANTES ($p=0.03$). No statistically significant differences between groups were observed for IP-10 (Control 193.85 ± 64.21 ; PD 423.78 ± 85.67 , $p=0.08$), and MIG (Control 173.33 ± 79.28 ; PD 341.26 ± 77.23 , $p=0.05$). However, all chemokines showed 2 to 7 fold higher concentration levels in PD patients than in controls samples (Table 2).

Relationship of salivary chemokines and the clinical outcomes

Two multiple regression analysis models were run. In the first run, PPD was used as the dependent variable and the following predictor variables were entered in order to generate a statistically significant model IL-8, IP-10, SUP and RANTES ($R=0.902$, $p<0.000$). The relationship of each predictor variables with PPD in this model was IL-8 ($B=0.47$, $p<0.000$), IP-10 ($B=0.48$, $p<0.000$), SUP ($B=0.17$, $p=0.06$) and RANTES ($B=0.18$, $p=0.07$). In the second run, CAL was used as the dependent variable ($R=0.916$, $p<0.000$). The relationship of the each predictor variables with CAL was similar to the PPD model. In this model IL-8 ($B=0.53$, $p<0.000$), IP-10 ($B=0.45$, $p<0.000$), SUP ($B=0.14$, $p=0.09$) and RANTES ($B=0.18$, $p=0.05$). The two regression models indicate that both IL-8 and IP-10 are statistically related to the clinical outcome of periodontitis.

DISCUSSION

Leukocyte recruitment and influx into and through the periodontal tissues are dependent on the expression of adhesion molecules on endothelial cells and on the chemotactic factors that are synthesized and released into the inflammatory area (Kornman et al. 1997).

Selective chemokine-mediated recruitment of different cell types to the gingival tissue is potentially involved in the immunopathogenesis of periodontitis. IL-8, RANTES, MCP-1 and IP-10 are chemokines found in diseased periodontal tissues (Gemmell et al, 2001; Garlet et al, 2003). MCP-1 is a potent chemoattractant for monocytes and macrophages (Jiang et al, 1991) whereas IP-10 attracts monocytes and activated T lymphocytes to inflammatory foci (Farber, 1997). IL-8 and RANTES are involved in the recruitment of neutrophils, eosinophils, monocytes and TH1 cells to infected sites (Luster, 1998). RANTES is also a chemotactic factor for osteoclasts (Votta et al, 2000).

In the present study, elevated chemokines levels were present in saliva of patients with chronic periodontal disease in comparison with healthy patients. IL-8, MCP-1 ($p < 0.01$) and RANTES ($p < 0.05$) showed significant differences between healthy and periodontal patients. This might suggest that elevated salivary RANTES levels could contribute to the severity of tissue destruction in these patients.

MCP-1 plays a crucial role in mediating the selective migration and recruitment of monocytes into the crevicular area (Yu & Graves 1995). Activated monocyte/macrophages themselves are able to express MCP-1, leading to the accumulation of additional monocytes. It is believed that specific macrophage

phenotype is involved in the degenerative and reparative process during tissue turnover as well as inflammation (Kreutz et al. 1992). Inflammatory macrophage phenotype identified at sites of inflammation has a number of functions (Sorg 1991). Upon activation of bacterial stimuli, they secrete a wide variety of cytokines and growth factors (Page 1991, Shapira 1994, Kornman et al. 2000), they act as an antigen presenting cell, and phagocytoses the invading bacteria (Page 1991, Kornman et al. 1997). Garrison & Nichols (1989) were first to hypothesize that monocyte function can predispose individuals to periodontal breakdown.

It has been previously demonstrated that MCP-1 was expressed in gingival tissues of patients with mild-to-moderate periodontitis and these levels have been demonstrated to be correlated with the degree of inflammation and severity of disease (Yu et al. 1993; Hanazawa et al. 1993; Yu & Graves 1995). In contrast to these results, Gemmell et al. (2001) found that only few leukocytes expressed MCP-1 in the periodontal tissues. Emingil et al (2004) revealed that aggressive periodontal patients have significantly elevated MCP-1 levels in GCF samples when compared to periodontal healthy subjects.

In our study, we revealed that chronic periodontitis patients have significantly elevated MCP-1 levels in saliva samples when compared to periodontal healthy subjects, and that are significant negative correlation between MCP-1 levels and PPD and CAL clinical parameters. It is possible that MCP-1 releasing from activated monocyte at sites of inflammation could indirectly amplify monocyte functions by recruiting additional cells to the inflammatory site and could contribute to the severe periodontal destruction. Thus, MCP-1 may function either directly or synergistically with other inflammatory mediators, thereby involving in the

amplification and continuation of the inflammatory response, and in the ensuing tissue destruction.

RANTES share many of its functions with other chemokines (Graves 1999). These molecule have now been implicated in the complex interaction of the several aspects of T-lymphocyte biology by mediating selective recruitment of T-cell subsets in periodontal inflammation that could contribute to the symptoms of periodontal disease (Ward & Westwick 1998). Studies have shown the presence of high levels of GCF RANTES in patients with chronic periodontitis and these levels have been shown to be related to the active attachment loss and advanced periodontal destruction (Gamonal et al. 2000a, b, 2001). The presence of RANTES in salivary fluids could be involved in the development of the gingival inflammatory response by mediating leukocyte recruitment and activation. RANTES is an efficient chemo-attractant for Th1 cells (but not for Th2 cells), inducing a dose response transmigration of Th1 cells (Siveke et al, 1998).

Therefore, RANTES may play a significant role in the regulation of local immune reactions controlling the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell subsets. The presence of T cells and macrophages in biopsies of connective tissue in periodontitis patients (Gamonal et al, 2001) implies their potential role in the mechanisms of tissue destruction associated with periodontitis, suggesting that RANTES could contribute to the increased infiltration of macrophage/monocytes in periodontal tissues observed in this pathological condition.

In our study, there was a significant negative correlation between salivary RANTES levels and the clinical SUP signs. This might suggest that elevated salivary RANTES levels could contribute to the severity of tissue destruction in

chronic periodontal patients. Overall, increased MCP-1 and RANTES levels in PD patients suggest that these CC chemokines are important mediators in the pathogenesis of periodontitis. Considering the role of MCP-1 and RANTES levels in both activation and recruitment of inflammatory cells, it can be speculated that the level of periodontal destruction in patients could be a result of the elevated production of MCP-1 and RANTES by mononuclear cells in periodontal environment. Therefore, these chemokines may play a key role in local amplification of the immune response as well as in severe periodontal tissue breakdown in the pathogenesis of periodontitis. In conclusion, hyperactivity of mononuclear cells in PD patients could be related to locally produced MCP-1 and RANTES levels.

We found that the prevalence of levels of IL-8 was higher in the saliva of patients, but was also present in controls subjects. In fact expression of IL-8 is found in healthy periodontal tissues and is related to a low subclinical inflammatory state, basically comprised of polymorphonuclear leukocytes, in these tissues (Mathur et al, 1996; Payne et al, 1993). An increase in IL-8 levels in diseased tissues has been previously described (Tsai et al, 1995) and may account for the attraction of polymorphonuclear leukocytes expressing CXCR1, the receptor for IL-8 molecule.

Other authors also found that IL-8 concentrations were increased in GCF of healthy donors (Chung et al, 1997; Özmeric et al, 1998). As suggested (Özmeric et al, 1998), one possible explanation could be attributed to as yet unidentified mediators of IL-8 secretion accounting for the difference in concentration observed. Additionally, it could be due to the increased GCF volume found in diseased sites varies significantly between periodontitis patients and healthy controls. The

difference in GCF volume could depend on the duration of sample collection; in certain studies (Özmeric et al, 1998), GCF was collected with filter strips for a 3 minute period, whereas in other reports (Mathur et al, 1996), strips were maintained in the crevice for 20 seconds.

Whole saliva is a combination of gingival crevicular fluid, which has a composition similar to serum, and fluid released from salivary glands, of which the parotid, submandibular and sublingual are the three major sources (Navazesh, 1993). There are numerous methods available for saliva collection. These include collection of whole unstimulated saliva, saliva stimulated by using materials such as paraffin wax, gum base or citric acid, or collection of specific gland saliva. When conducting analysis of saliva for periodontal biomarkers, whole saliva is more relevant as it contains gingival crevicular fluid, immune cells and tissue metabolites (Navazesh, 1993; Kaufman & Lamster, 2000). As unstimulated flow represents the major intra-oral condition, this would provide a more accurate account of the oral environment and saliva composition for analysis (Edgar, 1992). In addition, the stimulation may increase the expulsion of gingival crevicular fluid from the periodontal pocket through the mastication process. This may artificially increase the concentration of components in the saliva (Chapple et al. 1997; Sculley & Langley-Evans, 2002).

The above results suggest that the increased levels of chemokines MCP-1, RANTES and IL-8 in PD individuals may be responsible for maintaining the infiltration of specific leukocytes. This mechanism would serve to promote the migration of leukocytes into the sites of inflammation and the chronicity of inflammation in human periodontitis.

ACKNOWLEDGMENTS

We applied the sequence-determines-credit (SDC) approach for the sequence of authors.

Authors thank the kind assistance of Fabíola Singaretti de Oliveira from the Molecular Biology Laboratory of Ribeirão Preto School of Dentistry, the University of São Paulo (USP), for samples handling and the graduates students Ingrid Webb Josephson Ribeiro and Karina Kimiko Yamashina Pereira from Department of Oral Surgery and Periodontology of Ribeirão Preto School of Dentistry USP for the assistance with patient screening and sample collection.

REFERENCES

1. Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 4, 1–7.
2. Baggiolini, M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine* 250, 91–104.
3. Chapple ILC, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SRJ & Whitehead TP (1997) Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Annals of Clinical Biochemistry* 34, 412–421.
4. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1997;24:146±152
5. D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 1998;161:5111–5115.
6. Edgar WM (1992) Saliva: Its secretion, composition and functions. *British Dental Journal* 172, 305–312.
7. Emingil G, Atilla G, Hu'seyinov A: Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 829–834.
8. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61:246–57.
9. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodont Res* 2001;36:194–203.

10. Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research* (2001) 36, 194–203.
11. Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. Levels of interleukin-1b, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of Periodontology* (2000a) 71, 1535–1545.
12. 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; 38:210–7.
13. Garrison, S. W. & Nichols, F. C. (1989) LPS elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1B in patients with adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 24, 88–95.
14. Gemmel E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 2001;125:134– 141.
15. Graves, D. T. (1999) The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clinical Infectious Disease* 28, 482–490.
16. Hanazawa, S., Kawata, T., Takeshita, A., Kumeda, H., Okithu, M., Tanaka, S., Yamamoto, Y., Masuda, T., Umemoto, T. & Kitano, S. (1993) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: Increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. *Infection and Immunity* 161, 5219–5224.

17. Jiang Y, Tabak LA, Valente AJ, Graves DT. Initial characterization of the carbohydrate structure of MCP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178:1400–4.
18. Kaufman E & Lamster IB Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *Journal of Clinical Periodontology* (2000) 27, 453–465
19. Kinney, JS; Ramseier, CA and Giannobile, NDWV. Oral Fluid–Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2007).1098: 230–251
20. Kirschbaum, C. & D.H. Hellhammer. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 1994 19: 313–333.
21. Kirschbaum,C.&D.H.Hellhammer. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology* 1989 22: 150–169.
22. Kornman, K. S., Page, R. C. & Tonetti, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000 (1997)14, 33–53.
23. Kreutz, M., Krause, S. W. & Rehm, A. Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro.*Research in Immunology* (1992)143, 107–115.
24. Listgarten, M. A. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *Journal of Periodontal Research* (1987) 22, 172–178.
25. Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436–45.
26. Malamud, D. & L. Tabak.. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993 Vol. 694.

27. Mathur A, Yang C, Wolff L. Cytokines in gingival crevicular fluid of periodontally diseased and healthy sites. *J Periodont Res* 1996;31:489±495.
28. Miller CS, King CP Jr, Langub C, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. A cross-sectional study. *JADA* 2006; 137(5):7-16.
29. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci* 1993; 694:72-77.
30. Özmeric N, Bal B, Balos K, Berker E, Bulut S. The correlation of gingival crevicular fluid interleukin-8 levels and periodontal status in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1998;69:1299±1304.
31. Page, R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* (1991) 26, 230–242.
32. Payne JB, Reinhardt RA, Masada MP et al. Gingival crevicular fluid IL-8: correlation with local IL-1 beta levels and patient estrogen status. *J Periodont Res* 1993;28:451–53.
33. Queiroz, AC; Taba Jr., M; O'Connell, PA; Nóbrega, PB; Costa, PP; Kawata, VKS; Trevisa, GL; Novaes Jr., AB; Souza, SLS; Palioto, DB; Grisi, MFM. Inflammation Markers in Healthy and Periodontitis Patients. A Preliminary Data Screening. *Braz Dent J* (2008) 19(1): 3-8.
34. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors.
35. *Annu Rev Immunol* (2000)18:217-242.
36. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875–883.
37. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* (2000)18:593-620.

38. Sculley DV; and Langley-Evans, SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society* (2002), 61, 137–143.
39. Seymour, G. J. & Gemmell, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica* (2001) 56, 167–173.
40. Shapira, L., Soskolne, W. A., Sela, M. N., Offenbacher, S. & Barak, V. The secretion of PGE₂, IL-1b, IL-6, and TNFa by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *Journal of Periodontology* (1994)65, 139–146.
41. Siveke JT, Hamann A. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 1998; 160:550±554.
42. Sorg, C. Macrophages in acute and chronic inflammation. *Chest* 100, (1991) 173S–75S.
43. Taba M Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; 49(3):551-571.
44. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocytespecific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun* 1994;62:4005–4014.
45. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:853–859.
46. Votta BJ, White JR, Dodds RA et al. CKbeta-8 [CCL23], a novel CC chemokine, is chemotactic for human osteoclast precursors and is expressed in bone tissues. *J Cell Physiol* 2000; 183:196–207.
47. Ward, S. G. & Westwick, J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochemical Journal* (1998)333, 457–470.
48. Xiaohui Y, Antoniades H, Graves D. Expression of monocyte chemottractant protein-1 in human inflamed gingival tissue. *Infect Immun* 1993;61:4622–4628.

49. Yu, X. & Graves, D. T. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *Journal of Periodontology* (1995)56, 80–88.
50. Yu, X., Antoniades, H. N. & Graves, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. *Infection and Immunity* (1993) 61, 4622–4628.

TABLES

Table 1. Clinical and demographics parameters of the groups (mean $\pm$ standard error). Mann-Whitney test, $p < 0.05$ are significantly different.

Clinical parameters	Control (n=11)	PD (n=21)	<i>p value</i> Mann-Whitney
Age	41.54 $\pm$ 1.20	45.19 $\pm$ 1.25	0.05
PPD (mm)	1.93 $\pm$ 0.07	3.06 $\pm$ 0.14	<0.0001
CAL	1.97 $\pm$ 0.07	3.81 $\pm$ 0.25	<0.0001
SUP	0.0 $\pm$ 0.0	0.005 $\pm$ 0.003	-
BOP	0.003 $\pm$ 0.002	0.18 $\pm$ 0.04	0.002
n. teeth	25.63 $\pm$ 1.29	23.73 $\pm$ 0.61	0.28

Table 2. Comparison of chemokines biomarkers levels in patients with periodontitis and controls. Data represent the mean in pg per milliliter of saliva derived from 32 subjects (mean $\pm$ standard error). Mann-Whitney test, $p < 0.05$ are significantly different.

Chemokines biomarkers	Control (n=11)	PD (n=21)	<i>p value</i> Mann-Whitney
IL-8	378.56 $\pm$ 119.85	2457.7 $\pm$ 523.44	0.0008
IP-10	193.85 $\pm$ 64.216	423.78 $\pm$ 85.67	0.088
MCP-1	362.42 $\pm$ 87.07	1269.30 $\pm$ 260.51	0.003
MIG	173.33 $\pm$ 79.283	341.26 $\pm$ 77.23	0.055
RANTES	1.88 $\pm$ 1.04	6.18 $\pm$ 2.14	0.03

Anexos

ANEXO A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/032/FORP/28022007

Prezado(a) Professor(a),

Ref.: Processo nº 2007.1.104.58.0
Caae n. 0010.0.138.000-07

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 75ª Sessão realizada no dia 28 de fevereiro de 2007, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Análise de biomarcadores na saliva como meio de diagnóstico e avaliação de risco"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, esclarecemos que o **Relatório Parcial** deverá ser encaminhado à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **28 de fevereiro de 2008** e o **Relatório Final** até o dia **28 de fevereiro de 2009**, conforme modelo que se encontra no site da FORP/USP (*link*: Colegiados e Comissões - Comitê de Ética em Pesquisa - Formulários do Pesquisador para entrega dos Relatórios Parcial ou Final).

Atenciosamente,

Luci Rose Nassif Meneses
Secretária "ad-hoc" do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. MÁRIO TABA JUNIOR

Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia – FORP/USP

ANEXO B. Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Termo de consentimento

Eu, _____, RG _____, CPF _____, fui convidado a participar da pesquisa “Análise de biomarcadores na saliva como meio de diagnóstico e avaliação do risco sistêmico”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mário Taba Júnior e da mestrandia Priscila Paganini Costa e afirmo que todas as implicações abaixo relacionadas me foram devidamente esclarecidas, inclusive verbalmente, através de questões levantadas junto aos pesquisadores, não restando qualquer dúvida que possa sugerir que tal consentimento não tenha sido feito de livre e espontânea vontade. Estou ainda ciente de que:

- 1) O objetivo desta pesquisa é realizar uma avaliação clínica de dados periodontais e análise da saliva em pacientes portadores de periodontite crônica (um tipo de doença que destrói rapidamente o osso em volta dos dentes) e/ ou com doença do coração e diabetes.
- 2) O paciente será submetido a um exame clínico computadorizado para a obtenção dos dados clínicos e coleta de saliva.
- 3) O paciente receberá o tratamento periodontal básico composto por raspagem do tártaro e placa em uma única sessão.
- 4) Os procedimentos que poderão causar desconforto para o paciente são os do exame clínico e coleta da saliva.
- 5) Sei que tenho liberdade de me recusar a participar ou de me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma represália ou negligência em meu tratamento.
- 6) Sei também que todos os dados que forem relatados ao pesquisador em confidência serão mantidos sigilosos, garantindo minha privacidade.
- 7) Tenho consciência de que qualquer dano à minha saúde que seja decorrente da minha participação nesta pesquisa será reparado sem que eu necessite fazer qualquer despesa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Paciente ou responsável

Prof. Dr. Mario Taba Júnior

Mestranda Priscila Brasil da Nóbrega (8116.6852)