

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES
SANGUÍNEAS DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

ORIENTADORA: Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes
Nascimento

CORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana Amado Libério

SÃO LUIS

2015

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES
SANGUÍNEAS DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Maranhão, para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes Nascimento

CORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana Amado Libério

São Luis

2015

Nascimento, Johnny Ramos do

Caracterização fenotípica de células mononucleares sanguíneas de pacientes com periodontite crônica/Johnny Ramos do Nascimento. – São Luís, 2015.

90f.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes Nascimento

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Amado Libério

Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, 2015.

1. Imunologia-imunofenotipagem 2.Periodontite Crônica. 3. Citocinas I. Título.

CDU 612.017

JOHNNY RAMOS DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Maranhão, para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes Nascimento

CORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana Amado Libério

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes Nascimento (Orientadora)

Profa. Dra. Andrezza Maciel (Convidada)

Profa. Dra. Rosana Costa Casanovas de Carvalho

Prof. Dr. Paulo Vitor Pereira Soero

À minha família, pelo amor,
carinho, força e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me guiou no caminho da minha felicidade.

À minha Mãe, Maria Albeneide Ramos, pelo amor eterno, dedicação e perseverança.

Ao meu Pai, Evando Ferreira, e a minha madrasta, Gessiaria Santos, por conferir o suporte necessário para que eu seguisse meu sonho.

À minha irmã, Karolinne Ramos, pela paciência e apoio.

À minha família, que sempre acreditou no meu potencial e me ajudou a conquistar meus objetivos.

Ao Eriko Barros, por estar sempre ao meu lado, me encorajando a seguir e conquistar os meus objetivos.

À Profa. Flávia Nascimento, por abrir as portas do Laboratório de Imunofisiologia para a realização deste trabalho e por ter-me feito parte da Família LIF.

À Família LIF que me acolhe de forma carinhosa e pelos conselhos, apoios e momentos felizes, em especial Izabel Serra, Daniel Freire e Renata Adélia.

À Dalyla Cysne, por estar ao meu lado desde o início desta jornada, sua presença foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Profa Ana Paula, por ter me apresentado a citometria de fluxo e ter confiado a mim uma grande responsabilidade.

Às Profas Rosana Casanovas e Sandra Leite e ao Prof Antonio Luis, por me acolherem neste projeto e por mostrarem o mundo da Periodontite para um farmacêutico.

À FAPEMA pela bolsa recebida e financiamento.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta monografia.

"Tudo vai dar certo."
(Dalyla Cysne)

RESUMO

Introdução: A periodontite crônica (PC) é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes que, em seu último estágio, pode resultar na perda do elemento dentário. Estudos têm demonstrado que o tipo de resposta imune do hospedeiro e o envolvimento de células imunes, como macrófagos e linfócitos T, podem influenciar e alterar a evolução da doença. Apesar de estar restrita ao tecido periodontal e ser associada a outras doenças, a repercussão sistêmica da PC sobre as células imunes ainda não está esclarecida.

Objetivo: Caracterizar o perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos com Periodontite crônica. **Métodos:** Trata-se de um estudo do tipo transversal com pacientes portadores de PC moderada ou avançada, atendidos na Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da UFMA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMA e todos os indivíduos receberam informações a respeito da pesquisa e assinaram o TCLE. Foram formados o Grupo Controle (GC)(n= 22), com indivíduos saudáveis e sem PC, e o Grupo Periodontite Crônica (GPC)(n=26), com pacientes com PC moderada ou avançada e sem alterações sistêmicas. Foram coletadas amostras de sangue (4 mL), para obtenção do plasma e dosagem das citocinas interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-17A pelo método CBA. Para imunofenotipagem, as PBMCs foram obtidas por gradiente de densidade utilizando a solução de Ficoll-Paque™ PLUS. Para fenotipagem de monócitos, linfócitos B e linfócitos T as PBMCs foram contadas, ajustadas e marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 e anti-CD14 conjugados com FITC; anti-CD4, anti-CD25, anti-CD14 e anti-HLA-DR conjugados com PE e anti-CD19, anti-CD86, anti-CD8 e anti-CD4 conjugados com PerCP. As amostras foram adquiridas em citômetro FACSCalibur e os dados analisados nos softwares FCAP ARRAY Versão 3.0 e FlowJo Versão 10. **Resultados:** Houve aumento no número total de Linfócitos T (CD3+), bem como de Linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+) e dos Linfócitos T auxiliares ativados (CD3+/CD4+/CD25+) no GPC quando comparado ao GC. Houve também um aumento no número de monócitos (CD14+), bem como dos monócitos apresentadores de antígenos (CD14+/HLADR+/CD86+) quando comparados ao GC. Não houve diferença estatística entre o GC e GPC no número de Linfócitos B (CD19) e de linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+). Não houve diferença na dosagem das citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17 entre os grupos. **Conclusão:** A PC, sendo uma doença infecto-inflamatória local, pode promover alterações no número monócitos e linfócitos T auxiliares circulantes e induzir sua ativação, mas estas alterações parecem não refletir no perfil sistêmico de citocinas.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite Crônica, PBMC, citocinas, imunofenotipagem.

ABSTRACT

Introduction: Chronic periodontitis is an infectious inflammatory disease from dental protecting and supporting tissues. Its final stages is tooth loss. Studies have shown that the type of host immune response and the kind of immune cells involved, such as, macrophages and T lymphocytes, can influence and change disease progression. Despite its restriction to periodontal tissue and its association to other diseases, the systemic effects of chronic periodontitis on immune cells are still not clear. **Objective:** The aim of this study is to characterize the phenotypical profile of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the individuals with chronic periodontitis. **Patient and Methods:** It is a cross-sectional study with chronic periodontitis patients, treated at the Periodontitis Clinic of UFMA Dentistry Course. The Ethics Committee of UFMA approved the project and all the patients were aware of the research and signed the TCLE. Two groups were established: the control group (GC)(n=22), with healthy individuals and no trace of chronic periodontitis, and the group of chronic periodontitis patients (GPC)(n=26) with no systemic alterations. Blood samples were collected (4 mL) to obtain plasma to perform the IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α and IL-17A cytokines dosage, through CBA method. For immunophenotyping, PBMC were obtained through Ficoll-Paque™ PLUS density gradient solution method. For phenotyping of monocytes, B lymphocytes and T lymphocytes, the PBMC were counted, adjusted and abeled with the following monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes: anti-CD3 and anti-CD14 conjugate with FITC; anti-CD4, anti-CD25, anti-CD14 and anti-HLA-DR conjugated with PE e anti-CD19, anti-CD86, anti-CD8 and anti-CD4 conjugated with PerCP (BD Biosciences-Pharmingen). Samples were acquired in cytometer (BD FACSCalibur - BD Biosciences) and analyzed in FCAP ARRAY software Version 3.0 and Version 9 FlowJo (TreeStar). **Results:** There was an increase of total T lymphocytes (CD3+) as well as helper T lymphocytes (CD3+/CD4+) cells and activated helper T lymphocytes (CD3+/CD4+/CD25+) on the GPC, compared to the GC. There was also an increase in the number of monocytes (CD14+), as well as, antigen presenting monocytes (CD14+/HLADR+/CD86+) when compared to the control group. There was no statistical difference between the GC and GPC in the number of B lymphocytes (CD19+) and cytotoxic T lymphocytes (CD3+/CD8+). There was no difference in dosage of cytokines of profiles Th1/Th2/Th17 between groups. **Conclusion:** Chronic periodontitis, a local infectious inflammatory disease, can cause changes in the number of circulating monocytes and helper T lymphocytes and induce its activation, but these changes do not seem to reflect on the systemic cytokine profile. **KEYWORDS:** Chronic periodontitis, PBMC, cytokines, immunophenotyping.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBA – Cytometric Beads Array

IFN - interferon

IL - interleucina

LPS - lipopolissacarídeos

MCE - matriz extracelular

MMP - metaloproteinase de matriz

OPG - osteoprotegrina

PBMC - células mononucleares de sangue periférico

PC - periodontite crônica

RANK - receptor ativador do fator nuclear κ B

RANKL - ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B

Tc – célula T citotóxica

TGF - fator transformador de crescimento

Th - célula T auxiliar

TIMP - inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz

TNF - fator de necrose tumoral

Treg – célula T reguladora

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os efeitos da periodontite.....	14
Figura 2	Alteração microbiana da homeostase óssea leva à perda óssea localizada.....	18
Figura 3	As vias celulares e moleculares que ligam resposta imune inflamatória do hospedeiro à progressão da doença periodontal.....	21
Figura 4	Trânsito de neutrófilos através do tecido periodontal.....	24
Figura 5	O <i>crossstalk</i> de citocinas e seus papéis destrutivos e de proteção na doença periodontal: uma reavaliação dos pontos de vista da defesa do hospedeiro e da destruição dos tecidos.....	27
Figura 6	Layout da placa de 96 poços para dosagem de citocinas por CBA.....	36
Figura 7	Estratégia de análise para identificação de linfócitos B.....	38
Figura 8	Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T e suas subpopulações.....	40
Figura 9	Estratégia de análise para identificação dos monócitos.....	41

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1	Níveis séricos de citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A em indivíduos saudáveis e com periodontite crônica.....	48
Figura 2	Avaliação dos monócitos CD14+ e expressão simultânea de HLA DR e CD86 em indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica.....	49
Figura 3	Avaliação dos linfócitos B CD19+, dos linfócitos T CD3+, dos linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+, dos linfócitos T auxiliares CD3+CD4+ e dos linfócitos T auxiliares ativadas CD3+CD4+CD25+ em indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica.....	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Enzimas envolvidas na degradação da matrix extracelular.....	19
Tabela 2	Principais subclasses de células imunes e suas principais ações.....	22
Tabela 3	Citocinas envolvidas na formação da resposta imune na periodontite.....	26
Quadro 1	Limite de detecção para cada citocina do BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.....	36
Quadro 2	Painéis para marcação das células mononucleares de sangue periférico.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Considerações sobre periodontite crônica.....	13
2.2	Papel dos mediadores inflamatórios na doença periodontal.....	19
3	OBJETIVO	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	MÉTODOS.....	33
4.1	Tipo de Estudo e Aspectos Éticos.....	33
4.2	População do estudo.....	33
4.3	Critérios de não inclusão.....	34
4.4	Critérios de exclusão.....	34
4.5	Coleta de dados.....	34
4.6	Exame clínico geral.....	34
4.7	Exame clínico periodontal.....	34
4.8	Coleta de amostras.....	35
4.9	Quantificação de citocinas.....	36
4.10	Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e Imunofenotipagem.....	37
4.11	Análise Estatística.....	39
5	ARTIGO: Periodontite crônica promove aumento da circulação de monócitos e linfócitos T auxiliares ativados.....	42
6	CONCLUSÃO.....	60
	REFERENCIAS.....	61
	Apêndice.....	71
	Anexos.....	72

1 INTRODUÇÃO

A PC é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes, causada por microrganismos específicos, principalmente por bactérias gram negativas e anaeróbicas como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que formam placas bacterianas e cálculos dentais (LÖE, 1993; DARVEOU, 2010). Caracteriza-se pela perda de inserção do ligamento periodontal, destruição do osso alveolar adjacente, com formação de bolsas periodontais, mobilidade excessiva e consequente perda dos dentes (LÖE, 1993; CARRANZA, 2004).

Tem sido descrito que a PC pode ter um papel etiológico e modulador em doenças sistêmicas, como as cardiovasculares e as cerebrovasculares (BECK, 2005; KHADER, 2004) artrite reumatoide (COBURN, 2015), diabetes (KUDIYIRICKAL, 2014) doenças respiratórias (ZENG, 2012), doença renal crônica (SALIMI, 2014; VILELA, 2011) e que possam provocar o nascimento de bebês prematuros (SITHOLIMELA, 2013).

Desta forma, considerando o caráter sistêmico destas doenças, com comprometimento imunológico, tem sido investigado se a periodontite crônica pode por si so induzir alterações imunológicas sistemas que justifiquem, pelo menos parcialmente, a progressão ou regressão da doença. Assim, este estudo propôs avaliar as possíveis alterações na produção das citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 no plasma de pacientes com PC, bem como alterações em monócitos, linfócitos T e B sanguíneos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre periodontite crônica

A PC é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes, causada por microrganismos específicos, principalmente por bactérias gram negativas e anaeróbicas como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que formam placas bacterianas e cálculos dentais (LÖE, 1993; DARVEOU, 2010)(Figura 1). Caracteriza-se pela perda de inserção do ligamento periodontal, destruição do osso alveolar adjacente, com

formação de bolsas periodontais, mobilidade excessiva e consequente perda dos dentes (LÖE, 1993; CARRANZA, 2004).

Tem sido descrito que a PC possa ter um papel etiológico e modulador em doenças sistêmicas, como as cardiovasculares e as cerebrovasculares (BECK, 2005; KHADER, 2006), artrite reumatoide (COBURN, 2015), diabetes (KUDIYIRICKAL, 2014) doenças respiratórias (ZENG, 2012), doença renal crônica (VILELA, 2011; SALIMI, 2014) e que possam provocar o nascimento de bebês prematuros de baixo peso (SITHOLIMELA, 2013).

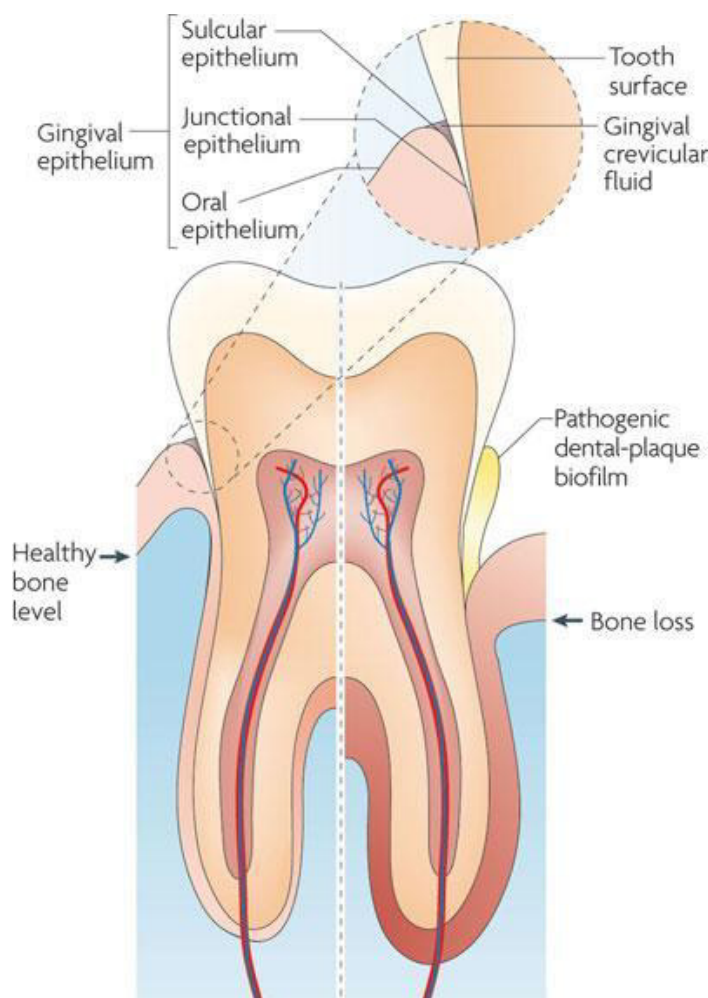


Figura 1. Os efeitos da periodontite. Tecido periodontal saudável (esquerda) contém tecido conjuntivo e osso alveolar, que sustenta a raiz do dente. Além disso, o epitélio oral abrange este tecido de suporte, e um epitélio especializado juncional liga-o à superfície do dente. O espaço entre a superfície epitelial e o dente é chamado o sulco e é preenchido com o fluido das fendas gengivais. Em casos de periodontite (direita), um biofilme/placa dental se acumula na superfície do dente e da raiz do dente e provoca a destruição do tecido conjuntivo periodontal e do osso alveolar, sendo a causa mais comum de perda de dentes em todo o mundo.(Darveou, 2010)

Há uma variação global da prevalência, gravidade e progressão da periodontite (PIHLSTROM, 2005; DYE, 2012). A prevalência da periodontite é de 5-15% dos adultos no mundo (DYE, 2012) com alguma variação geográfica; por

exemplo, na Ásia a prevalência é tão elevada quanto 15-20% (CORBET, LEUNG, 2011). Atualmente, na China, Europa e Estados Unidos, a periodontite é relatada por afetar mais de metade da população adulta. (PATEL, 2012; EKE, 2012, HU, 2011).

Aproximadamente 47% dos adultos com idade ≥ 30 anos nos Estados Unidos (cerca de 65 milhões de adultos) têm periodontite: 8,7% com periodontite leve, 30,0% moderada e 8,5% com periodontite severa. Periodontite aumenta com a idade; adultos com idade ≥ 65 anos têm periodontite a taxas de 5,9%, 53,0% e 11,2% para as formas leve, moderada e grave, respectivamente. No envelhecimento da população, a prevalência de periodontite é ainda maior. Relata-se que 70-90% das pessoas com idades entre 60 e 74 sofrem de doença periodontal (EKE, 2012).

Trabalhos baseados em estudos epidemiológicos observaram que a doença periodontal na forma de gengivite ou periodontite é altamente prevalente na população. No Brasil, a prevalência de gengivite é de aproximadamente 100% e a de periodontite também é consideravelmente alta, onde 70% da população apresenta perda de inserção e 65% profundidade de bolsa ≥ 5 mm (ARAÚJO, SUKEKAVA, 2007), sendo a PC generalizada frequentemente associada à pacientes portadores de doenças crônicas como a doença renal (SOUZA, 2005; BASTOS, 2009).

A periodontite crônica caracteriza-se por apresentar um curso de progressão de lento a moderado, porém, podem ocorrer períodos de destruição mais rápidos, possivelmente modificada por doenças sistêmicas e fatores ambientais, sendo mais prevalente em adultos, entre 30 e 65 anos (MACHTEI, 1992). Manifesta-se na sua forma moderada entre 44 a 57% dos adultos, sendo que 10% podem apresentar um quadro de periodontite severa (LÖE, 1993; CARRANZA, 2004).

A PC pode ser classificada quanto à extensão em: localizada (quando acomete menos de 30% dos sítios) ou generalizada (para mais de 30% dos sítios). Quanto à severidade de perda de inserção do ligamento periodontal, divide-se em: leve (1 a 2 mm), moderada (3 a 4 mm) ou severa (mais de 5 mm) (ARMITAGE, 2000).

A colonização do ambiente subgengival com um biofilme microbiano enriquecida em bactérias gram-negativas, pertencente ao complexo vermelho de patógenos, é o gatilho necessário para a iniciação e perpetuação da resposta inflamatória da PC (DARVEOU, 2010). Concomitantemente à inversão da microbiota oral e formação do biofilme, ocorre uma destruição tecidual envolvendo metabólitos

bacterianos (enzimas, endotoxinas, e outros componentes antigênicos)(DELIMA, VAN DYKE, 2003).

A formação do biofilme é necessária para o desenvolvimento da lesão periodontal, mas outros fatores desempenham um papel na patogenia da periodontite (KINANE, BOUCHARD, 2008). Pesquisas realizadas nas últimas décadas concluíram que o risco individual para periodontite é influenciada por fatores microbiológicos, genéticos e ambientais que contribuem para um perfil de suscetibilidade (KORNMAN, 2008).

Tem sido sugerido que os fatores genéticos são importantes determinantes da susceptibilidade a periodontite, pois podem determinar e modificar as respostas do hospedeiro ao desafio microbiano. Respostas inunes impróprias ou exageradas contra o estímulo bacteriano podem causar variações na susceptibilidade à periodontite. Fatores genéticos envolvidos nas respostas do hospedeiro podem determinar a severidade da doença em casos de PC e agressiva. Embora seja aceito que a placa dentária microbiana é o principal fator causador da periodontite, há evidências de que fatores genéticos desempenham um papel crucial na suscetibilidade, especialmente na periodontite agressiva (TÜRKOGLU, 2011).

Inicialmente ocorre um desequilíbrio entre bactérias e defesas do hospedeiro que leva a alterações vasculares e à formação de exsudato inflamatório, fase que se manifesta clinicamente com alteração da cor da gengiva, hemorragia e edema, sendo essa situação reversível se a causa for eliminada. Esta situação definida como gengivite, promove a fragilização das estruturas e maior acesso de bactérias e seus subprodutos a áreas subjacentes, podendo resultar na migração do epitélio, consequente formação de bolsas periodontais e perda óssea. Este processo culmina com a destruição dos componentes do periodonto, ou seja, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar (CARRANZA, 2004; ALMEIDA, 2006).

O reconhecimento de que o hospedeiro contribui para a destruição tecidual e reabsorção do osso alveolar, que são característicos da doença periodontal, foi um grande avanço conceitual; uma consequência do aumento nas concentrações de mediadores inflamatórios é a reabsorção de osso alveolar, o que é a principal característica da doença periodontal (PAGE, 1997).

A integridade dos tecidos ósseos depende da manutenção de um equilíbrio delicado entre a reabsorção do osso por osteoclastos e osteoblastos por deposição óssea. Os osteoclastos são originários a partir de precursores hematopoiéticas da

linhagem dos monócitos e macrófagos que residem no interior da medula óssea e, guiados por quimiocinas, emigram da circulação periférica para o osso. A ativação dos osteoclastos é realizada apenas com a presença do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) (SILVA, 2007).

O principal mecanismo que regula as atividades normais de reabsorção e de deposição óssea que ocorrem durante a remodelação óssea é a proporção de RANKL (também conhecido como TNFSF11) para OPG (osteoprotegrina, também conhecido como TNFRSF11B) (COCHRAN, 2008; NAGASAWA, 2007) e este mecanismo, provavelmente, também contribui para a perda óssea observada na periodontite (Figura 2).

A RANKL está presente em vários tipos de células e se liga a RANK (receptor ativador do fator nuclear κ B, também conhecido como TNFRSF11A) sobre os precursores de osteoclastos, promovendo a diferenciação em células semelhantes a macrófagos ativos que segregam enzimas que degradam o osso. OPG é um receptor solúvel de RANKL que impede a interação RANK-RANKL. Em altas concentrações de OPG, a RANKL não se liga aos precursores de osteoclastos e a perda de massa óssea é evitada (NAGASAWA, 2007).

Os níveis OPG são regulados através da transformação do fator de crescimento relacionado com β proteínas morfogênicas do osso de crescimento, enquanto que a síntese de RANKL é induzida por citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF. Portanto, o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no tecido periodontal saudável pode afetar diretamente a perda de osso, aumentando a proporção de RANKL/OPG (DARVEOU, 2010).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo denso, localizado entre o cimento e osso alveolar, suportando o dente. Este ligamento é composto principalmente por fibras de colágeno e fibras do sistema elástico. A destruição do ligamento periodontal é iniciada pela degradação da matriz extracelular (MCE). As enzimas envolvidas na degradação da MCE compreendem as metaloproteinases de matriz (MMPs) e proteases de serina (elastase de neutrófilos, incluindo e catepsina G) (TSUJI, 2009).

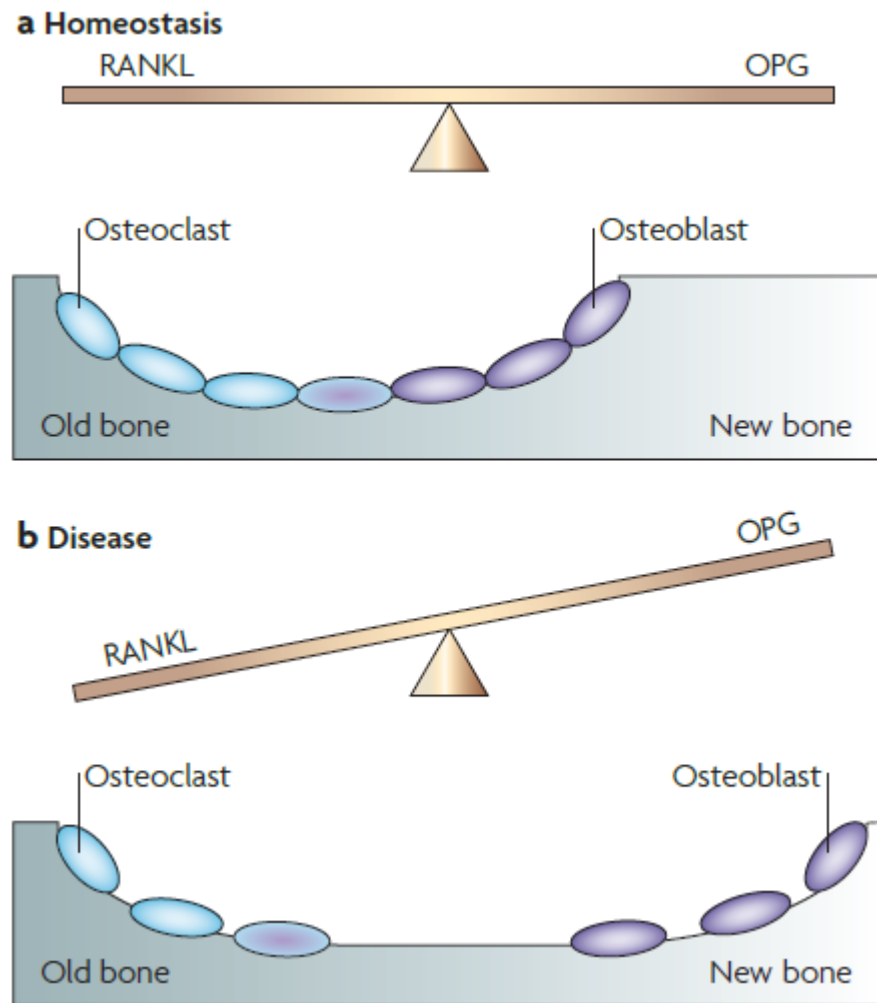


Figura 2. Alteração microbiana da homeostase óssea leva à perda óssea localizada. A - osso alveolar está constantemente sendo remodelada, mas a quantidade de formação de osso - desencadeada por um excesso de OPG (osteoprotegrina, também conhecido como TNFRSF11B) - é normalmente igual ao valor da perda de massa óssea - desencadeada por um excesso de RANKL (ligante do receptor-ativador de fator nuclear- κ B, também conhecido como TNFSF11) - resultando na homeostase óssea. B - comunidades microbianas localizadas, como os que formam o biofilme, podem alterar a relação RANKL/OPG, resultando em um aumento líquido de perda óssea (DARVEOU, 2010).

As MMPs são uma família de endopeptidases, dependentes do zinco, capazes de degradar todos os componentes da MCE, incluindo o colágeno e os proteoglicanos. Sugere-se que as MMPs desempenham um papel importante em doenças inflamatórias do periodontal, tecido pulpar e periapical, bem como a mineralização da dentina (BUZOGLU, 2009). Sendo divididas em quatro subfamílias: collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMPs tipo membrana, de acordo com os seus substratos e estruturas, sendo as collagenases e gelatinases amplamente mais investigadas em lesões de periodontite (Tabela 1).

Tabela 1. Enzimas envolvidas na degradação da matrix extracelular.

		Expressão celular		Função
Metaloproteínas de Matriz (MMPs)	Colagenases	Colagenase Intersticial (MMP-1)	Macrófagos	Degrada matriz extracelular não mineralizada; Estimula a osteoclastogênese.
		Colagenase de neutrófilos (MMP-8)	Leucócitos polimorfonucleares, macrófagos	Degrada gelatina e colágeno tipo I, II, III, IV e XI.
		Colagenase-3 (MMP-13)	Fibroblastos, células epiteliais, plasmócitos	Degrada colágeno tipo I, II, III, IV, IX, X e XIV, gelatina, tenascina-C, fibronectina e proteínas do núcleo de proteoglicanos.
	Gelatinases	Gelatinase A (MMP-2)	Células epiteliais, fibroblastos	Degrada gelatina, fibronectina, elastina, laminina, colágeno I, III, IV, V, VII, X e XI.
		Gelatinase B (MMP-9)	Leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, células T, mastócitos, odontoblastos	Degrada gelatina, elastina, colágeno tipo IV, V, VII, X, XI e XI.
Proteases de Serina	Elastase neutrófilo (NE)	Leucócitos polimorfonucleares	Degrada elastina, colágeno, fibrinogênio, hemoglobina, proteoglicanos.	
	Catepsina G	Leucócitos polimorfonucleares, monócitos, mastócitos.	Degrada colágeno tipo III e proteoglicanos.	

(Adaptado de GRAUNAITE, 2011)

As MMPs são geralmente encontradas em equilíbrio com um grupo de proteínas endógenas denominadas inibidores teciduais das metaloproteinasas (TIMPs), para manter a remodelação da matriz altamente regulada (HANNAS, 2007) e são regularmente expressas em tecidos periodontais saudáveis, onde supostamente controlam o ambiente extracelular (GONÇALVES, 2008). No entanto, relações desequilibradas da MMPs/ TIMPs foram descritas em tecidos periodontais doentes, e são associadas com a destruição de tecidos moles e mineralizados relacionada à doença periodontal (GARLET, 2004; VERSTAPPEN e VON DEN HOFF, 2006; GONÇALVES, 2008).

Tem sido descrito que a PC possa ter um papel etiológico e modulador em doenças sistêmicas, como as cardiovasculares e as cerebrovasculares (BECK, 2005; KHADER, 2006), artrite reumatoide (COBURN, 2015), diabetes (KUDIYIRICKAL, 2014) doenças respiratórias (ZENG, 2012), doença renal crônica (VILELA, 2011; SALIMI, 2014) e que possam provocar o nascimento de bebês prematuros de baixo peso (SITHOLIMELA, 2013).

2.2 Papel dos mediadores inflamatórios na doença periodontal

A hipótese da associação entre algumas patologias sistêmicas e patologias da cavidade oral é antiga, sendo encontrada na literatura há vários anos. Com efeito,

egípcios, hebraicos, gregos e romanos já acentuavam a importância da saúde oral no bem-estar geral dos indivíduos. O conceito de infecção focal, com origem em 1900, estimulou a investigação no sentido de aprofundar o conhecimento sobre o papel das afecções da cavidade bucal, em especial da doença periodontal, na saúde geral dos indivíduos (ALMEIDA, 2006).

A Organização Mundial de Saúde publicou documento destacando que quando fatores de risco para doenças crônicas são minimizados e os fatores de prevenção à saúde são maximizados, as pessoas vivem mais e melhor. Este documento também ressaltou a implicação das doenças orais na saúde geral e na qualidade de vida, principalmente de pessoas idosas; enfatizando a importância da promoção da saúde bucal (PETERSEN, OGAWA, 2005).

Pacientes portadores de PC não tratada apresentam uma área de 15 a 20 cm² de lesões periodontais. Este epitélio ulcerado serve de porta de entrada para bactérias gram negativas anaeróbias e levam a disseminação de endotoxinas e LPS, causando bacteremia e a dispersão sistêmica de antígenos bacterianos (LOOS, 2000).

Uma série de estudos tem demonstrado que a resposta imune do hospedeiro inflamatório persistente contra os patógenos com o envolvimento de leucócitos e células plasmáticas, começa com a inflamação gengival e com a criação de um sulco aprofundado entre gengivas e dentes (bolsa periodontal), seguida da destruição do osso e dos tecidos conjuntivos, incluindo colágenos, proteoglicanos e outros componentes da MCE e a sua substituição por um infiltrado denso de células inflamatórias (GRAVES, 2008; LIU, 2010)(Figura 3).

As principais subclasses de células imunitárias que desempenham um papel importante na doença periodontal, as principais ações, e exemplos de importantes mediadores libertados estão resumidos na Tabela 2.

No entanto, o perfil "protetor/destrutivo" da resposta imune é normalmente considerado em uma estrutura relacionada com a destruição tecidual e a progressão da doença (KRAUSS, 2010; LIU, 2010). No entanto, é importante lembrar que as doenças periodontais são condições inflamatórias infecciosas (KRAUSS, 2010), e estudos recentes têm demonstrado que os padrões semelhantes de resposta imune (ou seja, que envolvem citocinas semelhantes), consideradas prejudiciais no contexto da destruição de tecido podem assumir papéis importantes no controle da infecção periodontal (GARLET, 2007)

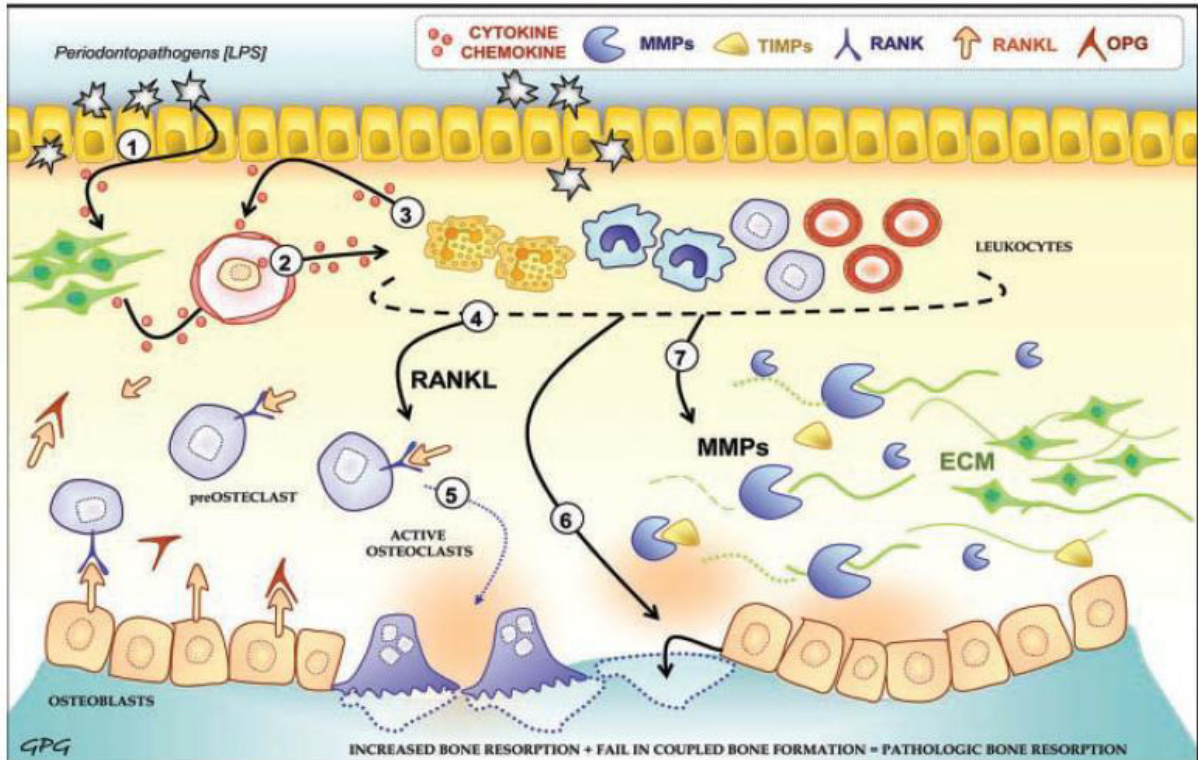


Figura 3. As vias celulares e moleculares que ligam resposta imune inflamatória do hospedeiro à progressão da doença periodontal. O reconhecimento de LPS de patógenos periodontais por células residentes no ambiente periodontal (1) leva aos eventos inflamatórios iniciais, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atuam no recrutamento seletivo (2) de leucócitos ao espaço periodontal. Uma vez que, no tecido, a ativação de leucócitos conduz à produção de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que contribui para a geração de um circuito de amplificação de migração de leucócitos (3). Além de citocinas, subconjuntos de leucócitos também produzem quantidades substanciais de RANKL (4), ou induzem a sua produção pelas células residentes, e os níveis de RANKL aumentam em resultado de um desequilíbrio nos níveis de OPG (5), o que resulta no aumento da reabsorção óssea da característica lesões periodontais ativas. Os mediadores inflamatórios produzidos por leucócitos inflamatórios também interferem na formação óssea de acoplamento (6), o que seria esperado para contrariar o aumento da atividade dos osteoclastos. Finalmente, a reação inflamatória crônica local também resulta num desequilíbrio na proporção significativa de MMP / TIMP (7), o que explica a destruição de matriz extracelular dos tecidos periodontais moles e mineralizados. (GARLET, 2010).

As bactérias gram negativas anaeróbias produzem uma quantidade suficiente de LPS que ativa o sistema do complemento pela via alternativa que conduz à geração de peptídeos quimiotáticos (MÁRTON, 2000). A expressão coordenada única de E-selectina, as moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e IL-8 facilitam a passagem dos neutrófilos do tecido gengival altamente vascularizado para o crevículo gengival, onde formam uma parede entre o tecido do hospedeiro e o biofilme (TONETTI, 1998) (Figura 4).

Tabela 2. Principais subclasses de células imunes e suas principais ações.

Subclasses das células imunológicas	Ações Principais	Principais mediadores liberados
Células apresentadoras de antígeno (APC)	Captação e processamento de antígenos e apresentá-los aos linfócitos T	Dependendo do subtipo de APC (ver abaixo)
Linfócitos B	Formação de anticorpos específicos para os antígenos; atuar como APCs.	As células B totalmente ativadas (plasmócitos) secretam anticorpos
DCs	Função como APCs profissionais, reconhecimento inato de micróbios por TLR, regulam outras células imunitárias, incluindo linfócitos T e B	mDCs produzem TNF- α e as citocinas das famílias IL-1 e IL-12; pDCs produz interferons do tipo I
LCs	mDCs de mucosa e pele	Similar às outras mDCs
Macrófagos (junto com os monócitos, os macrófagos são chamados de MNPs)	Desenvolvem-se a partir de monócitos; funcionam como fagócitos profissionais, e APCs; liberam compostos tóxicos que destroem micróbios e células infectadas; regulam as células imunitárias	Citocinas: IFN- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, IL-18, fator de inibição de migração, TGF- β e TNF- α ; Quimiocinas: proteínas inflamatórias de macrófagos CCL-2/CCL-3, CCL-4, 5-CCL, CCL-22, IL-8, reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio; eicosanoides; proteases
Mastócitos	Reações alérgicas tipo anafiláticas; defesa antimicrobiana não específica; cicatrização de feridas; imunorregulação	Histamina, serotonina; eicosanoides; citocinas: IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, SCF; quimiocinas: CCL-2, CCL-5, eotaxinas
Mos	Fagocitose, apresentação de antígeno, dar origem a mDCs e macrófagos	Similar às mDCs e aos macrófagos
Células NK	Linfócitos citotóxicos da imunidade inata, contribuem para a auto-tolerância e memória imunológica	Citotoxinas: perforina, quimiocinas CCL3, CCL4, e CCL5; citoquinas IFN- γ , GM-CSF e TNF- α
Células NKT	As células T CD1d restritas; reconhecer lipídios e glicolipídios; rápida liberação de mediadores solúveis de regulação	Citotoxinas como as das células NK; IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α
PMNs	Três tipos de PMNs (basófilos, eosinófilos e neutrófilos); neutrófilos desempenham um papel importante: fornecem primeira linha de defesa contra patógenos por fagocitose; atrair e estimular novos PMNs, MOs e macrófagos; destruir componentes do tecido periapicais	Reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio; proteínas com atividades antimicrobianas: hidrolases ácidas, defensinas, lactoferrina, lisozima; proteases destruidoras de micróbios e dos tecidos do hospedeiro; eicosanoides; citocinas e quimiocinas: IL-1 β , TNF- α , IL-8, e CXCL-10
Linfócitos T	Participar em reações imunes mediadas por células como células efetoras e reguladoras	Depende do subtipo de linfócito T
Linfócitos T citotóxicos (células T CD8 positivas)	Células MHC de classe I restritas, destruição de células infectadas	Citotoxinas: células NK; citocinas: IFN- γ , IL-2, GM-CSF; TNF- α ; quimiocinas: CCL-3, CCL-4, CCL-5
Linfócitos T de memória (células CD45RO positivas)	Rápida expansão de células T efetoras sobre re-exposição de antígeno	IFN- γ , IL-4, IL-17
Linfócitos T auxiliares (células T CD4 positivas)	Células com restrição de MHC classe II; promover a maturação de células B, ativação de células T e macrófagos; diferenciar em vários subtipos, que produzem citocinas estimuladoras e inibidoras	Células Th ativadas: IL-2; subconjunto de células Th ativadas: IL-17; Citocinas Th1: IFN- γ , TGF- β ; Citocinas Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13; Th17 citocinas: IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α
Linfócitos T reguladores (Treg)(células CD4 ⁺ /CD25 ^{hi} /Foxp3 ⁺)	Suprimir a ativação do sistema imunitário através da secreção de citocinas reguladoras e de contatos célula a célula	TGF- β e IL-10

APCs=células apresentadoras de antígeno; DCs=células dendríticas; GM-CSF= fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos; IFN- β =interferon beta; IFN- γ =interferon gama; IL=interleucina; LCs=células Langerhans; MDCs=células dendríticas mielóides; MNPs=fagócitos mononucleares; Mos=monócitos; NK, assassino natural; NKT=assassino natural T; pDCs=células dendríticas plasmocitoides; PMN=leucócito polimorfonuclear; TLR=receptor Toll-like; TNF- α =factor de necrose tumoral alfa.(Adaptado de MÁRTON, 2014).

A resposta do tecido é geralmente limitada ao ligamento periodontal apical e esponjoso vizinho. Inicia-se com a resposta neurovascular típico de inflamação, o que resulta em hiperemia, congestão vascular e o edema do ligamento periodontal e extravasamento de neutrófilos (NAIR, 2004).

A arquitetura dos tecidos do epitélio de junção auxilia a passagem destas e de outras células imunes. Calcula-se que cerca de 30.000 neutrófilos transitam através do tecido periodontal por minuto (TONETTI, 1998; BOSSHARDT, 2005). Uma vez que o fator patogênico invade a área periodontal, duas linhas de defesa das células fagocíticas são formadas: uma área interior, mais perto do ápice, em que os neutrófilos predominam; e em volta uma área onde os macrófagos são vistos (METZGER, 2000).

Quando presente no local da inflamação, os macrófagos têm um papel central na regulação da destruição do tecido conjuntivo e reparação; regulação do início da resposta da imunidade inata inespecífica e os resultados da imunidade adquirida antígeno-específica (METZGER, 2000). Em resposta ao encontro bacteriano ou sinal de uma ativação de outra natureza, produzem uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas que são as citocinas IL-1, TNF- α (STASHENKO, 2007), IL-8 (MÁRTON, 2007), IL-6, IL-12 (STASHENKO, 2007), IL-10 (GAZIVODA, 2009), fatores de crescimento, IFN- α , IFN- β (NAIR, 2004), os metabolitos de ácido araquidônico, os radicais livres, metaloproteinases (MÁRTON, 2000) e β -endorfina (STASHENKO, 2007).

A perpetuação da resposta do hospedeiro devido ao desafio bacteriano persistente interrompe os mecanismos homeostáticos e resulta na liberação de mediadores como citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α), proteases (metaloproteinases), e prostanóides (prostaglandina E₂) que podem promover destruição da MCE no tecido gengival e estimular a reabsorção óssea (PAGE, 1998).

TNF- α atua no processo de migração de células em vários níveis, induzindo a produção de moléculas de adesão e de quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas envolvidas na migração de células para os locais infectados e inflamados (DINARELLO, 2000; WAJANT, 2003; KINDLE, 2006). TNF- α está presente em níveis elevados no fluido crevicular gengival (FCG) e nos tecidos periodontais doentes, onde é positivamente correlacionada com a expressão de MMP e RANKL

(GRAVES, 2003; GARLET, 2004; GRAVES, 2008).

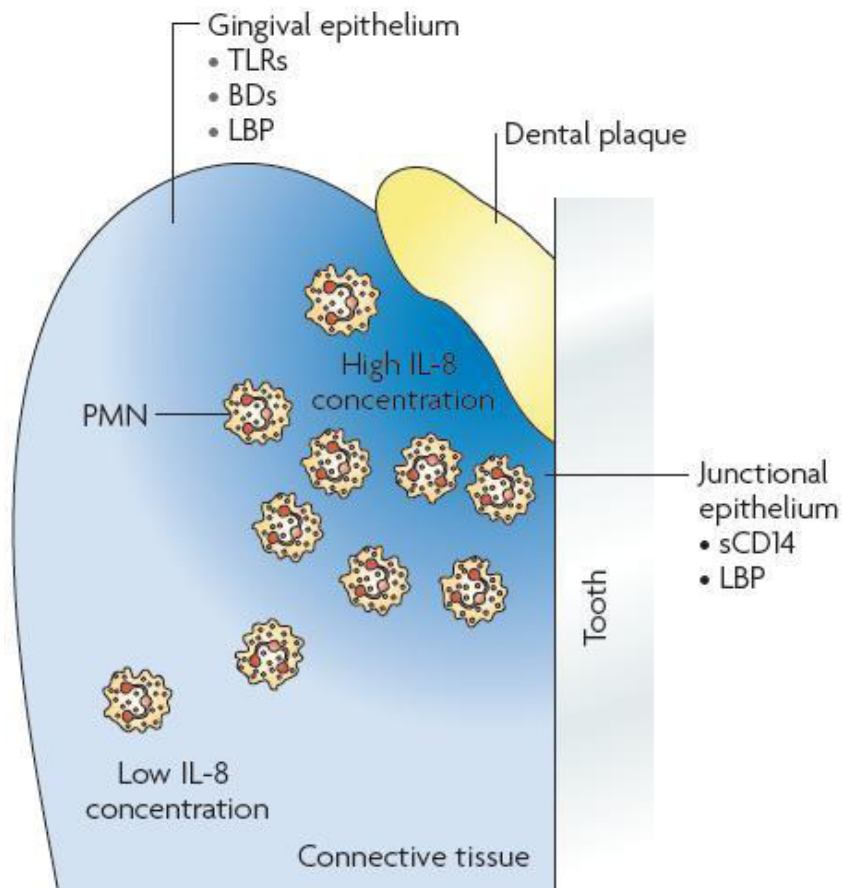


Figura 4. Trânsito de neutrófilos através do tecido periodontal. O estado da resposta imune inata dos tecidos periodontais saudáveis resulta na expressão coordenada de mediadores seletivos da defesa inata, tais como a interleucina-8 (IL-8), facilitando o trânsito de neutrófilos através do tecido. Além disso, o epitélio gengival expressa vários mediadores de defesa inata do hospedeiro que contribuem para o afastamento e morte de bactérias da placa dental, incluindo os receptores Toll-like (TLRs) (que reconhecem patógenos e bactérias comensais), β -defensinas e proteínas ligadoras de lipopolissacarídeos (LPS). Além disso, o epitélio juncional produz CD14 solúvel (sCD14) (outro mediador de eliminação bacteriana) e LBP. Os mecanismos de defesa inatos são acoplados com sistemas de sinalização regenerativos e biomecânicos, resultando na homeostase do tecido. O gradiente de IL-8 está representado a azul. PMN, neutrófilos. (DARVEOU, 2010).

Dados a partir de estudos em seres humanos e análise de dados de doença periodontal experimental em ratos e primatas demonstraram claramente que o TNF- α desempenha um papel central na resposta inflamatória, a reabsorção de osso alveolar e perda de inserção de tecido conjuntivo (GRAVES, 2003; GRAVES, 2008). Por conseguinte, o modelo experimental de periodontite em camundongos com TNF- α 55 receptor deficiente (TNFp55KO) demonstrou uma diminuição significativa na expressão de MMP e RANKL, que foi associada com uma redução significativa na perda de osso alveolar (GARLET, 2007).

Além de apresentarem um efeito direto sobre a patogênese da doença

periodontal, TNF- α regula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias clássicas da imunidade inata, tais como IL-1 β e IL-6 (DINARELLO, 2000; WAJANT, 2003; GARLET, 2007; GRAVES, 2008; MUSACCHIO, 2009). Curiosamente, a IL-1 β e a IL-6 foram também caracteristicamente associadas a processos inflamatórios migração celular e osteoclastogênese (GRAVES, 2008; FONSECA, 2009).

Pacientes com periodontite crônica têm uma produção aumentada de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6)(GORSKA, 2003), e que podem induzir a elevação plasmática do nível de proteínas de fase aguda, como por exemplo, a PCR (CRAIG, 2003), promovendo uma resposta inflamatória sistêmica moderada (LOOS, 2000). Tal fato demonstra que a periodontite crônica é um protótipo de infecção local de baixo grau associado com uma resposta inflamatória sistêmica moderada (GEMMELL, 1997; MATTILA, 2002; D'AIUTO, 2005; VILELA, 2011).

Além da resposta imune inata, as bactérias periodontais levam a mobilização de mecanismos da imunidade adaptativa. A resposta adaptativa do hospedeiro começa com o reconhecimento dos patógenos pelas células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas (CUTLER, 2004). Após a ativação, as células dendríticas maduras e macrófagos expressam moléculas co-estimuladoras e produzem padrões distintos de citocinas que irão determinar a polarização e ativação de linfócitos (CUTLER, 2004) (Tabela 3).

A imunidade adaptativa, também conhecida como imunidade específica, possui a capacidade de memorizar e responder de forma mais vigorosa a repetidas exposições ao mesmo antígeno. Os principais componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B (ØRSTAVIK, 2008).

Os linfócitos T maduros expressão na sua superfície celular moléculas correceptoras que os dividem em duas populações majoritárias, as célula T CD4+ e as CD8+ (MÁRTON, KISS, 2000). As células CD4+, que atuam com os linfócitos B, são conhecidas como células T auxiliares (Th). As células CD8+ têm efeitos tóxicos diretos e supressivos sobre outras células e são chamadas de T citotóxicas (Tcs) (NAIR, 2004).

As células T CD4+ diferenciam-se ainda em mais dois tipos, denominados células Th1 e Th2, de acordo com as citocinas que estas células produzem. Ambos os tipos de respostas efectoras são regulados por uma família heterogênea de células, que é conhecida como células T reguladoras (Treg). Eles formam um

subconjunto de 5 - 10% das células T CD4+. Recentemente, um novo subconjunto de células Th que produzem predominantemente IL-17 foi descoberta e nomeada como Th17 (FUKADA, 2009).

Tabela 3. Citocinas envolvidas na formação da resposta imune na periodontite.

Citocinas	Origem	Funções primárias
Interleucina-1 (IL-1)	MØ, PMN, Oc, Células epiteliais	Atrai quimiotaticamente e ativa PMN; Estimula a produção de prostaglandinas, enzimas proteolíticas e citocinas IL-6, IL-8; Estimula a reabsorção óssea e inibe a formação óssea
Interleucina-8 (IL-8)	MØ, PMN, Th1	Atrai quimiotaticamente e ativa os PMN; Estimula o recrutamento e a atividade dos osteoclastos
Interleucina-6 (IL-6)	MØ, PMN, Th2, linfócitos B, células endoteliais	Ativa PMN, células T; Estimula a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos; Induz a reabsorção óssea; Diminui a produção de IL-1
Fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α)	MØ, Th1, PMN	Ativa os linfócitos e MØ; Estimula a reabsorção óssea
Proteína quimiotática de granulócito – 2 (GCP-2)	Células endoteliais	Atrai quimiotaticamente os PMNs
Interleucina -17 (IL-17)	Th17	Ativa a secreção de IL-1, IL-6, TNF α , GCP-2 e IL-8; Estimula a reabsorção óssea
Fator de estimulação de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF)	MØ, linfócitos T, células endoteliais, PMN	Ativa funcionalmente os MØ e os PMNs
Proteína quimiotática de monócito – 3 (MCP-3)	Células endoteliais, linfócitos, fibroblastos, plasmócitos	Atrai quimiotaticamente os MØ
Proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1)	Th1	Atrai quimiotaticamente e ativa os MØ e os Oc.
Fatores transformadores de crescimento tipo β (TGF- β)	MØ, linfócitos, fibroblastos, Ob, Oc	Suprime a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B; Diminui a produção de IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ ; Bloqueia a produção de óxido nítrico pelo MØ; Inibe a reabsorção óssea; Inibe a formação Th17 e promove a formação de Treg
Interferon- γ (IFN- γ)	Th1	Ativa os MØ; Induz a produção de IL-1, NO e O.
Interleucina-12 (IL-12)	MØ, células dendríticas	Estimula a produção de IL-1 e IFN- γ ; Estimula a diferenciação de Th1; Suprime diferenciação Th2.
Interleucina-10 (IL-10)	MØ, células dendríticas	Suprime a produção de IL-1 e IFN- γ
Interleucina-4 (IL-4)	Th2	Inibe a reabsorção óssea; Inibe a formação de Th17, Suprime a produção de IL-1

MØ = macrófagos; PMN = leucócitos polimorfonucleares; Th = linfócitos T auxiliares; Ob = osteoblastos; Oc = osteoclastos; NO = óxido nítrico. (Adaptado de GRAUNAITE, 2011)

Marcadores característicos dos subconjuntos de linfócitos T CD4+ Th1, Th2, Th17 e Treg têm sido descritos em tecidos periodontais doentes, e estudos recentes demonstraram que bactérias orais comensais e patogênicas são capazes de desencadear a produção de mediadores característicos de todas as respostas de células T polarizadas (GEMMELL, 2002; KOPITAR, 2006; CARDOSO, 2008, 2009; GAFFEN, 2008)(Figura 5).

Estudos em roedores demonstraram que o IFN- γ está envolvido no desenvolvimento da resposta inflamatória e da reabsorção óssea em resposta a *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* (TENG, 2005). Entretanto, um papel controverso para o IFN- γ em lesões ósseas líticas foi descrito, uma vez que a associação com o aumento da perda de osso descrita por estudos *in vivo* (em humanos e experimentais) não foi confirmada por experimentos *in vitro*, em que o IFN- γ inibe sistematicamente a osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2005; JI, 2009).

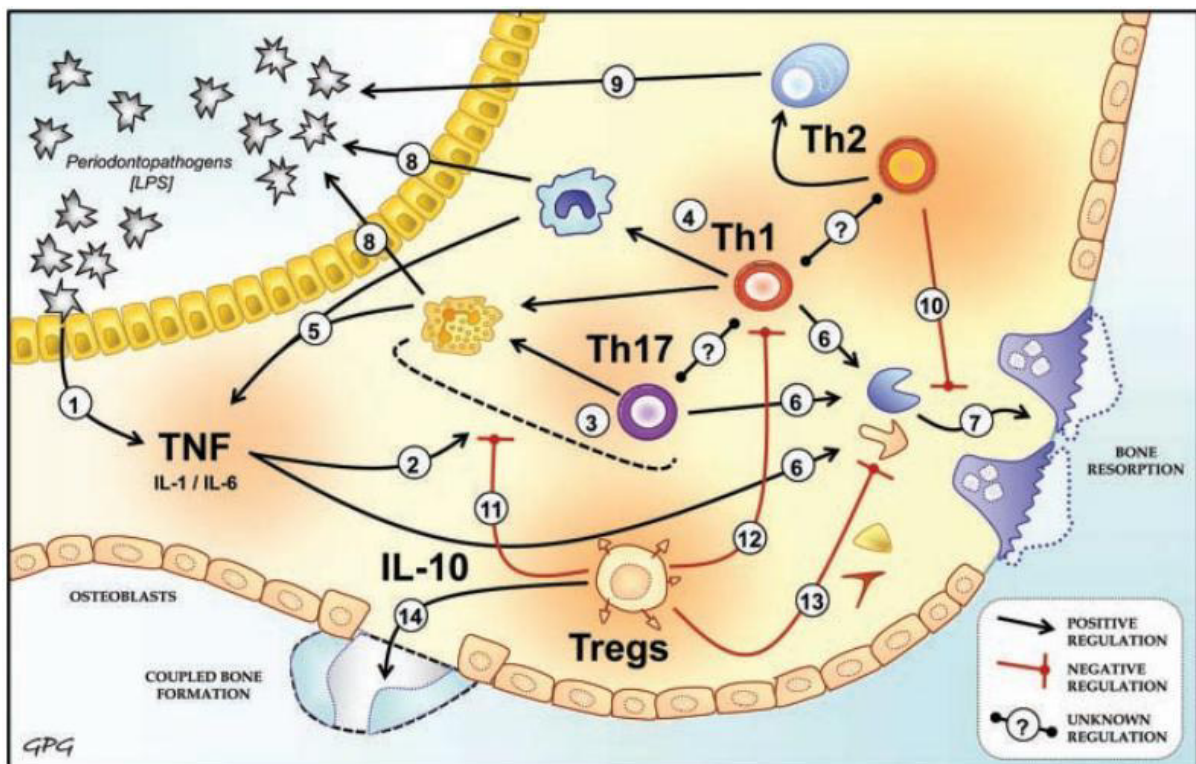


Figura 5. O *crosstalk* de citocinas e seus papéis destrutivos e de proteção na doença periodontal: uma reavaliação dos pontos de vista da defesa do hospedeiro e da destruição dos tecidos. O reconhecimento do LPS de patógenos periodontais pelas células residentes no ambiente periodontal (1) leva aos eventos iniciais inflamatórios, que incluem a produção da citocina clássica pró-inflamatória TNF- α . TNF- α é caracteristicamente envolvida na amplificação de reações imunes inflamatórias, devido ao seu papel na quimiotaxia leucocitária e ativação de fagócitos (2). A subsequente migração de células T em tecidos periodontais inclui subconjuntos Th17 (3) e Th1 (4), que atuam na amplificação da resposta inata através da ativação de neutrófilos e macrófagos, e pela geração de um ciclo de amplificação que sustenta a reação inflamatória crônica (5). Em conjunto, as citocinas da imunidade inata e os produtos das células Th17 e Th1 (6) podem promover o aumento dos níveis de RANKL e MMPs nos tecidos periodontais e, conseqüentemente, contribuir para a evolução da doença (7). Por outro lado, estes mediadores apresentam uma dupla função, uma vez que eles são também mediadores importantes no controle da infecção periodontal, mediadas por fagócitos e seus produtos (8). A produção de anticorpos pelas células B/Th2 também contribui para o controle da infecção periodontal (9), e as citocinas Th2 supostamente contrabalança os eventos destrutivos mediados por células Th1 e Th17 (10). Citocinas, Treg-associadas, tais como a IL-10 são descritas em atenuar a resposta do hospedeiro, que atua sobre citocinas inflamatórias (11) e (12) do tipo Th1, e também induzir diretamente a expressão de OPG e TIMPs (13), e para contribuir para a formação do osso no ambiente periodontal (14) (GARLET, 2010).

O efeito pró-inflamatório de IFN- γ demonstrada *in vivo*, resulta no aumento da regulação dos níveis de TNF- α e IL-1 β , e conseqüentemente, RANKL, parece sobrepor o efeito antiosteoclastogênico direto descrito *in vitro* (GAO, 2007). Além disso, o IFN- γ também estimula a formação de osteoclastos e a perda de osso *in vivo*, através da ativação de células T por apresentação de antígenos ou por meio da quimio-atração de células RANKL + (GAO, 2007; REPEKE, 2010)

Além de células Th1, estudos apontam para Linfócitos Th17 como um subconjunto de células com efeitos osteoclastogênicos (YAGO, 2009). Células Th17 são caracterizadas como subconjunto de células T CD4+ que secretam a IL-17, que tem sido associada a várias condições autoimunes e inflamatórias (DONG, 2008; SALLUSTO, 2009).

Estudos relatam que as células T estão envolvidas na destruição do osso por meio da produção de IL-17, que por sua vez, é descrita como um indutor da produção de RANKL (SATO, 2006). Assim como, um indutor direto menos potente de MMP que as citocinas clássicas da imunidade inata (BEKLEN, 2007).

As células Th17 possuem a capacidade de produzir IL-6 e regular positivamente IL-1 β e a produção de TNF- α podendo gerar um ciclo de amplificação inflamação, com um conseqüente aumento da expressão de MMP e RANKL (BEKLEN, 2007). Estudos demonstraram a presença de células Th17 em doenças periodontais crônicas (CARDOSO, 2009.); e também a presença das citocinas Th17 em lesões periodontais (TAKAHASHI, 2005; OHYAMA, 2009).

Portanto, as células Th17 atuam no processo inflamatório da doença periodontal através da ativação de células adjacentes para produzir mediadores inflamatórios, gerando, assim, um circuito positivo para a amplificação da reação inflamatória que conduz a exacerbação da lesão. Porém, os estudos experimentais em roedores demonstraram que camundongos deficientes em IL-17 podem apresentar um aumento ou diminuição da lesão óssea em resposta ao desafio patogênico periodontal (YU, 2007; OSEKO, 2009).

No entanto, devemos considerar que os modelos experimentais periodontite podem não refletir perfeitamente a natureza crônica da doença humana, e que a perda óssea alveolar em camundongos idosos está associada a um aumento da expressão de IL-17A (LIANG, 2010). Portanto, é possível sugerir que o processo de envelhecimento, em paralelo com o desenvolvimento de doenças crônicas, pode

mudar um possível papel protetor da IL-17 em um papel destrutivo.

As células Th2, que possuem a IL-4 como principal citocina do seu padrão de resposta atuando como um fator de estimulação de células B (SALLUSTO, 2009), podem ser mais uma possibilidade no perfil destrutivo das células T na doença periodontal (GEMMELL e SEYMOUR, 2004). Em adição à IL-4, a IL-6, também pode contribuir para a diferenciação de células B e produção de anticorpos (CRONSTEIN, 2007).

Estudos demonstraram que os linfócitos B produzem RANKL em resposta à estimulação do patógeno periodontal (HAN, 2009), e também que a maioria das células B no periodonto são RANKL+ (KAWAI, 2006). Foi demonstrada a eliminação de células B para prevenir a perda óssea em ratos após a infecção por *P. gingivalis* bucal (BAKER, 2009), enquanto que as células B parecem contribuir para a perda de osso alveolar, não são essenciais, uma vez que as células T, induzidas por LPS, são capazes de promover a reabsorção óssea, na ausência de células B (YAMAGUCHI, 2008).

Entretanto, a IL-4 possui propriedades supressoras e anti-inflamatórias mediadas pela sua capacidade de inibir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e IFN- γ , consequentemente a supressão da polarização de células Th1 (APPAY, 2008; BLUESTONE, 2009). Além disso, a IL-4 também foi capaz de inibir a produção de MMPs e de RANKL e, concomitantemente, induzir o aumento da regulação dos respectivos inibidores, TIMPs e OPG (IHN, 2002; SAIDENBERG-KERMANAC'H, 2004), reforçando o seu potencial papel protetor na patogênese (GIANNOPOULOU, 2003).

Estudos mostraram que a transferência adotiva de células com um fenótipo de Th2 para ratos *nude* atenuou a gravidade da doença periodontal (EASTCOTT, 1994), e camundongos com resposta Th2 resultou em lesões mínimas após desafio *P. gingivalis* (STASHENKO, 2007).

Ao contrário da via destrutiva que envolve principalmente as citocinas pró-inflamatórias, as vias reguladoras mediadas por citocinas anti-inflamatórias podem controlar ou atenuar o desenvolvimento da doença periodontal. A IL-10, uma citocina anti-inflamatória (PESTKA, 2004), é largamente expressa em tecidos inflamados periodontais, em que se pensa estar associada com a gravidade inferior da doença (GARLET, 2004, 2006).

Um estudo com ratos *knockout* IL-10 é altamente suscetível à perda de osso

alveolar induzida por *P. gingivalis* (SASAKI, 2004). Os estudos têm sugerido que a IL-10 pode atuar de várias maneiras para conter gravidade da periodontite. O controle de sinalização inflamatória mediada por IL-10 podem incluir a inibição da transcrição de RNAm do mediador inflamatório após TLR ou da sinalização via citocina (YOSHIMURA, 2003). Além da supressão de citocinas da imunidade inata, a IL-10 interfere diretamente com a produção de IFN- γ e IL-17 por células T, demonstrando um papel amplo para essa citocina imunorreguladora (NAUNDORF, 2009).

Em adição ao controle da reação inflamatória, a IL-10 também apresenta um papel protetor direto na destruição de tecidos, modulando os sistemas de MMPs e RANK. IL-10 induz, caracteristicamente, a produção de TIMPs, que são capazes de inibir a quase todos os membros da família MMP de uma forma não específica (CHOU, 2006; CLAUDINO, 2008).

Foi descrito que a IL-10 suprime a osteoclastogenese por inibição seletiva de sinalização de cálcio da RANK, e por inibição da transcrição da molécula coestimuladora dos osteoclastos TREM-2 (PARK-MIN, 2009). Além de estimular a produção de OPG, que conseqüentemente inibe a reabsorção óssea através da prevenção do acoplamento RANK-RANKL (ZHANG, 2006).

Sugere-se que a IL-10 também apresenta um efeito direto sobre a formação de osso, uma vez que a perda de osso alveolar, na ausência de IL-10 está associada com uma expressão reduzida de marcadores de osteoblastos e osteócitos, de forma independente das vias microbianas, inflamatórias ou de reabsorção óssea (CLAUDINO, 2010).

As células T regs têm sido descritas como um subconjunto de células T de proteção aos danos nos tecidos no ambiente periodontal. As Tregs são as células T CD4⁺/CD25⁺ que regulam especificamente a ativação, proliferação e função efetora de células T convencionais ativadas, determinando o resultado de várias configurações imunológicas, que vão desde doenças infecciosas, imunopatológicas e autoimunidade (APPAY, 2008; SHEVACH, 2009).

Juntamente a ação protetora da IL-10, as células Treg secretam fatores transformadores de crescimento (TGF)- β que supostamente atenua a progressão da doença periodontal (CARDOSO, 2008) desempenhando um papel importante na atenuação do dano inflamatório. O TGF- β é uma citocina pleiotrópica que regula o

crescimento e a diferenciação celular, a produção da matriz, e é um potente fator imunossupressor que regula negativamente a transcrição dos fatores pró-inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α , e MMPs (OKADA, 1998; STEINSVOLL, 1999). Adicionalmente, em lesões periodontais ativas, os níveis de TGF- β são negativamente correlacionados com os níveis de RANKL, reforçando o seu papel de proteção contra a destruição tecidual (STEINSVOLL, 1999; DUTZAN, 2009b).

Diversos estudos propõem que o perfil diferencial de citocinas do padrão de resposta das células T auxiliares em tecidos periodontais determina o curso da progressão da doença periodontal. No entanto, a descoberta de novas subpopulações de células T leva a um cenário mais complexo em relação ao papel das citocinas na patogênese da doença periodontal.

Visto que a PC, uma doença infecto-inflamatória local, possui como consequência principal a perda do dente afetando diretamente o estilo de vida do indivíduo, além de ser fator de risco para várias doenças, sua patogênese não está esclarecida totalmente, assim como sua repercussão sistêmica no sistema imunológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico e de citocinas de pacientes com Periodontite Crônica moderada e avançada.

3.2 Objetivos Específicos

I – Quantificar as citocinas plasmáticas dos padrões Th1, Th2 e Th17 de pacientes com Periodontite Crônica.

II – Investigar a frequência de linfócitos T (CD3+) e suas subpopulações (CD4+, CD8+ e CD4+CD25+), bem como de linfócitos B (CD19+) e de monócitos (CD14+) no sangue periférico de pacientes com Periodontite Crônica.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo e Aspectos Éticos

Foi realizado um estudo do tipo corte transversal com pacientes portadores de PC, atendidos na Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão.

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão com o número de protocolo 23115-010215/2011-16.

Inicialmente, todos os indivíduos receberam informações a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE). A adesão à pesquisa foi espontânea, obtida por meio de consentimento pós-informado, não se promovendo obrigatoriedade ou constrangimento ao paciente. Mesmo não tendo aderido à pesquisa, o tratamento do paciente foi mantido.

4.2 População do Estudo

Foram avaliados pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 30 e 65 anos, que procuraram atendimento na clínica da Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão, e divididos de acordo com a presença ou ausência da PC.

Foi considerada PC, a presença de sangramento à sondagem durante 30 segundos após a primeira inserção da sonda. Sendo a gravidade da doença analisada de acordo com os níveis de inserção clínica proposta por Armitage (2000). O critério de inclusão dos pacientes no grupo de portadores de PC foi a presença de PC nos estágios moderado (nível de inserção clínica - NIC, de 3 a 4mm) e avançada (nível de inserção clínica igual ou superior a 5mm), com quantidade superior ou igual a 20 dentes, onde pelo menos dois dentes apresentaram Profundidade à Sondagem (PS) superior ou igual a 5mm e NIC superior ou igual 6mm (MACHTEI; 1992).

Os pacientes foram divididos em dois grupos:

GRUPO CONTROLE - GC: composto por voluntários sem alterações sistêmicas comprovadas pelo exame físico e análises bioquímicas e saudáveis no aspecto periodontal;

GRUPO PERIODONTITE CRÔNICA - GPC: composto por pacientes com PC

moderada e avançada sem alterações sistêmicas comprovadas pelo exame físico e análises bioquímicas.

4.3 Critérios de não inclusão

Portadores de diabetes, insuficiência cardíaca congestiva, doença renal crônica, hipertensos, gestantes, lactantes, fumantes ou ex fumantes há menos de 10 anos, usuários de aparelho ortodôntico, história de uso de antiinflamatórios esteróides e não esteróides e antibioticoterapia nos últimos três meses antecedentes ao estudo e durante a pesquisa não foram incluídos no estudo.

4.4 Critérios de exclusão

Para serem mantidos nos grupos de estudo, os resultados das análises laboratoriais foram avaliados, a fim de excluir os portadores de alterações sistêmicas não identificadas previamente.

4.5 Coleta de dados

Na primeira visita, foram realizados procedimentos de preenchimento de dados pessoais para seleção de voluntários sem alterações sistêmicas pré-diagnosticadas para inclusão no estudo, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e medicação vermífuga (Albendazol de 400mg em dose única). Após 07 dias os pacientes retornaram em jejum para realização do exame clínico geral e periodontal e os pacientes que cumpriram as exigências foram encaminhados para coleta de sangue.

4.6 Exame clínico geral

O exame das condições sistêmicas foi realizado por um único examinador devidamente treinado. Foi realizada a anamnese para obtenção dos dados pessoais, da história atual e pregressa, história familiar, história social, medicamentos em uso, exame físico e exames laboratoriais.

4.7 Exame clínico periodontal

A anamnese compreendeu a história dental completa. Posteriormente, foi procedido o exame físico bucal e periodontal por um único examinador, previamente treinado, utilizando-se de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams (HU-

Friedy[®], Mgf.Co.Inc., Chicago, USA) e espelho bucal, devidamente esterilizadas.

O exame periodontal compreendeu a sondagem de seis sítios em cada dente (mésio-vestibular – MV; vestibular – V; disto-vestibular – DV; mésio-palatino – MP; palatino – P; e disto-palatino – DP), realizado por um único examinador treinado (Teste Kappa). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

- a. Índice de Placa Visível (IPV) – presente (1) e ausente (0) (AINAMO; BAY,1975);
- b. Índice de cálculo (IC) - determinado pela presença (1) ou ausência (0) (VOLPE,1974);
- c. Profundidade de sondagem (PS) – distância do fundo do sulco até a margem gengival;
- d. Índice de sangramento à sondagem (SS) – determinado pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado, durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal (AINAMO; BAY,1975);
- e. Nível de inserção clínica (NIC) – distância da junção cimento-esmalte até o fundo do sulco;
- f. Recessão gengival (RG) – distância da margem gengival livre à junção cimento-esmalte.

Os pacientes incluídos no estudo foram classificados de acordo com os critérios propostos por ARMITAGE (2000) em PC:

- Moderada: Nível de inserção de 3 a 4 mm;
- Avançada: Nível de inserção superior a 5mm.

Todos os procedimentos realizados foram registrados a cada consulta em ficha de evolução clínica (ANEXO A).

4.8 Coleta de amostras

Para obtenção das amostras de sangue foi realizada assepsia com algodão embebido em álcool 70%, seguida por punção da veia braquial com sistema BD Vacutainer. Para a realização dos exames laboratoriais, o soro foi obtido pela adição de sangue venoso em tubo a vácuo de 8 mL com gel separador, aliquotado e armazenado a –70°C até o momento das análises. Para dosagem de citocinas e fenotipagem, o sangue periférico dos pacientes foi coletado em tubos de 4 mL com EDTA. As amostras foram mantidas em geladeira e encaminhadas em gelo reciclável ao Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, onde estas foram

centrifugadas a 1811rcf por 10 minutos para separação e acondicionamento do plasma à -20°C e a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

4.9 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A foi utilizada a técnica de CBA, ensaio citométrico de esferas ordenadas. Todos os reagentes utilizados foram provenientes do Kit (Human Th1/Th2/Th17 cytokine Kit) obtidos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

Os plasmas foram centrifugados à 1500 rcf por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em cada poço da placa de 96 poços, fundo U, foram adicionados 25 μ L da amostra padrão fornecida pelo fabricante ou dos plasmas a serem testados. Em seguida receberam 25 μ L de cada reagente “cytokine beads” para marcar a produção de cada citocina e 25 μ L de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE (Figura 6). Os poços foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após o período de incubação as amostras foram ressuspensas com 300 μ L de solução tampão. A placa foi centrifugada por 10 minutos à 453 rcf e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram então ressuspensas em 150 μ L de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura dos padrões e das amostras, os dados foram analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina. Concentrações de citocinas que apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do kit (Quadro 1) foram considerados como zero.

Quadro 1. Limite de detecção para cada citocina do BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	2.6
IL-4	4.9
IL-6	2.4
IL-10	4.5
TNF- α	3.8
INF- γ	3.7
IL-17A	18.9

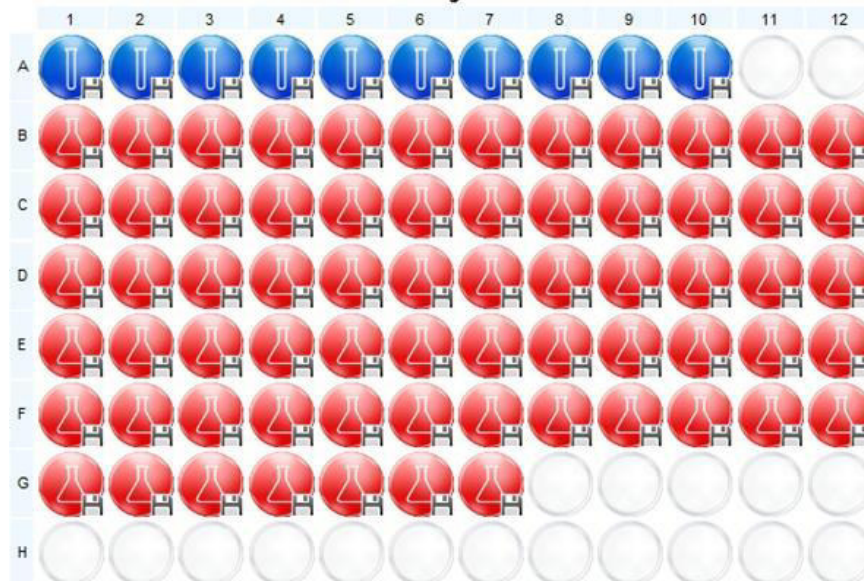


Figura 6. Layout da placa de 96 poços para dosagem de citocinas por CBA. Layout ilustrativo da placa de 96 poços com fundo em U experimental para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL -17A pela técnica de CBA no plasma de pacientes portadores ou não de periodontite crônica. Os poços em azul representam as amostras padrões fornecidas pelo fabricante e os poços em vermelho representam as amostras dos pacientes que participaram do estudo.

4.10 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e Imunofenotipagem

A amostra (4 mL de sangue) foi processada, em até 24 horas após a coleta, para obtenção do PBMC. A amostra foi colocada sobre o mesmo volume de Ficoll-Paque™ PLUS (densidade – 1.077 \pm 0,001 g/mL)(GE Healthcare Bio-Sciences). A seguir, o material foi centrifugado a 453 rcf por 40 minutos, o que ocasionou a separação da amostra em 4 fases distintas: células vermelhas (misturada com polimorfonucleares), Ficoll, PBMC e plasma. As PBMC foram colocadas em tubo separado. Em seguida, foi adicionada solução fisiológica 0,9% à suspensão de PBMC, em um volume 3x superior ao obtido de células. O material foi então levado para centrifugação a 201 rcf por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram feitas mais duas lavagens. Após isto, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo. Depois de contadas, 2 x 10⁶ células foram ressuspensas em um tampão específico para imunofenotipagem.

As células foram transferidas para uma placa de fundo redondo, marcadas com os Anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Foram montados 4 painéis de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD-3 e anti-CD14 conjugados com FITC; anti-CD4, anti-CD25,

anti-CD14 e anti-HLA-DR conjugados com PE e anti-CD19, anti-CD86, anti-CD8 e anti-CD4 conjugados com PE-Cy (BD Biosciences-Pharmingen)(Quadro 2). Após incubação, as células foram fixadas com formaldeído 2%. Para calibração do citometro, foi realizado um pool de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente). As amostras foram adquiridas em citometro de fluxo (BD FACSCalibur – BD Biosciences) e os dados analisados com o programa FlowJo-vX Verso(TreeStar).

Quadro 2. Painéis para marcação das células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Fluorocromo	Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4
FITC	CD3	CD14	CD3	CD3
PE	CD14	HLA-DR	CD4	CD25
PerCP	CD19	CD86	CD8	CD4

A estratégia de análise da imunofenotipagem das PBMC para cada painel se deu da seguinte maneira. Inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse inicial característica dos linfócitos e monócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), em seguida selecionou-se os parâmetros tamanho (FSC) *versus* CD19+, para análise dos Linfócitos B(Figura 7). Foram definidos o valor absoluto das células que expressaram o marcador específico.

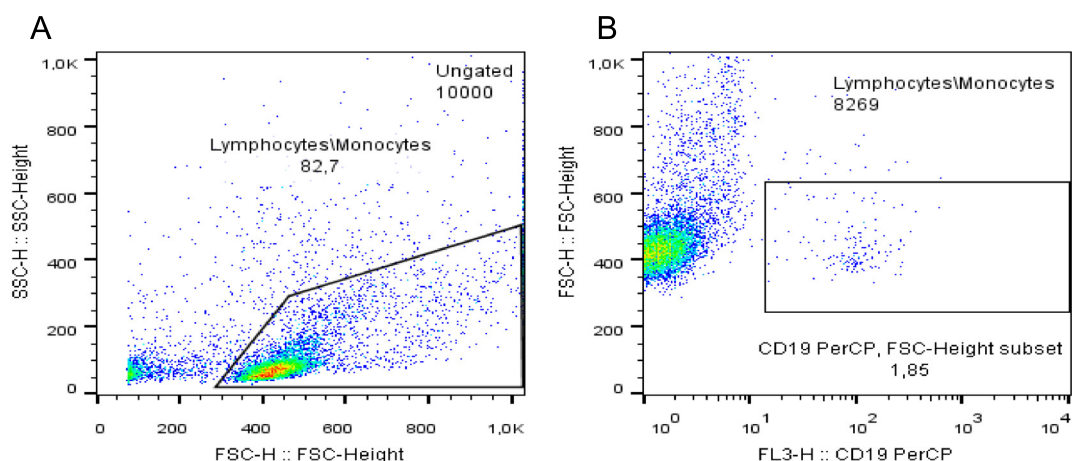


Figura 7. Estratégia de análise para identificação de linfócitos B. As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite e marcadas com anticorpos específicos para linfócitos B. Para análise dos linfócitos B, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse inicial característica dos linfócitos e monócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC)(A), em seguida selecionou-se os parâmetros tamanho (FSC) *versus* CD19+ e a região positiva para as células CD19+(B), para análise dos Linfócitos B, obtendo os valores absolutos.

Para análise dos linfócitos T, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC *versus* FSC, em seguida selecionou-se os parâmetros tamanho (FSC) *versus* CD3+. Subsequentemente, os linfócitos T foram subdivididos em populações majoritárias, selecionando os parâmetros e as regiões positivas em CD3+ *versus* CD4+ para linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4⁺) e CD3+ *versus* CD8+ para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+), simultaneamente e o gate duplo-positivo em CD4+ *versus* CD25+ para análise dos linfócitos T auxiliares ativados (CD3+/CD4+/CD25⁺)(Figura 8). Em cada população de linfócitos o valor absoluto e a média da intensidade de fluorescência das células que expressaram os marcadores específicos foram definidos.

Para análise dos monócitos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse no gráfico baseado em SSC *versus* FSC, em seguida selecionou-se tamanho (FSC) *versus* CD14+. Posteriormente, foi selecionado os parâmetros HLA-DR *versus* CD86, simultaneamente (Figura 9). Foram obtidos os valores absolutos dos monócitos que expressaram os marcadores específicos.

4.11 Análise Estatística

Foi realizado o teste de normalidade nos dados obtidos através do teste de D'Agostino & Pearson. Os dados que apresentaram distribuição normal foram apresentados como média e desvio padrão, no entanto na ausência de normalidade os valores foram apresentados como mediana e amplitude interquartis. Os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização dos testes estatísticos, levando-se em consideração de significância o p valor menor que 0,05 e o intervalo de confiança de 95%.

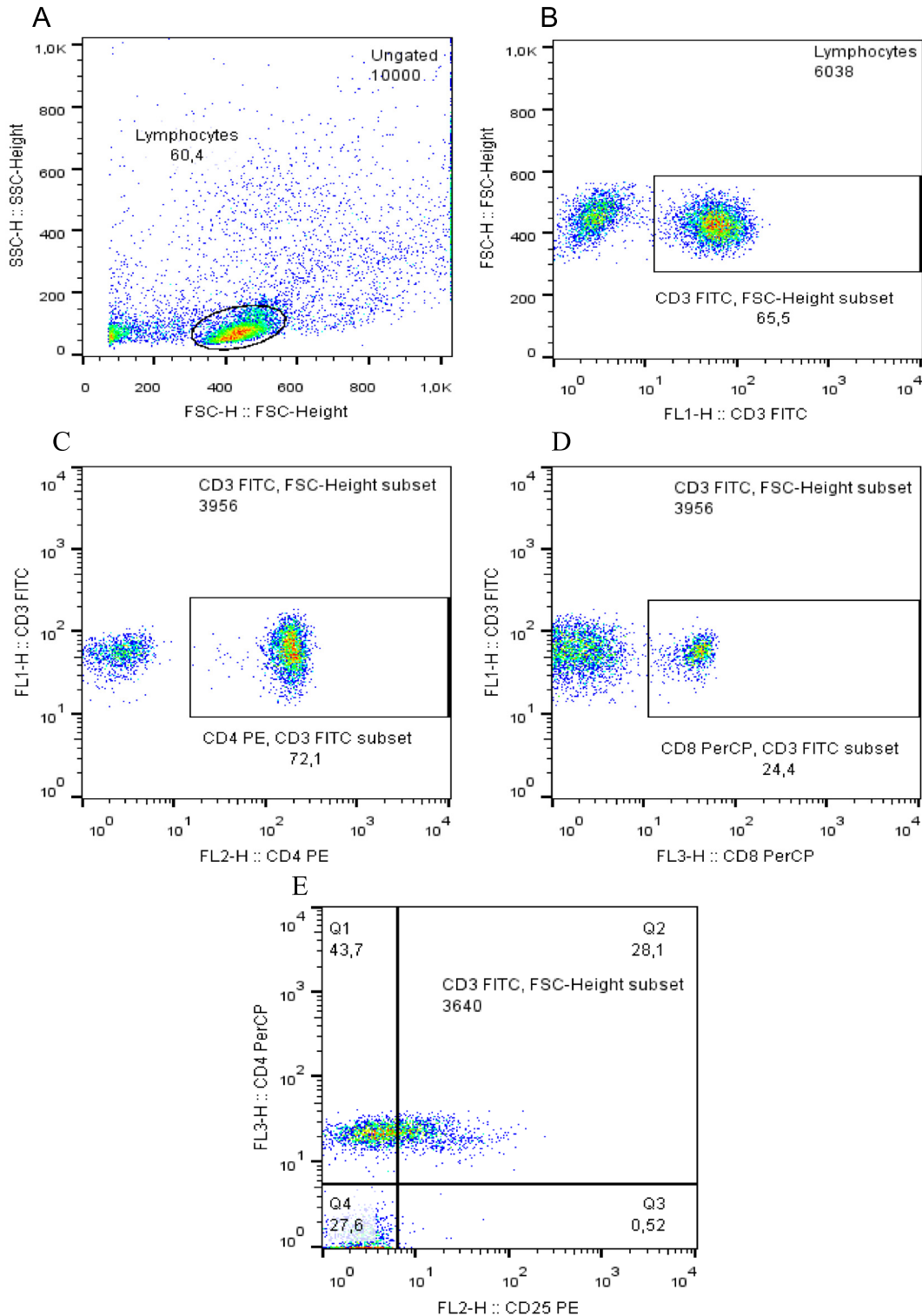


Figura 8. Estratégia de análise para identificação dos linfócitos T e suas subpopulações. As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite e marcadas com anticorpos específicos linfócitos T e suas subpopulações. Para análise dos linfócitos T, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse inicial característica dos linfócitos no gráfico baseado em granulidade (SSC) *versus* tamanho (FSC)(A), em seguida selecionou-se os parâmetros tamanho (FSC) *versus* CD3+ e a região para as células CD3+(B). Subsequentemente, os linfócitos T foram subdivididos em populações majoritárias, selecionando os parâmetros e as regiões positivas em CD3+ *versus* CD4+ para linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+)(C) e CD3+ *versus* CD8+ para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+)(D), simultaneamente e o gate duplo-positivo em CD4+ *versus* CD25+ para análise dos linfócitos T regulatórios (CD3+/CD4+/CD25+)(E). Obtendo os valores absolutos.

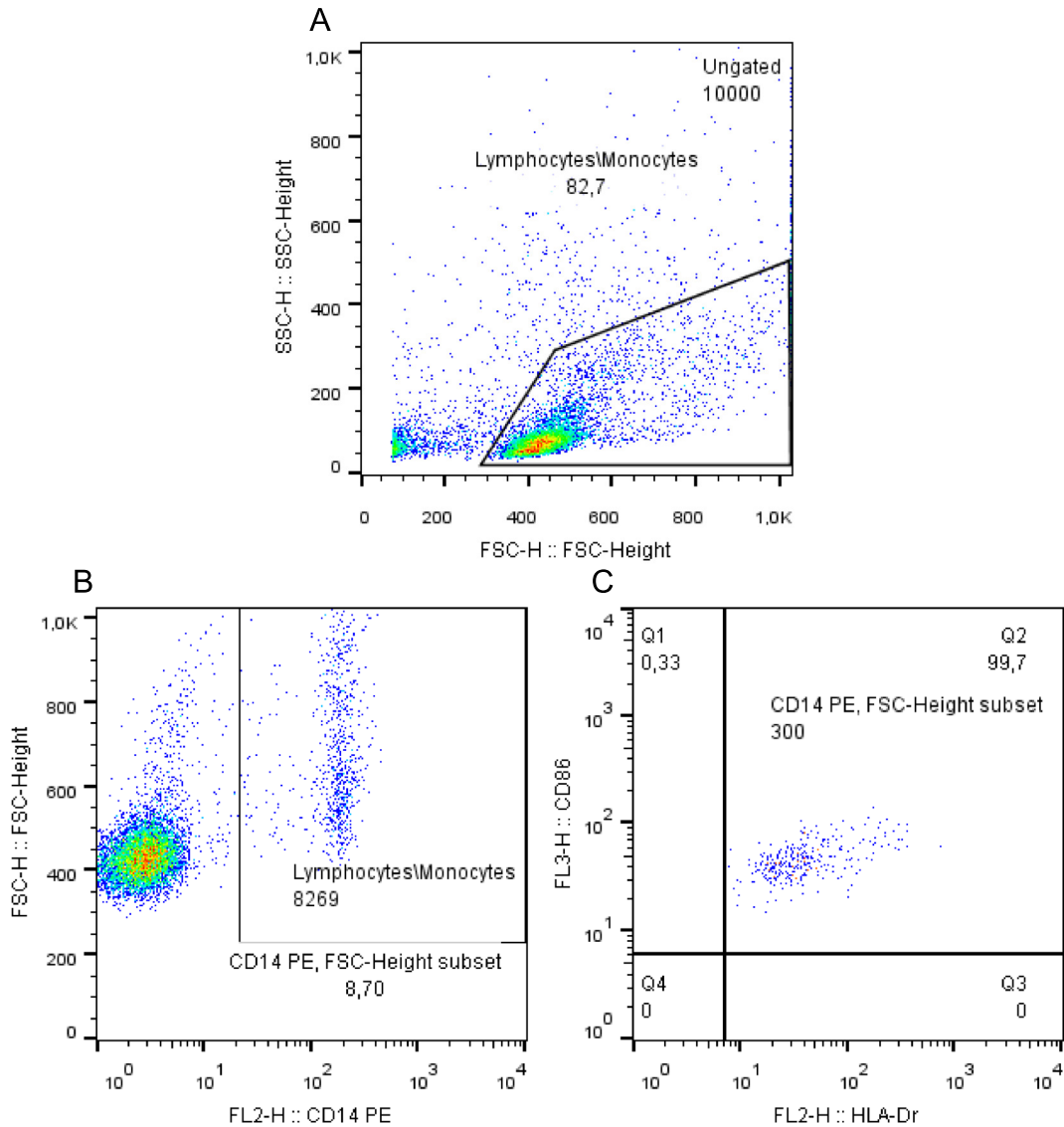


Figura 9. Estratégia de análise para identificação dos monócitos. As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas de indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite e marcadas com anticorpos específicos para monócitos. Para análise dos monócitos, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse inicial característica dos linfócitos/monócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC)(A), em seguida selecionou-se os parâmetros tamanho (FSC) *versus* CD14+ e a região positiva para as células CD14+(B). Subsequentemente, foram selecionados os parâmetros e a região duplo-positiva positiva em CD86+ *versus* HLA DR+(C). Foram obtidos os valores absolutos.

5 ARTIGO

PERIODONTITE CRÔNICA PROMOVE AUMENTO DA CIRCULAÇÃO DE MONÓCITOS E LINFÓCITOS T AUXILIARES ATIVADOS.

Johnny Ramos do Nascimento¹; Rosana Costa Casanovas Carvalho²; Sandra Augusta de Moura Leite²; Dalyla Nunes Cysne³; Izabel Cristina Portela Bogéa Serra³; Ana Paula Silva Azevedo dos Santos³; Antonio Luiz Amaral Pereira⁶; Flavia Raquel Fernandes Nascimento³

1. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Odontologia/ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, Brasil.
3. Graduação em Medicina
4. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
5. Laboratório de Imunofisiologia / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, Brasil.
6. Depato de Odontologia I

RESUMO

Estudos têm demonstrado que o tipo de resposta imune do hospedeiro e o envolvimento de células imunes, como macrófagos e linfócitos T, podem influenciar e alterar a evolução da periodontite crônica (PC). Apesar de estar restrita ao tecido periodontal e ser associada a outras doenças, a repercussão sistêmica da periodontite crônica sobre as células imunes ainda não está esclarecida. Com isso, o objetivo de caracterizar o perfil fenotípico das células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos com Periodontite crônica. Foram coletadas amostras de sangue (4 mL) de indivíduos sadios (n=22) e de pacientes com Periodontite Crônica (PC)(n=26) para obtenção do plasma e dosagem das citocinas: interleucinas (IL) 2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-17A; e obtenção das PBMC por gradiente de densidade para imunofenotipagem de monócitos, linfócitos B e linfócitos T com os seguintes anticorpos anti-CD19, anti-CD14; anti-HLA-DR, anti-CD86, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo. Houve aumento no número total de Linfócitos T (CD3+), bem como de Linfócitos T auxiliares (Th)(CD3+/CD4+) e dos Linfócitos T auxiliares ativados (CD3+/CD4+/CD25+) no GPC quando comparado ao GC. Houve também um aumento no número de monócitos (CD14+), bem como dos monócitos apresentadores de antígenos (CD14+/HLADR+/CD86+) quando comparados ao GC. Não houve diferença estatística entre o GC e GPC no número

de Linfócitos B (CD19) e de linfócitos T citotóxicos (Tc)(CD3+/CD8+). Não houve diferença na dosagem das citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17 entre os grupos. A PC, sendo uma doença infecto-inflamatória local, pode promover alterações no número monócitos e linfócitos T auxiliares circulantes e induzir sua ativação, mas estas alterações parecem não refletir no perfil sistêmico de citocinas.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite Crônica, PBMC, citocinas, imunofenotipagem.

INTRODUÇÃO

A PC é uma doença infecto-inflamatória dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes, causada por bactérias gram negativas e anaeróbicas, como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que formam o biofilme (1,2). Caracteriza-se pela perda de inserção do ligamento periodontal, destruição do osso alveolar adjacente, com formação de bolsas periodontais, mobilidade excessiva e conseqüente perda dos dentes (3,4).

A periodontite crônica apresenta um curso de progressão lento a moderado (5), porém, diversos fatores podem modificar a progressão da doença, como gênero, idade, tabagismo, doenças sistêmicas, fatores ambientais e genéticos (6), sendo mais prevalente em adultos, entre 30 e 65 anos (7). No entanto, o processo de destruição do tecido periodontal está relacionado com o perfil da resposta imune frente às bactérias presentes no biofilme (8).

Marcadores característicos dos subconjuntos de linfócitos T CD4+ Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) têm sido descritos em tecidos periodontais doentes, e estudos recentes demonstraram que bactérias orais comensais e patogênicas são capazes de desencadear a produção de mediadores característicos de todas as respostas de células T polarizadas (9-13).

Linfócitos Th1 têm sido associados a um perfil protetor e a estabilização da lesão periodontal, com a produção de IL-2, IL-12 e IFN- γ , que estimulam a resposta imune inata e inibição da diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Por outro lado, as células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10 que estimulam a resposta humoral através da ativação dos linfócitos B estão relacionadas com a progressão crônica da doença. (14-17).

As células Th17, por sua vez, produzem IL-17, que induz a liberação de IL-6, IL-8 e prostaglandina E2, atuam no recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o foco da infecção amplificando a resposta inflamatória, além de promover a ativação

dos osteoclastos e absorção do tecido ósseo alveolar (18-20). Ao passo que as células Th reguladoras possuem efeitos anti-inflamatórios e protetores controlando o processo inflamatório, bem como a reabsorção óssea, sendo encontradas em lesões periodontais com grande quantidade de células B (21).

Grande parte das investigações dos mecanismos imunoregulatórios da patogênese da PC foram realizadas em amostras obtidas do foco infeccioso, por meio de biopsia do tecido gengival para investigar o envolvimento das células imunes na PC (22) e por meio da coleta de saliva e fluido crevicular gengival na dosagem de citocinas e quimionas (23,24).

Tem sido descrito que a PC pode ter um papel etiológico e modulador em doenças sistêmicas, como as cardiovasculares e as cerebrovasculares (25,26) artrite reumatoide (27), diabetes (28) doenças respiratórias (29), doença renal crônica (30,31) e que possam provocar o nascimento de bebês prematuros (32).

Desta forma, considerando o caráter sistêmico destas doenças, com comprometimento imunológico, tem sido investigado se a periodontite crônica pode por si so induzir alterações imunológicas sistemas que justifiquem, pelo menos parcialmente, a progressão ou regressão da doença. Assim, este estudo propôs avaliar as possíveis alterações na produção das citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 no plasma de pacientes com PC, bem como alterações em monócitos, linfócitos T e B sanguíneos.

PACIENTES E MÉTODOS

Comitê de Ética/ Declaração de Ética

Foi um estudo do tipo corte transversal com o protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (número de protocolo 23115-010215/2011-16) e conduzido de acordo com os requisitos exigidos pela Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos. Os indivíduos participantes deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A adesão à pesquisa foi espontânea, obtida por meio de consentimento pós-informado, não se promovendo obrigatoriedade ou constrangimento ao paciente. Todos os participantes do estudo receberam kit de higiene oral e foram encaminhados para atendimento odontológico posterior, de acordo com suas necessidades. Mesmo não tendo aderido à pesquisa, o tratamento do paciente foi mantido.

Objeto de Estudo e Avaliação Periodontal

Indivíduos com PC moderada e avançada (n=22) foram recrutados de pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 30 e 65 anos, que visitaram a Clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão. PC foi diagnosticada com base no sistema de classificação estabelecido pelo *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* em 1999 (33). Indivíduos controle sadios (n=22), com mesma faixa etária e gênero, foram recrutados por meio de busca ativa. Indivíduos controle foram considerados periodontalmente sadios caso apresentassem profundidade a sondagem e nível de inserção clínico não superior a 3 mm em todos os dentes. Todos os indivíduos controle sadios não possuíam histórico de tratamento ou diagnóstico de PC. Os participantes do estudo possuíam um bom estado geral de saúde, confirmado através de exames físicos, clínicos e laboratoriais, bem como não apresentaram histórico de tratamento com antimicrobianos e anti-inflamatórios esteroides e não esteroides por até 3 meses antes do início da pesquisa. Não fizeram parte deste estudo: gestantes, fumantes ou ex-fumantes, usuários de aparelho ortodôntico, indivíduos com outras doenças crônicas, exceto a presença de PC. Os pacientes foram diagnosticados por um único periodontista, utilizando uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams (HU-Friedy[®], Mgf.Co.Inc., Chicago, USA).

Amostras de sangue humano

Para dosagem de citocinas, 4 mL de sangue foram coletados, centrifugados para obtenção do plasma e armazenados à -20°C até o momento do experimento. Em seguida, as células remanescentes foram ressuspensas em soro fisiológico 0,9% na proporção 1:2 e adicionadas ao mesmo volume de Ficoll-Paque™ PLUS (densidade – 1.077±0,001 g/mL)(GE Healthcare Bio-Sciences) e centrifugados a 400g por 40 minutos para obtenção da fase de PBMC. As PBMC foram retiradas, lavadas com soro fisiológico 0,9%, em seguida, imunofenotipadas.

Dosagem de citocinas

Foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL -17A por meio do método Cytometric Bead Array (CBA) usando o Human Th1/Th2/Th17 cytokine Kit (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo as especificações do fabricante.

Imunofenotipagem e Análise

As PBMC obtidas foram marcadas em 4 painéis de acordo com os fluorocromos conjugados no anticorpos: mouse anti-human CD3 e CD14 conjugados com FITC; mouse anti-human CD4, CD25, CD14 e HLA-DR conjugados com PE; e mouse anti-human CD19, CD86, CD8 e CD4 conjugados com PE-Cy (BD Biosciences-Pharmingen). As células foram adquiridas no FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience) e os dados analisados no programa FlowJo (TreeStar). Foi determinado o gate dos linfócitos baseado pelos parâmetros forward e side scatters (FSC e SSC), em seguida foi determinado os parâmetros FSC vs. CD19, para obtenção dos valores absolutos dos Linfócitos B CD19+. Para análise dos linfócitos T CD3+, foi determinado os parâmetros FSC vs. CD3; seguindo para os linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+ e os linfócitos T auxiliares CD3+CD4+ foram determinados os parâmetros CD3 vs. CD8 e CD3 vs. CD4, respectivamente. Nos linfócitos T auxiliares CD3+CD4+, foi determinado os parâmetros CD4 vs. CD25 para obtenção dos linfócitos T auxiliares ativados CD3+CD4+CD25+. Foram obtidos os respectivos valores absolutos e a média de intensidade de fluorescência de cada marcador específico. Foi determinado o gate dos monócitos baseado pelos parâmetros forward e side scatters (FSC e SSC), em seguida determinado os parametros FSC vs. CD14, e posteriormente as parâmetros HLA DR vs. CD86, para

obtenção para obtenção dos valores absolutos dos monócitos CD14+ e dos monócitos CD14+HLA DR+CD86+.

Análise Estatística

Foi realizado o teste de normalidade nos dados obtidos através do teste de D'Agostino & Pearson. Os dados que apresentaram distribuição normal foram apresentados como média e desvio padrão, no entanto na ausência de normalidade os valores foram apresentados como mediana. Os grupos foram comparados pelos testes *t* de Student e ANOVA seguido do teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização dos testes estatísticos, levando-se em consideração de significância o p valor menor que 0,05 e o intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Quantificação das citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17

Não houve diferença nas concentrações plasmáticas das citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A entre os grupos Controle e PC (Figura 1).

A IL-4 apresentou concentrações inferiores ao limite de detecção do kit utilizado.

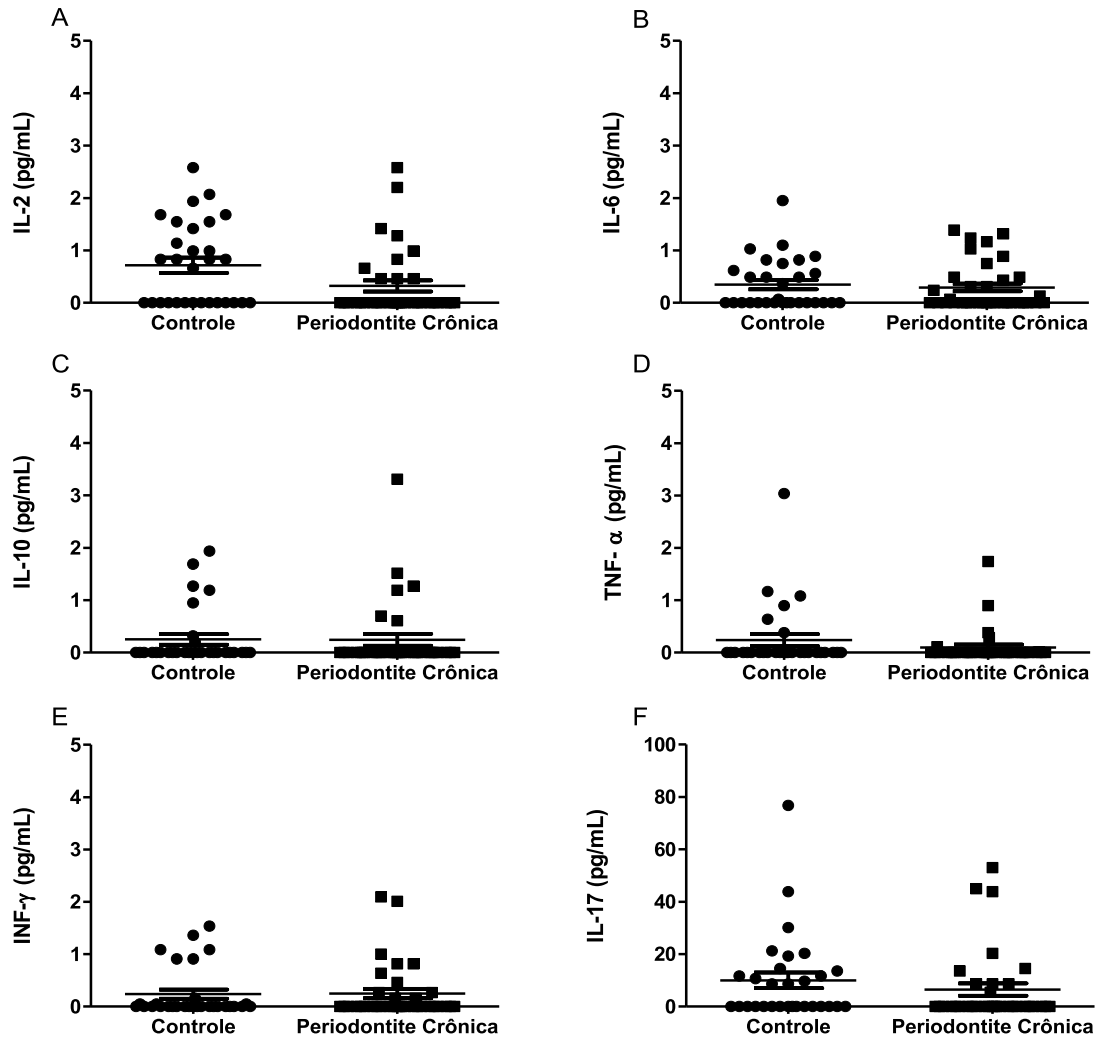


Figura 1. Níveis séricos de citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A em indivíduos saudáveis e com periodontite crônica (PC). As citocinas IL-2 (A), IL-6 (B), IL-10 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL-17A (F) foram quantificadas por CBA do plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com PC. Os dados expressam os valores individuais e a mediana das concentrações das citocinas. Não houve diferença estatística entre o grupo Controle e grupo PC na dosagem de IL-2, IL-6 e IL-10, $p > 0,05$. (Teste Mann Whitney).

Fenotipagem das células mononucleares de sangue periférico

Fenotipagem dos Monócitos

Os monócitos foram identificados pela expressão de CD14 e avaliados pela dupla expressão do complexo de histocompatibilidade de classe II (HLA DR) e pela proteína co-estimuladora CD86. O GPC apresentou valores absolutos maiores em relação ao GC, em relação aos monócitos CD14+ (Figura 2A), bem como no número de monócitos CD14+HLADR+CD86+ (Figura 2B).

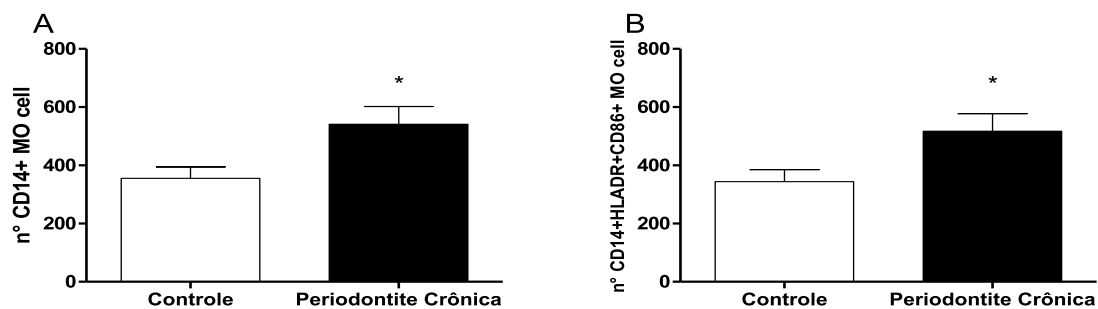


Figura 2. Avaliação dos monócitos CD14+ e expressão simultânea de HLA DR e CD86 em indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica (PC). Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com PC, foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD14, anti-HLA DR e anti-CD86 humanos para identificação e avaliação dos monócitos CD14+HLADR+CD86+. Houve diferença estatística no valor absoluto de monócitos CD14+ (A) e dos monócitos CD14+ que expressaram simultaneamente HLA DR e CD86 (B) no grupo PC em relação ao grupo Controle. Os dados foram expressos por média e desvio padrão. * $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

Fenotipagem dos Linfócitos

Os linfócitos foram marcados de acordo com as populações principais, Linfócitos B (CD19⁺) e Linfócitos T (CD3⁺), e as subpopulações de Linfócitos T, Linfócito T auxiliares (CD3/CD4⁺), Linfócito T citotóxico (CD3/CD8⁺) e Linfócitos T regulatório (CD3/CD4/CD25⁺).

Não houve diferença estatística nos valores absolutos dos linfócitos B CD19⁺ entre os grupos (Figura 3A), no entanto houve um aumento do número de linfócitos T CD3⁺ no GPC em relação ao GC (Figura 3B). Seguindo para a análise das subpopulações dos Linfócitos T, não houve diferença entre os valores absolutos dos linfócitos T citotóxicos CD3+CD8⁺ (Figura 3C), por outro lado, houve um aumento do número de linfócitos T auxiliares CD3+CD4⁺ (Figura 3D), bem como no número de linfócitos T auxiliares ativados CD3+CD4+CD25⁺ (Figura 3E) no GPC em relação ao GC.

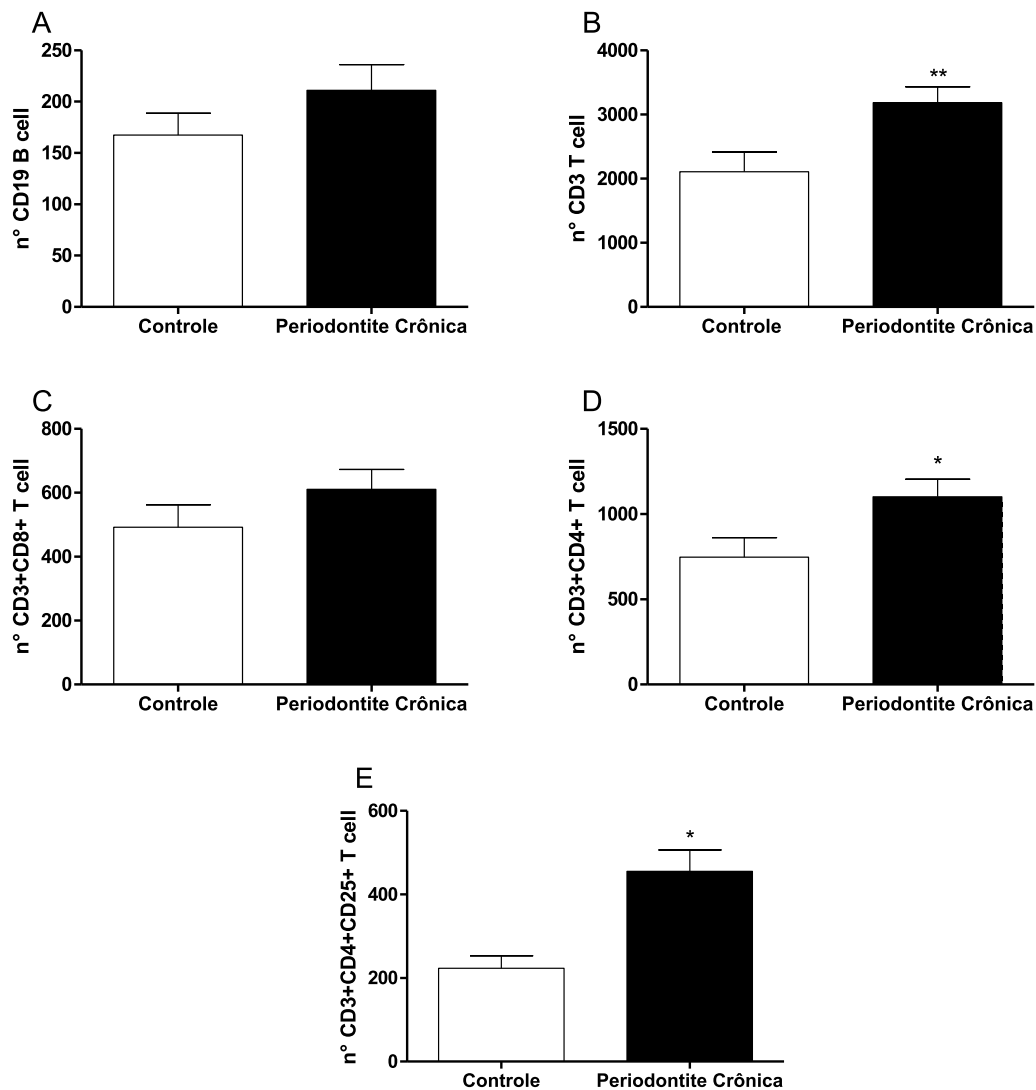


Figura 3 Avaliação dos linfócitos B CD19+, dos linfócitos T CD3+, dos linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+, dos linfócitos T auxiliares CD3+CD4+ e dos linfócitos T auxiliares ativadas CD3+CD4+CD25+ em indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica (PC). Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com PC, foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD19, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD25 humano para identificação e avaliação dos linfócitos B CD19+, linfócitos T CD3+ e suas subpopulações linfócito T citotóxico CD3+CD8+ e linfócitos T auxiliares CD3+CD4+, bem como de linfócitos T auxiliares ativados CD3+CD4+CD25+. Não houve diferença nos valores absolutos dos linfócitos B CD19+ (A) e nem dos linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+ (C), no entanto foi encontrado um aumento no valor absoluto do grupo PC em relação ao grupo controle nos linfócitos T CD3+(B), linfócitos T auxiliares CD3+CD4+(D) e linfócitos T auxiliares ativados CD3+CD4+CD25+(E). Os dados foram expressos por média e desvio padrão.* $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

DISCUSSÃO

Diversos estudos descrevem a participação crucial do sistema imune na evolução da PC (2,8,15,18). Entretanto, grande parte das investigações dos mecanismos imunoregulatórios da patogênese da PC foram realizadas em amostras obtidas do foco infeccioso, como biópsia do tecido gengival, saliva e fluido crevicular gengival (22,23,24).

Sendo assim, o comprometimento sistêmico da resposta imunológica em pacientes com PC não está claro, ainda que esta doença seja frequentemente associada a doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide, doença renal crônica e parto pré-termo (25-32).

Neste trabalho, foi demonstrado que a PC não induz por si so a alteração do perfil de citocinas, tanto pro (IL-6, TNF- α , IFN- ψ , IL-2 e IL-17) quanto anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), entretanto, induz o aumento da circulação de linfócitos T e monócitos ativados.

Neste trabalho, foi demonstrado que a PC não induz por si so a alteração da concentração plasmática da IL-6 e do TNF- α , citocinas pro-inflamatórias mediadoras de fase aguda na resposta a injúrias e infecções, que no tecido periodontal de um paciente com PC são secretadas principalmente pelos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos, no entanto estão associadas na reabsorção óssea alveolar (34). Entretanto, a estimulação da expressão de IL-6 pelo TNF- α e conseqüentemente a expressão da proteína C reativa pelo fígado pode ser um possível mecanismo que liga o foco da infecção da periodontite com os níveis sistêmicos destas citocinas (35).

Zhou et al (2013) demonstraram a diminuição dos níveis séricos de IL-6 e de TNF- α de pacientes com doença cardíaca coronariana e com PC após o tratamento periodontal não cirúrgico quando comparado com pacientes doença cardíaca coronariana não tratados, evidenciando uma possível influência da PC nos níveis séricos das citocinas pro-inflamatórias e conseqüentemente facilitar o tratamento da doença cardíaca coronariana. Em contrapartida, um estudo mostrou que os níveis de IL-6 na saliva e no FCG em pacientes com PC estavam diminuídos em relação a indivíduos sadios (37),

Em relação às citocinas do perfil Th1, IFN- γ e IL-2, não foi observado alterações plasmáticas destas citocinas no pacientes com PC. Estas citocinas são associadas com a fase aguda da doença periodontal, atuando no combate a

infecção por meio da ativação fagocitária e na produção de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias (16,38). Níveis superiores de IFN- γ e IL-2 foram encontrados no tecido gengival de pacientes com PC quando comparado com indivíduos saudáveis (22). Estudos demonstram que os efeitos pro inflamatórios destas citocinas podem promover lesão óssea através da liberação de RANKL (39).

Corroborando com nossos dados, Khalaf et al (2014) não observaram alterações na dosagem sérica e na saliva de IL-2 entre pacientes com periodontite e indivíduos sadios, e menor no FCG antes e após desbridamento gengival. A IL-2 é sintetizada próximo ao biofilme gengival, onde proteinases são secretadas pelas bactérias do biofilme e neutralizam esta citocina, podendo ser a razão pela diminuição da IL-2 (40).

Não foi observado alterações na dosagem plasmática da IL-17, esta é a principal citocina do perfil Th17, atuam com papel protetor com infecções e também pela participação em processos inflamatórios e autoimunes de diversas doenças (41), no entanto o seu envolvimento no processo patogênico da PC possui algumas aspectos controversos. Bactérias gram-negativas presentes no biofilme podem induzir a resposta Th17 e produção de IL-17, que por sua vez promove a ativação do sistema imune inato e recrutamento celular, no entanto este efeito protetor inflamatório pode estar relacionado com a destruição óssea (42).

Investigações sobre a presença desta citocina em tipos diferentes de amostras são controversas (22-24). Neste estudo, não foram encontradas alterações na concentração plasmática de IL-17. Corroborando com nossos dados, não foram observadas diferenças na concentração desta citocina na saliva entre pacientes com PC e indivíduos saudáveis (24). Em contrapartida, Zhao et al (2011) demonstraram a diminuição desta citocina no FCG após o tratamento não cirúrgico de pacientes com PC. Por outro lado, uma análise do tecido gengival mostrou um aumento de IL-17 em pacientes com PC quando comparados com indivíduos sadios (22).

Neste estudo não houve diferença nas concentrações plasmáticas da IL-4 e IL-10. O perfil de resposta Th2 tem como citocina principal a IL-4, que possui como principal ação a ativação de linfócitos B e promover a resposta humoral que está associada com o perfil crônico da doença periodontal (16). Foi demonstrado que as células B podem promover a reabsorção óssea pela produção de RANKL e a produção de anticorpos autoimunes contra componentes do tecido periodontal (43).

Em contrapartida, a IL-4 associada com a IL-10 parece assumir um efeito protetor na progressão da PC, suprimindo as propriedades inflamatórias da resposta Th1 (44). Adicionalmente, estudos relatam que a IL-4 e a IL-10 parecem atuar na inibição de enzimas que realizam a reabsorção óssea e da MCE (45,46).

Estes dados corroboram parcialmente com as análises de Souto et al (2014), uma vez que não observaram diferença na dosagem de IL-4 do tecido gengival, mas demonstraram aumento da IL-10 nos pacientes com PC em relação aos indivíduos saudáveis.

De acordo com os dados mostrados acima, as citocinas desempenham um papel crítico na determinação da força, da natureza e duração da resposta imune na patogênese da PC, no entanto permanece controversa a repercussão da PC no perfil da dosagem destas citocinas sistemicamente. Sabendo que a periodontite parece não afetar o perfil sistêmico de citocinas, passou-se a investigar se esta doença afetaria o perfil de células imunológicas, bem como sua ativação.

Tem se levantado a hipótese de que a exposição crônica a padrões moleculares associados a patógenos derivados de patógenos periodontais produz inflamação sistêmica de baixo grau que pode exacerbar doenças inflamatórias concomitantes (47). Nosso estudo evidenciou que pacientes com PC possuíam um aumento no número de monócitos (CD14+) circulantes, bem como maior número de monócitos que expressam HLADR e CD86, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Este aumento pode estar associado com um aumento dos níveis séricos e salivar de MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos) em pacientes com PC quando comparados com indivíduos saudáveis (48) e esta quimiocina foi considerada como um fator de risco para várias doenças cardíacas, como a aterosclerose (49).

Resultados semelhantes foram observados por Jagannathan et al (2014), que demonstraram um aumento na proporção de monócitos CD14+CD16+HLA-DR+ do sangue periférico de pacientes com PC. A expressão de HLA-DR em monócitos CD14+CD16+ obtidos a partir de sangue periférico de doadores saudáveis foi mostrado em conferir um traço pró-inflamatório para essas células (51).

Herrera et al (2013) promoveram a diferenciação de monócitos CD14+ em osteoclastos induzida por RANKL da PBMC de pacientes com PC, mas não em monócitos de controles saudáveis, que exigiam a adição de M-CSF. Além dos osteoclastos derivados de monócitos de pacientes com CP mostrarem atividade de

reabsorção óssea mais elevada do que a observada nos dos controles saudáveis (52), mostrando que a PC pode tornar os monócitos mais susceptíveis a estímulos inflamatórios, assim ativando outras células do sistema imune amplificando a resposta inflamatória causado por outros patógenos.

Este número aumentado de células CD14+HLA-DR+, associado à expressão positiva de CD86, uma molécula coestimuladora na apresentação de antígenos, pode evidenciar a associação da PC com outras doenças inflamatórias.

Além da resposta imune inata, as bactérias periodontais levam à mobilização de mecanismos de imunidade adaptativa. Após a ativação, as células apresentadoras de antígenos expressam moléculas coestimuladoras e produzem padrões distintos de citocinas que irão determinar a polarização subsequente e ativação de linfócitos antígeno específicos (53). No entanto, este estudo não encontrou alterações plasmáticas das citocinas envolvidas no processo local de apresentação de antígeno e ativação dos linfócitos.

Neste estudo foi encontrado um aumento no número de linfócitos T CD3+ circulantes de pacientes com PC, acompanhado de um aumento no número de linfócitos T auxiliares CD3+CD4+, no entanto os linfócitos T citotóxicos CD3+CD8+. Este resultado não foi corroborado por Emingil e et al (2001) que demonstraram que houve uma diminuição do número relativo de linfócitos T CD3+ de sangue periférico de pacientes com PC quando comparados a controles saudáveis.

Bunduneli et al (2001) não observaram diferença em relação ao número de linfócito B, linfócitos T, linfócitos T auxiliares e citotóxicos e nem no número de linfócitos ativados oriundos da PBMC de pacientes adultos com periodontite e controles sadios, sugerindo a existência de um mecanismo imune celular deficiente para a susceptibilidade à doença periodontal, devido a não alteração do perfil imune celular dos pacientes com o desafio bacteriano (56).

Interessantemente foi encontrado um aumento do número de linfócitos T auxiliares ativados (CD3+CD4+CD25+) circulantes em pacientes com PC quando comparados com indivíduos saudáveis. Corroborando com Lins et al (2012), que evidenciaram um maior número de linfócitos que expressaram de CD25+ o tecido gengival de pacientes com PC do que em pacientes com gengivite, podendo ser uma explicação para o maior dano tecidual presente na PC.

Esse dano tecidual pode servir como porta de entrada das bactérias do biofilme para a circulação, podendo causar níveis baixos de bacteremia e

endotoxemia (58,59), sendo uma possível explicação para o aumento do número de monócitos que expressam HLADR e CD86 e conseqüentemente promovendo a ativação e o aumento do número de linfócitos T auxiliares. Este perfil ativado das células imunes na PC pode desencadear um processo inflamatório exacerbado e/ou por uma quantidade menor de estímulo, sendo um fator de risco associado na evolução de outras doenças.

A PC, sendo uma doença infecto-inflamatória local, promove ativação do sistema imune inato e adaptativo, recrutamento celular e produção de mediadores inflamatórios no tecido periodontal. Este estudo evidenciou que a PC pode repercutir no número monócitos e linfócitos T auxiliares circulantes e induzir sua ativação, podendo ser uma possível ligação com a sua associação a outras patologias, mas estas alterações parecem não refletir no perfil sistêmico de citocinas. Torna-se necessário mais estudos sobre em relação às células imunes envolvidas e a dosagem de outras citocinas e quimiocinas para o melhor conhecimento da patogênese da PC.

REFERÊNCIAS

1. Loe, H (1993) Periodontal disease; a brief historical perspective. *Periodontol* 2000 2:7-12.
2. Darveou RP (2010) Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Rev Microbio* 8: 481-490.
3. Albandar JM (2011) Underestimation of periodontitis in NHANES surveys. *J Periodontol* 82(3):337–341.
4. Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP (2010) Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53: 45–54.
5. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung C, et al. (1999) Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Ann Periodontol* 4 (1): 38.
6. Aljehani YA (2014) Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *Int J Dent.* 2014:9 pages.
7. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ (2012) Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 91: 914-920.
8. Liu YC, Lerner UH, Teng YT (2010) Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000 52:163–206.
9. Gemmell E, Seymour GJ (2004) Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 35:21-41.
10. Kopitar AN, Ihan Hren N, Ihan A (2006) Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. *Oral Microbiol Immun.* 21:1-5.
11. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS (2008) Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol* . 84:311-318.
12. Cardoso CR, Garlett GP, Crippa GE, Rosa AL, Martins WJR, Rossi MA, Silva JS (2009) Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immun.* 24:1-6.
13. Gaffen SL, Hajishengallis G (2008) A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* 87:817-828.
14. Taylor JJ (2010) Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 54 (1): 160–194
15. Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 89 (12): 1349–1363.
16. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ (2007) The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol* 2000 43:14–40.
17. Jankovic D, Liu Z, Gause WC (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 22:450-457.

18. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ (2009) The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J* 54 Suppl 1: S2–10.
19. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, et al. (2011) Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 38:509–516.
20. Allam JP, Duan Y, Heinemann F, Winter J, Goetz W, et al. (2011) IL-23-producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. *J Clin Periodontol* 38:879-886.
21. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, et al. (2005) Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res* 84 (7): 639 643.
22. Souto GR, Queiroz-Junior CM, de Abreu MHNG, Costa FO, Mesquita RA (2014) Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 Cytokines and Dendritic Cells: A Cross-sectional Study in Chronic Periodontitis. *PLoS ONE* 9(3): e91636.
23. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W (2011) Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 38 (6):509-516.
24. Isaza-Guzmán DM, Cardona-Vélez N, Gaviria-Correa DE, Martínez-Pabón MC, Castaño-Granada MC, Tobón-Arroyave SI (2015) Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 60(1):91-9.
25. Beck JD, Offenbacher S (2005) Systemic Effects of Periodontitis: Epidemiology of Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *J Periodontol,* 76(11):2089-2100.
26. Khader YS, Albashaireh ZSM, Alomari MA (2004) Periodontal Diseases and the Risk of Coronary Heart and Cerebrovascular Diseases: A Meta-Analysis. *J Periodontol* 75(8): 1046-1053.
27. Coburn BW, Sayles HR, Payne JB, Redman RS, Markt JC, Beatty MW, Griffiths GR, MCGowan DJ, Mikuls TR (2015) Performance of self-reported measures for periodontitis in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Periodontol.* 86(1):16-26.
28. Kudiyirickal MG, Pappachan JM (2014) *Diabetes mellitus* and oral health. *Endocrine.*
29. Zeng X-T, Tu M-L, Liu D-Y, Zheng D, Zhang J, et al. (2012) Periodontal Disease and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* 7(10): e46508. doi:10.1371/journal.pone.0046508.
30. Salimi S, Ng N, Seliger SL, Parsa A (2014) Periodontal disease, renal dysfunction and heightened leukocytosis. *Nephron Clin Pract.* 128(1-2):107-14.
31. Vilela EM, Bastos JA, Fernandes N, Ferreira AP, Chaoubah A, Bastos MG. (2011) Treatment of chronic periodontitis decreases serum prohepcidin levels in patients with chronic kidney disease. *Clinics* 66(4):657-662.

32. Sitholimela CS, Shangase LS (2013) The association between periodontitis and pre-term birth and/or low birth weight: a literature review. *SADJ*. 68 (4):162-166.
33. Armitage GC (2000) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent* 79: 31–35.
34. Radics T, Kiss C, Tar I, Márton IJ (2003) Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol*. 18(1):9-13.
35. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. (2010) Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol*. 81(4):520-6.
36. Zhou SY, Duan XQ, Hu R, Ouyang XY. (2013) Effect of non-surgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease. *Chin J Dent Res*.16(2):145-51.
37. Khalaf H, Lönn J, Bengtsson T (2014) Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. *Cytokine*. 67(1):29-35.
38. Sallusto F, Lanzavecchia A (2009). Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39:2076-2082.
39. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. (2008) The essential role of IFN- γ in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect* 10:489-496.
40. Khalaf H, Bengtsson T. (2012) Altered T-cell responses by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*;7:e45192.
41. Song Y, Qian Y (2013) IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cellular Signalling* 25, 2335–2347.
42. Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS (2014) The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol* 41(6):541-9
43. Koutouzis T, Haber D, Shaddox L, Aukhil I, Wallet SM (2009). Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. *J Periodontol* 80:625-633.
44. Bluestone JA, Mackay CR, O’Shea JJ, Stockinger B (2009). The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
45. Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, et al. (2008). The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol* 84:1565-1573.
46. Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yamamoto M (2009). Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3

ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochem Biophys Res Commun* 390:937-941.

47. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, Kiji M, Oda S, et al. (2004) Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. *J Periodont Res* 39 (1): 72–78.
48. Gupta M, Chaturvedi R, Jain A (2013) Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*. 61(3):892-7.
49. Tanaka T, Nakamura Y, Nasuno A, Mezaki T, Higuchi K, Fukunaga H, et al (2004) Plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and neopterin in the coronary circulation of patients with coronary artery disease. *Circ J*;68:114–20.
50. Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. (2014) Comparison of the proportion of non-classic (CD14+CD16+) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 85(6):852-8.
51. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168:3536-3542.
52. Herrera BS, Bastos AS, Coimbra LS, Teixeira SA, Rossa C Jr, Van Dyke TE, Muscara MN, Spolidorio LC (2014) Peripheral blood mononuclear phagocytes from patients with chronic periodontitis are primed for osteoclast formation. *J Periodontol*. 2014 85(4):e72-81.
53. Cutler CW, Jotwani R (2004). Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol* 2000 35:135-157.
54. Emingil G, Karaarslan F, Keskinoglu A, Coker I, Atilla G (2001) Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients. *J Int Acad Periodontol*. 3(4):87-94.
55. Buduneli N, Biçakçi N, Keskinoglu A.(2001) Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets and mCD14 expression in patients with various periodontitis categories. *J Clin Periodontol*. 28(5):419-24.
56. Takahashi, K., Nagai, A., Satoh, N., Kurihara, H. & Murayama, Y. (1995) Studies on the phenotypic and functional characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with early-onset periodontitis. *J Periodonto* **66**, 391–396.
57. Lins RD, Alves PM, Godoy GP, Silveira EJ, Queiroz LM, Freitas Rde A. (2012) Immunohistochemical evaluation of CD25+ cell expression in the progression of periodontal disease. *Braz Dent J*. 23(4):322-7
58. Papapanagiotou D, Nicu EA, Bizzarro S, et al (2009) Periodontitis is associated with platelet activation. *Atherosclerosis*, 202:605–11.
59. Keschull M, Haupt M, Jepsen S, Deschner J, Nickenig G, et al. (2013) Mobilization of Endothelial Progenitors by Recurrent Bacteremias with a Periodontal Pathogen. *PLoS ONE* 8(1): e54860.

6 CONCLUSÕES

- Não houve diferença alteração da concentração sérica das citocinas dos padrões Th1/Th2/Th17 em pacientes com PC.
- Não houve diferença nos parâmetros avaliados em relação aos linfócitos B entre indivíduos sadios e pacientes com PC, mas houve aumento no número absoluto de linfócitos T CD3+, de linfócitos T auxiliares (CD3/CD4⁺), dos linfócitos T auxiliares ativados (CD4/CD25⁺) e no de monócitos (CD14+), bem como, nos monócitos que expressaram HLA-DR e CD86, simultaneamente.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, R. F.; PINHO, M. M.; LIMA, C.; FARIA, I.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**. V. 22, p. 379-390, 2006.
- APPAY, V.; VAN LIER, R. A.; SALLUSTO, F.; ROEDERER, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. **Cytometry A**. v. 73, p. 975-983, 2008.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. **Revista Periodontia**. V. 17, p. 7-13, 2007.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Northwest Dentistry**. V. 79, p. 31–35, 2000.
- BAKER, P. J.; BOUTAUGH, N. R.; TIFFANY, M.; ROOPENIAN, D. C. B cell IgD deletion prevents alveolar bone loss following murine oral infection. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. V. 2009, p. 864-359, 2009.
- BASTOS J A, VILELA. E. M.; ANDRADE, L. C. F.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L.; CHAOUBAH, A.; *et al.* Estudo piloto sobre a avaliação da periodontite crônica em pacientes com doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. V. 31, n. 2, p. 163-166, 2009.
- BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Systemic Effects of Periodontitis: Epidemiology of Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. **Journal of Periodontology**. V. 76, s. 11, p. 2089-2100, 2005.
- BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GURGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **Journal of Dental Research**. V. 86, p. 347-351, 2007.
- BLUESTONE, J. A.; MACKAY, C. R.; O'SHEA, J. J.; STOCKINGER, B. The functional plasticity of T cell subsets. **Nature Reviews Immunology**. V. 9, p. 811-816, 2009.
- BOSSHARDT, D. D. & LANG, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. **Journal of Dental Research**.v. 84, p. 9–20, 2005.
- BUZOGLU, H. D.; UNAL, H.; ULGER, C.; MERT, S.; KÜCÜKYILDIRIM, S.; ER, N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**. v. 108, n. 5, p. 121-126, 2009.
- CARDOSO, C. R.; GARLET G. P.; MOREIRA, A. P.; JUNIOR, W. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. **Journal of Leukocyte Biology**. V. 84, p. 311-318, 2008.

CARDOSO, C. R.; GARLETT, G. P.; CRIPPA, G. E.; ROSA, A. L.; MARTINS, W. J. R., ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 24, p. 1-6, 2009.

CARRANZA, F. A. Classificação das doenças e condições que afetam o periodonto. In: Caranza FA, Newman MG, Takei HH. *Periodontia clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 61-3, 2004.

CHOU, W. Y.; LU, C. N.; LEE, T. H.; WU, C. L.; HUNG, K. S.; CONCEJERO, A. M.; JAWAN, B.; WANG, C. H. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**. V. 27, p. 469-476, 2006.

CLAUDINO, M.; TROMBONE, A. P.; CARDOSO, C. R.; FERREIRA, S. B. JR.; MARTINS, W. JR.; ASSIS, G. F.; *et al.* The broad effects of the functional IL-10 promoter 592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 84, p. 1565-1573, 2008.

CLAUDINO, M.; GARLET, T. P.; CARDOSO, C. R.; DE ASSIS, G. F.; TAGA, R.; CUNHA, F. Q.; *et al.* Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. **European Journal of Oral Sciences**. V. 118, p. 19-28, 2010.

COBURN, B. W.; SAYLES, H. R.; PAYNE, J. B.; REDMAN, R. S.; MARKT, J. C.; BEATTY, M. W.; GRIFFITHS, G. R.; MCGOWAN, D. J.; MIKULS, T. R. Performance of self-reported measures for periodontitis in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Journal of Periodontology**. V. 86, s. 1, p. 16-26, 2015.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of Periodontology**. V. 79, p. 1569–1576, 2008.

CORBET, E. F.; LEUNG, W. K. Epidemiology of periodontitis in the Asia and Oceania regions. **Periodontology 2000**. V. 56, n. 1, p. 25–64, 2011.

CRAIG, R. G. ; YIP, J. K. ; SO, M. K. ; BOYLAN, R. J. ; SOCRANSKY, S. S. ; HAFFAJEE, A. D. Relationship of destructive periodontal disease to the acute phase response. **Journal of Periodontology**. V. 74, P. 347-352, 2003.

CRONSTEIN, B. N. Interleukin-6 - a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. **Bulletin for NYU Hospital for Joint Diseases**. V. 65, n. Suppl 1, p. 11-15, 2007.

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

D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; PARKAR, M.; SUVAN, J.; TONETTI, M. S. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. **Journal of Dental Research**. V. 84, p. 269-273, 2005.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**. V. 8, s. 7, p. 481-490, 2010.

DELIMA, A. J.; VAN DYKE, T. E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Journal of Periodontology**. v. 31, p. 55-76, 2003.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**. V. 118, p. 503-508, 2000.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**. V. 8, p. 337-348, 2008.

DUTZAN, N.; VERNAL, R.; HERNANDEZ, M.; DEZEREGA, A.; RIVERA, O.; SILVA, N.; *et al.*. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**. v. 80, p 290-296, 2009a.

DUTZAN, N.; GAMONAL, J.; SILVA, A.; SANZ, M.; VERNAL, R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 36, p. 396-403, 2009b.

DYE, B. A. Global periodontal disease epidemiology. **Periodontology 2000**. V. 58, n. 1, p. 10–25, 2012.

EASTCOTT, J. W.; YAMASHITA, K.; TAUBMAN, M. A.; HARADA, Y.; SMITH, D. J. Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 9, p. 284-299, 1994.

EKE, P. I.; DYE, B. A.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G. O.; GENCO, R. J. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **Journal of Dental Research**. V. 91, p. 914–20, 2012.

FONSECA, J. E.; SANTOS, M. J.; CANHAO, H.; CHOY, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmunity Reviews**. V. 8, p. 538-542, 2009.

FUKADA, S. Y.; SILVA, T. A.; GARLET, G. P.; ROSA, A. L.; DA SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 24, n. 1, p. 25-31, 2009.

GAFFEN, S. L.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. **Journal of Dental Research**. V. 87, p. 817-828, 2008.

GAO, Y.; GRASSI, F.; RYAN, M. R.; TERAUCHI, M.; PAGE, K.; YANG, X.;, *et al.* IFN gamma stimulates osteoclast formation and bone loss *in vivo* via antigen-driven T cell activation. **Journal of Clinical Investigation**. V. 117, p 122-132, 2007.

GARLET, G. P.; MARTINS, W. JR.; FONSECA, B. A.; FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 31, p. 671-679, 2004.

GARLET, G.P.; CARDOSO, C. R.; CAMPANELLI, A. P.; MARTINS, W. JR.; SILVA, J. S. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? **Journal of Periodontal Research**. V. 41, p. 580-584, 2006.

GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R.; CAMPANELLI, A. P.; FERREIRA, B. R.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. The dual role of p55 tumour necrosis factoralpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 147, p. 128-138, 2007.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**. v. 89, s. 12. P. 1349-1363, 2010.

GAZIVODA, D.; DZOPALIC, T.; BOZIC, B.; TATOMIROVIC, Z.; BRKIC, Z.; COLIC, M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. V. 38, n. 7, p. 605-611, 2009.

GEMMELL, E.; MARSHALL, R. I.; SEYMOUR, G. J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontology 2000**. V. 14, p. 112-143, 1997.

GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; GRIECO, D. A.; SUGERMAN, P. B.; SEYMOUR, G. J. *P. gingivalis*-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. **Journal of Dental Research**. v. 81, p. 303-307, 2002.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. **Periodontology 2000**. V. 35, p. 21-41, 2004.

GIANNOPOULOU, C.; KAMMA, J. J.; MOMBELLI, A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 30, p. 145-153, 2003.

GONCALVES, L. D.; OLIVEIRA, G.; HURTADO P. A.; FEITOSA, A.; TAKIYA, C. M.; GRANJEIRO, J. M.; TRACKMAN, P. C.; OTAZÚ, I.; FERES-FILHO, E. J. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. **Journal of Periodontal Research**. V. 43, p. 570-577, 2008.

GÓRSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALIŃSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 30, n. 12, p. 1046-1052, 2003.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**. V. 2, n. 4, p. 1-15, 2011.

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

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**. V. 79, n. 8, Suppl. p. 1585S-1591S, 2008.

HANNAS, A. R.; PEREIRA, J. C.; GRANJEIRO, J. M.; TJADERHANE, L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontologica Scandinavica**. V. 65, p. 1-13, 2007.

HAN, X.; LIN, X.; SELIGER, A. R.; EASTCOTT, J.; KAWAI, T.; TAUBMAN, M. A. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 24, p. 190-196, 2009.

HONDA, T.; DOMON, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clinical and Experimental Immunology**. V. 144, p. 35-40, 2006.

HU, D. Y.; HONG, X.; LI, X. Oral health in China – trends and challenges. **International Journal of Oral Science**. V. 3, p. 7–12, 2011.

IHN, H.; YAMANE, K.; ASANO, Y.; KUBO, M.; TAMAKI, K. IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathway. **Journal of Immunology**. V. 168, p 1895-1902, 2002.

JI, S.; SHIN, J. E.; KIM, Y. S.; OH, J. E.; MIN, B. M.; CHOI, Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by *Fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells. **Infection and Immunity**. V. 77, p 1044-1052, 2009.

KHADER, Y. S.; ALBASHAIREH, Z. S. M.; ALOMARI, M. A. Periodontal Diseases and the Risk of Coronary Heart and Cerebrovascular Diseases: A Meta-Analysis. **Journal of Periodontology**. V. 75, s. 8, p. 1046-1053, 2004.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **American Journal of Pathology**. V. 169, p. 987-998, 2006.

KINANE, D.; BOUCHARD, P. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 35, p. 333-337, 2008.

KINDLE, L.; ROTHE, L.; KRISS, M.; OSDOBY, P.; COLLIN-OSDOBY, P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. **Journal of Bone And Mineral Research**. V. 21, p. 193-206, 2006.

KOPITAR, A. N.; IHAN HREN, N.; IHAN, A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 21, p. 1-5, 2006.

KORNMAN, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **Journal of Periodontology**. v. 79, n. 8, Suppl. p. 1560-1568, 2008.

KRAUSS, J. L.; POTEPA, J.; LAMBRIS, J. D.; HAJISHENGALLIS, G. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. **Periodontology 2000**. V. 52, p. 141-162, 2010.

KUDIYIRICKAL, M. G.; PAPPACHAN, J. M. Diabetes mellitus and oral health. **Endocrine**. 2014.

LIANG, S.; HOSUR, K. B.; DOMON, H.; HAJISHENGALLIS, G. Periodontal inflammation and bone loss in aged mice. **Journal of Periodontal Research** v. 45, n. 4, p. 574-578, 2010.

LIU, Y. C.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontology 2000**. V. 52, p. 163-206, 2010.

LÖE, H. Periodontal disease; a brief historical perspective. **Periodontology 2000**. V. 2, p 7-12, 1993.

LOOS, B. G.; CRAANDIJK, J.; HOEK, F. J.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VANDER VELDER, U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular disease in the peripheral blood of periodontitis patients. **Journal of Periodontology**. v. 71, p. 1528-1534, 2000.

MACHTEI, E. E.; CHRISTERSSON, L. A.; GROSSI, S. G.; DUNFORD, R.; ZAMBON, J. J.; GENCO, R. J. Clinical criteria for the definition of established periodontitis. **Journal of Periodontology**. v. 63, p. 206-214, 1992.

MÁRTON, I. J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 15, n. 3, p. 139-150. 2000

MÁRTON, I. J.; KISS, C. Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**. V. 40, p. 155–163, 2014.

MATTILA, K. J.; NIEMINEN, M. S.; VALTONEN, V. V.; RASI, V. P.; KESÄNIEMI, Y. A.; SYRJÄLÄ, S. L.; JUNGELL, P. S.; ISOLUOMA, M.; HIETANIEMI, K.; JOKINEN, M. J. Association between dental health and acute myocardial infarction. **British Medical Journal**. V. 298, p. 779-81. 1989

MATTILA, K.; VESANEN, M.; VALTONEN, V.; NIEMINEN, M.; PALOSUO, T.; RASI, V.; ASIKAINEN, S. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. **BioMed Central Infectious Diseases**. V. 2, p. 30, 2002.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endodontics & dental traumatology**. V.16, n. 1, p. 1-8, 2000.

MUSACCHIO, E.; VALVASON, C.; BOTSIOS, C.; OSTUNI, F.; FURLAN, A.; RAMONDA, R.; MODESTI, V.; SARTORI, L.; PUNZI, L. The tumor necrosis factor- α -blocking agent infliximab inhibits interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-6 gene expression in human osteoblastic cells. **Journal of Rheumatology**. V. 36, p. 1575-1579, 2009.

NAGASAWA, T.; KIJI, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; LU, H.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHY, G.; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontology 2000**. v. 43, p. 65–84, 2007.

NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. V. 1, n.15, s. 6, p. 348-381, 2004.

NAUNDORF, S.; SCHRODER, M.; HOFlich, C.; SUMAN, N.; VOLK, H. D.; GRUTZ, G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN- γ but not IL-17 production in memory T cells. **European Journal of Immunology**. v. 39, p. 1066-1077, 2009.

OHYAMA, H.; KATO-KOGOE, N.; KUHARA, A.; NISHIMURA, F.; NAKASHO, K.; YAMANEGI, K.; *et al.*. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. **Journal of Dental Research**. V. 88, p. 633-638, 2009.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. V. 9, p. 248-266, 1998.

OSEKO, F.; YAMAMOTO, T.; AKAMATSU, Y.; KANAMURA, N.; IWAKURA, Y.; IMANISHI, J.; *et al.* IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. **Oral Microbiology and Immunology**. V. 53, p. 287-294, 2009.

ØRSTAVIK, D.; PITT-FORD, T. R. Essential endodontology. 2nd ed. Oxford: **Blackwell Munksgaard**; p. 48- 49. 2008.

PAGE, R. C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H. E.; SEYMOUR, G. J.; KORNMAN, K. S. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000** v. 14, p. 216–248, 1997.0

PAGE, R. C. The pathology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. **Annals of Periodontology**. v. 3, p 108-120, 1998.

PARK-MIN, K. H.; JI, J. D.; ANTONIV, T.; REID, A. C.; SILVER, R. B.; HUMPHREY, M. B.; *et al.* IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. **Journal of Immunology**. V. 183, p. 2444-2455, 2009.

PATEL, R. State of oral health in Europe; Report Commissioned by the Platform for Better Oral Health in Europe; 2012.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 929-979, 2004.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease:the WHO approach. **Journal of Periodontology**. v. 76, p. 2187-2193, 2005.

PIHLSTROM, B.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**. V. 366, p. 1809-1820, 2005.

REPEKE, C. E.; FERREIRA, S. B. JR.; CLAUDINO, M.; SILVEIRA, E. M.; DE ASSIS, G. F.; AVILA-CAMPOS, M. J.; *et al.* Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. **Bone**. V. 46, p.1122-1130, 2010.

SAIDENBERG-KERMANAC'H, N.; BESSIS, N.; LEMEITER, D.; DE VERNEJOU, M.C.; BOISSIER, M. C.; COHEN-SOLAL, M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. **Journal of Clinical Immunology**. V. 24, p. 370-378, 2004.

SALIMI, S.; NG, N.; SELIGER, S. L.; PARSA, A. Periodontal disease, renal dysfunction and heightened leukocytosis. **Nephron Clinical Practice**. V. 128, s. 1-2, p. 107-14, 2014.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. **European Journal of Immunology**. V. 39, p. 2076-2082, 2009.

SASAKI, H.; OKAMATSU, Y.; KAWAI, T.; KENT, R.; TAUBMAN, M.; STASHENKO, P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. **Journal of Periodontology**. v. 39, p. 432-441, 2004.

SATO, K.; SUEMATSU, A.; OKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, A.; MORISHITA, Y.; KADONO, Y.; *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **Journal of Experimental Medicine**. V. 203, p. 2673-2682, 2006.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 75, p. 163-189, 2004.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**. V. 30, p. 636-645, 2009.

SILVA, T. A.; GARLET, G. P.; FUKADA, S. Y.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**. V. 86, n. 4, p. 306-319, 2007.

SITHOLIMELA, C. S.; SHANGASE, L. S. The association between periodontitis and pre-term birth and/or low birth weight: a literature review. **South African Dental Journal**. V. 68, S. 4, P. 162-166, 2013.

SOUZA, C. R.D.; LIBÉRIO, S. A.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO, S.; SILVEIRA, E. J. D.; PEREIRA, A. L. A. Avaliação da condição periodontal em pacientes renais em hemodiálise. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V. 51, n. 5, p. 285-289, 2005.

STASHENKO, P.; GONCALVES, R. B.; LIPKIN, B.; FICARELLI, A.; SASAKI, H.; CAMPOS-NETO, A. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. **American Journal of Pathology**. v. 170, p. 203-213, 2007.

STEINSVOLL, S.; HALSTENSEN, T. S.; SCHENCK, K. Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 26, p. 366-373, 1999.

TAKAHASHI, K.; AZUMA, T.; MOTOHIRA, H.; KINANE, D. F.; KITETSU, S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. V. 32, p. 369-374, 2005.

TAKAYANAGI, H.; SATO, K.; TAKAOKA, A.; TANIGUCHI, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. **Immunology Review**. V. 208, p. 181-193, 2005.

TENG, Y. T.; MAHAMED, D.; SINGH, B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL⁺ CD4⁺ Th-cell-mediated alveolar bone destruction *in vivo*. **Infection and Immunity**. V. 73, p. 3453-3461, 2005.

TONETTI, M. S.; IMBODEN, M. A.; LANG, N. P. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. **Journal of Periodontology**. v. 69, p. 1139-1147, 1998.

TSUJI, M.; YAMASAKI, M.; AMANO, K.; MATSUI, H.; MORIMOTO, T.; NAKAMURA, H. Histochemical localization of neutral proteases released during development of rat periradicular lesion. **Archives of Oral Biology**. V. 54, n. 12, p. 1128-1135, 2009.

TÜRKOĞLU, O.; BERDELI, A.; EMINGIL, G.; ATILLA, G. A novel p.S34N mutation of CAMP gene in patients with periodontal disease. **Archives of Oral Biology**. v. 56, n. 6, p. 573-579, 2011.

VERSTAPPEN, J.; VON DEN HOFF, J. W. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. **Journal of Dental Research**. V. 85, p. 1074-1084, 2006.

VILELA, E. M.; BASTOS, J. A.; FERNANDES, N.; FERREIRA, A. P.; CHAOUBAH, A.; BASTOS, M. G. Treatment of chronic periodontitis decreases serum prohepcidin levels in patients with chronic kidney disease. **Clinics**. V. 66, S. 4, P. 657-662. 2011.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death & Differentiation**. V. 10, p. 45-65, 2003.

YAGO, T.; NANKE, Y.; ICHIKAWA, N.; KOBASHIGAWA, T.; MOGI, M.; KAMATANI, N. *et al.* IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. **Journal of Cellular Biochemistry**. V. 108, p. 947-955, 2009.

YAMAGUCHI, M.; UKAI, T.; KANEKO, T.; YOSHINAGA, M.; YOKOYAMA, M.; OZAKI, Y.; *et al.* T cells are able to promote lipopolysaccharide-induced bone resorption in mice in the absence of B cells. **Journal of Periodontal Research**. V. 43, p. 549-555, 2008.

YOSHIMURA, A.; MORI, H.; OHISHI, M.; AKI, D.; HANADA T. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. **Current Opinion in Immunology**. V. 15, p. 704-708, 2003.

YU, J. J.; RUDDY, M. J.; WONG, G. C.; SFINTESCU, C.; BAKER, P. J.; SMITH, J. B.; *et al.* An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. **Blood**. V. 109, p. 3794-3802, 2007.

ZENG, X. T.; TU, M. L.; LIU, D. Y.; ZHENG, D.; ZHANG, J. *et al.* Periodontal Disease and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis of Observational Studies. **PLoS ONE**. V. 7, n.10: e46508. doi:10.1371/journal.pone.0046508. 2012.

ZHANG, X.; TENG, Y. T. Interleukin-10 inhibits Gram-negative-microbespecific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4⁺-Th1-cell-associated alveolar bone loss *in vivo*. **Infection and Immunity**. V. 74, p. 4927-4931, 2006.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Impacto da Doença Periodontal Crônica com os Níveis de Hepsidina e Hemoglobina Sérica**

Pesquisador responsável: Prof.Dr. Antônio Luiz Amaral Pereira (UFMA)
 Pesquisadoras secundárias: Profa. Ms. Rosana Costa Casanovas de Carvalho,
 Profa. Ms. Sandra Augusta de Moura Leite (UFMA), Profa.Dra. Flávia Raquel
 Fernandes Nascimento e Johnny Ramos do Nascimento

Eu, _____, RG: _____
 _____ com _____ anos de idade fui convidado(a) pelo Dr. Antônio Luis Amaral
 Pereira (CRO-MA 539), odontólogo pesquisador da Universidade Federal do
 Maranhão, a participar deste projeto de pesquisa. Compreendi que o objetivo
 principal desta pesquisa é descobrir o efeito do tratamento de gengiva (periodontal)
 sobre os níveis de ferro no sangue.

Fui esclarecido(a) que serei solicitado(a) a comparecer às visitas clínicas agendadas
 e receberei tratamento de gengiva de acordo com minhas necessidades, que terá
 tratamento periodontal básico (orientação à escovação, dieta, limpeza e aplicação
 de flúor) ou tratamento periodontal intensivo (orientação à escovação, dieta,
 remoção de tártaro acima e abaixo da gengiva e aplicação de flúor). Além disso,
 receberei tratamento contra verminose e farei exames de sangue e de urina antes e
 depois do tratamento realizado.

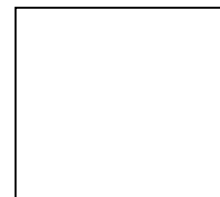
As informações pessoais obtidas através do projeto serão sigilosas e estarão dentro
 das normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, do Comitê de
 Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão.

Sua participação não é obrigatória, não terá custos e não terá recompensa
 financeira e o Sr(a) pode desistir de participar a qualquer momento sem que isso lhe
 traga qualquer prejuízo de atendimento na clínica odontológica onde realiza seu
 tratamento.

Em caso de dúvidas, poderei contatar com o Dr. Antônio Luis Amaral Pereira pelos
 telefones (98) 3235-1073, (98) 8113-2080 e fax (98) 3301-8922 ou o Comitê de Ética
 em Pesquisa da UFMA pelo endereço: Avenida dos Portugueses s/n, Campus
 Universitário Bacanga, Prédio do CEB velho PPPG - CEP (Bloco C, sala 07), Prof Dra
 Elba Gominde Mochel. Telefone para contato: 3301-8708.

Desta forma, afirmo que aceitei participar por minha própria vontade e com a finalidade
 exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa, o que fica confirmado pela minha
 assinatura abaixo.

São Luís, ____/____/____



 Assinatura do Participante

IMPRESSÃO
 DACTILOSCÓPIC

Anexo A - Ficha Clínica Periodontal

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA II
DISCIPLINA DE PERIODONTIA

FICHA CLÍNICA

DADOS PESSOAIS:

NOME: _____ SEXO _____
 _____ IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ ESTADO CIVIL: _____
 _____ PROFISSÃO: _____

Telefone: _____

ENDEREÇO: _____

MOTIVO DA CONSULTA: _____

HISTÓRIA MÉDICA:

Está em tratamento médico? Sim () Não ()

Por quê? _____

Doenças anteriores? _____

Doenças recentes? _____

História familiar de doenças relevantes? _____

Uso de medicamentos? Sim () Não ()

Quais? _____

Sensibilidade a anestésicos? Sim () Não () Sensibilidade a antibióticos? Sim () Não ()

Outros medicamentos? Sim () Não () Quais? _____

Antibioticoterapia recente? Sim () Não ()

Quanto tempo? _____ Qual medicamento? _____

Anti-inflamatórios recentes? Sim () Não ()

Quanto tempo? _____ Qual medicamento? _____

Diabetes? Sim () Não () Tipo? _____

Já fez cirurgias? Sim () Não () Hemorragia? Sim () Não ()

Cicatrização: _____

Tem ciclos menstruais normais? Sim () Não () Está grávida? Sim () Não ()

Meses? _____

Está amamentando? Sim () Não () Meses? _____

Fumante? Sim () Não () Há quanto tempo? _____

Freqüência: _____

Ex-fumante? Sim () Não () Período em que fumou: _____

Freqüência: _____

HISTÓRIA DENTAL:

É portador de doença gengival? Sim () Não () Há quanto tempo? _____

Já se submeteu a tratamento gengival? Sim () Não ()

Que tipo? _____ Quando? _____

Gengiva sangra com facilidade? Sim () Não ()

Sente seus dentes com mobilidade? Sim () Não ()

Seus dentes doem? Sim () Não () Região? _____

Halitose? Sim () Não () Os alimentos se prendem entre os dentes? Sim () Não ()

Região? _____

Hábitos: Bruxismo () Respirador bucal ()

Fatores retentivos de placa: Restauração insatisfatória () Prótese insatisfatória ()

Aparelho ortodôntico () Cálculo () Contatos proximais inadequados () Apinhamento ()

Restos radiculares () Cavidades de cáries ()

CONTROLE DE PLACA:

Quantas vezes escova seus dentes por dia? _____

Tipo de cerda da escova _____

Faz uso de fio/fita dental? Sim () Não () Freqüência: _____

Faz uso de bochechos? Sim () Não () Qual substância? _____

Outros meios auxiliares de higiene bucal? Sim () Não () Qual? _____

TERMO DE CONSENTIMENTO:

Eu,.....RG.....
declaro que todas as informações sobre meu estado de saúde são verdadeiras e que nada omiti no questionário realizado. Autorizo a realização do tratamento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMA.

São Luís, de de

.....

Assinatura do Paciente ou Responsável

PERIOGRAMA

Dente	Profundidade de Sondagem						Recessão Gengival						Nível de Inserção Clínica					
	DV	V	MV	DP	P	MP	DV	V	MV	DP	P	MP	DV	V	MV	DP	P	MP
18																		
17																		
16																		
15																		
14																		
13																		
12																		
11																		
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
38																		
37																		
36																		
35																		
34																		
33																		
32																		
31																		
41																		
42																		
43																		
44																		
45																		
46																		
47																		
48																		

ÍNDICE DE PLACA:

$$\frac{\text{Nº de faces coradas}}{\text{Nº total de dentes} \times 4} \times 100 = \%$$

ÍNDICE: _____
DATA: ____/____/____

ÍNDICE: _____
DATA: ____/____/____

ÍNDICE: _____
DATA: ____/____/____

ÍNDICE: _____
DATA: ____/____/____

DIAGNÓSTICO:

PROGNÓSTICO:

PLANO DE TRATAMENTO:

Anexo B – Regras de Submissão na Plos One

1. Format Requirements

PLOS ONE does **not** consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the [Figure and Table Guidelines](#))

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are **not** copyedited before publication.

In addition to the guidelines below, please refer to our downloadable sample files to make sure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download full manuscript sample \(PDF\)](#)

Submissions that do not meet the [PLOS ONE Publication Criterion for language standards](#) may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature
- Briefly relates your study to previously published work
- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript (view a [complete listing of our academic editors](#))
- Lists any opposed reviewers

Your cover letter should **not** include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your

requests at that time. See [PLOS ONE Editorial Policy](#) for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will **not** consider monographs. All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction

and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Supporting Information Captions

Figures should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each figure caption should then be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file.

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

Tables should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each table should then be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file.

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods

- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found [below](#).

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

PLOS articles do not support text footnotes. If your accepted submission contains footnotes, you will be asked to move that material into either the main text or the reference list, depending on the content.

Manuscript File Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Word files must not be protected.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the [PLOS ONE LaTeX template and BibTeX style sheet](#). Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files will be required. Please consult our [LaTeX guidelines](#) for a list of what will be required.

Microsoft Word Submissions with Equations. If your manuscript is or will be in Microsoft Word and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

1. Format display equations only in MathType (<http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>).
2. Inline equations should be completely input via MathType. Do not include an equation that is part text, part MathType.
3. Do not use graphic objects.

If you have already composed your article in Microsoft Word and used its built-in equation editing tool, your equations will become unusable during the typesetting process. To resolve this problem, re-key your equations using MathType.

If you do not follow these instructions, PLOS will not be able to accept your file.

[Back to top](#)

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
- Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

[Back to top](#)

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, one should contribute to **all** of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published

4. Agreement to be accountable for all aspects of the work

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

All authors must approve the final manuscript before submission. PLOS ONE will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission of the manuscript.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the [PLOS Editorial and Publishing Policies](#) for more information.

[Back to top](#)

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should **not** include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

[Back to top](#)

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature

- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

[Back to top](#)

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using **human or animal subjects and/or tissue or field sampling** must include required ethics statements. See the [Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies](#) for more information.

Methods sections of papers with **data that should be deposited in a publicly available database** should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. A list of recommended repositories for different types of data can be found [here](#).

Methods sections of papers using **cell lines** must state the origin of the cell lines used. See the [Reporting Guidelines for cell line research](#) for more information.

Methods sections of papers adding **new taxon names** to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new [zoological taxon](#), [botanical taxon](#), or [fungal taxon](#).

[Back to top](#)

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the [PLOS ONE Publication Criteria](#) for more information.

[Back to top](#)

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the [PLOS ONE authorship criteria](#) should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named. Funding sources should **not** be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

[Back to top](#)

References

General guidelines

- Authors may cite any and all available works in the reference list.
- Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., "unpublished work," "data not shown").
- If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.

- If related work has been submitted to PLOS ONE or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Reference formatting

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. For further information, see the ICMJE sample references.

References should be formatted as follows:

Published

papers

1. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun, B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers:

Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005

Accepted,

unpublished

papers

Same as above, but "In press" appears instead of the page numbers or DOI.

Websites

or

online

articles

1. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health. 2005;1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Books

1. Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.

Book

chapters

1. Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA,

Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.

Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)

1. Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1. Accessed 17 March 2014.

Published media (print or online newspapers and magazine articles)

1. Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. The New York Times. 29 Jan 2014. Available: <http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.

New media (blogs, websites, or other written works)

1. Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>.

Masters' theses or doctoral dissertations

1. Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>.

Databases and repositories (Figshare, arXiv)

1. Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013. Database: figshare [Internet]. Accessed: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214.

Multimedia (videos, movies, or TV shows)

1. Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

[Back to top](#)

Figure Legends

Figures should **not** be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found [here](#).

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The

legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Figures should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each figure caption should be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file. Further information about figure captions can be found in the [Figure Guidelines](#).

[Back to top](#)

Supporting Information Captions

Because Supporting Information is accessed via a hyperlink attached to its captions, captions must be listed in the article file. Do not submit a separate caption file. It is acceptable to have them in the file itself in addition, but they must be in the article file for access to be possible in the published version.

The file category name and number is required, and a one-line title is highly recommended. A legend can also be included but is not required. Supporting Information captions should be formatted as follows.

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

Please see our [Supporting Information guidelines](#) for more details.

[Back to top](#)

Data Reporting Guidelines

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article. Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (eg, GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CCBY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors.

Current repository integration partners include: Dryad and figshare. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

Deposit data in the integrated repository of choice. Once deposition is final and complete, the repository will provide the author with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data. Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS Submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section. If you have any questions, please contact us at plosone@plos.org

[Back to top](#)

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- [ArrayExpress](#)
- [BioModels Database](#)
- [Database of Interacting Proteins](#)
- [DNA Data Bank of Japan \[DDBJ\]](#)
- [DRYAD](#)
- [EMBL Nucleotide Sequence Database](#)
- [GenBank](#)
- [Gene Expression Omnibus \[GEO\]](#)
- [Protein Data Bank](#)
- [UniProtKB/Swiss-Prot](#)
- [ClinicalTrials.gov](#)

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)

- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

[Back to top](#)

Striking Images

Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.

Please keep in mind that PLOS's [Creative Commons Attribution License](#) applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in PLOS ONE are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.

Care should be taken with the following image types in particular:

1. PLOS ONE is unable to publish any images generated by Google software (Google Maps, Street View, and Earth)
2. Maps in general are usually copyrighted, especially satellite maps
3. Photographs
4. Commercial or government images, slogans, or logos
5. Images from Facebook or Twitter

Authors must also take special care when submitting manuscripts that contain potentially identifying images of people. Identifying information should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal](#) (PDF).

For license inquiries, e-mail [license \[at\] plos.org](mailto:license[at]plos.org).

[Back to top](#)

Tables

Tables should be cited in ascending numeric order upon first appearance. Each table should be inserted immediately after the first paragraph in which it is cited in the article file. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined [above](#). Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as [Supporting Information](#). Please ensure that table formatting conforms to our [Guidelines for table preparation](#).

Anexo C - Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO			
X	PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo	23115-010215/2011-16
	PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrada no CEP	26/07/20011
	TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembleia	01/09/2011

I - Identificação:

Título do projeto:	Impacto do tratamento da doença periodontal crônica sobre os níveis de hepcidina e hemoglobina sérica		
Identificação do Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Antônio Luiz Amaral Pereira		
Identificação da Equipe executora:	Profa. Msc. Rosana Costa Casanovas de Carvalho e Profa. Msc. Sandra Augusta de Moura Leite		
Instituição onde será realizado:	Universidade Federal do Maranhão-UFMA		
Área temática:	III	Multicêntrico:	Não Data de recebimento: 27/07/2011
Cooperação estrangeira:	Não	Patrocinador:	Não Data de devolução 01/09/2011

II - Objetivos:

Geral:

Avaliar o impacto do tratamento da DPC sobre os níveis de Hepcidina e Hemoglobina sérica.

Específico:

- 1) Avaliar a associação entre a DPC com os níveis de Hepcidina e Hemoglobina Sérica;
- 2) Determinar os níveis séricos de Hepcidina e Hemoglobina nos grupos em estudo;
- 3) Comparar o nível inicial de Hemoglobina, antes do tratamento, após 90 dias e aos 180 dias;
- 4) Correlacionar com a Hemoglobina os marcadores inflamatórios IL-6, PCR e Hepcidina nos três momentos;
- 5) Correlacionar os níveis séricos de Hepcidina com a reserva de Ferro circulante, antes, durante e depois do tratamento da DPC.

III - Sumário do projeto:

No projeto de pesquisa são apresentados os seguintes itens: introdução, revisão da literatura, hipóteses, objetivos, metodologia, resultados, impactos esperados, referências bibliográficas, cronograma e orçamento. O projeto pretende avaliar através de um estudo de caráter observacional e transversal, o impacto do tratamento da doença periodontal crônica sobre os níveis séricos de hepcidina e hemoglobina. Serão identificadas as associações entre presença da periodontite crônica e os níveis de hepcidina hemoglobina séricos. O estudo será realizado em pacientes portadores de DPC (Doença Periodontal Crônica), de ambos os sexos, de idade entre 30 e 65 anos em atendimento na clínica da Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão, classificados de acordo com a presença ou ausência da DPC. Os resultados esperados, serão informações acerca da associação entre os níveis de hepcidina e hemoglobina séricas com o grau de gravidade da DPC. Espera-se também avaliar o impacto do tratamento da DPC sobre os níveis de hepcidina e hemoglobina séricas.

IV - Comentários do relator:

O projeto será trabalho de pesquisa de doutorado da Profa. Msc. Rosana Costa Casanovas de Carvalho e Profa. Msc. Sandra Augusta de Moura Leite, o que consta nominado no termo de compromisso. O projeto será supervisionado pelo Prof. Dr. Antônio Luiz Amaral Pereira, que estará orientando as alunas em todas as fases da pesquisa. Todos os procedimentos de atendimento clínico e coletas de dados serão realizados na clínica da Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão. Os fundamentos apresentados no

"A Universidade que cresce com
inovação e inclusão social"

iv. dos Portugueses Campus Universitário do Bacanga, s/n - Prédio do CEB Velho bl "c" sala 7
São Luís - MA - CEP: 55095-500 Fone: (98) 3304.8708 Fax: (98) 3304.8704 - E-mail: cepufma@ufma.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto estão solidamente baseados em uma bibliográfica extensamente citada na Introdução, revisão da literatura e metodologia, sendo delineados de forma transparente, sustentando os objetivos do trabalho. Quanto aos aspectos éticos da pesquisa (Res. CNS 196/96) o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, fornece todas as informações pertinentes à pesquisa e está bem elaborado, a folha de rosto encontra-se devidamente assinado pelo Chefe de Dep. de Odontologia I, Prof. Ataíde Mendes Aires e também pelo Prof. Dr. Antônio Luiz Amaral Pereira. O custo do projeto tem como um valor total de R\$ 134.601,00 (cento e trinta e quatro mil e seiscentos e um reais), onde o orçamento deste projeto ficará sob a responsabilidade dos pesquisadores. No projeto consta o Currículo Lattes dos pesquisadores, termo de compromisso que declara a aceitação de orientação dos referido pesquisadores e carta de anuência assinada pelo chefe do departamento de Odontologia I.

V - Pendências:

Nenhuma

VI - Recomendações:

Nenhuma

VII - Parecer Consubstanciado do CEP

Deste modo, de acordo com relato acima exposto, o **Protocolo 23115-010215/2011-16**, referente a **Pesquisa** sob o título **"Impacto do tratamento da doença periodontal crônica sobre os níveis de hepcidina e hemoglobina sérica"** é considerado por este **CEP COMO APROVADO.**

II - Data da reunião do CEP: 01/09/2011

Elba Gomide Mochel
Profª. Drª. Elba Gomide Mochel
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA

DATA DE RECEBIMENTO: 18/10/11
RELATÓRIO PARCIAL: 12/12/12
RELATÓRIO FINAL: 21/12/14

NOTA:

1. Anexa folha do Relatório Parcial;
2. Pesquisas com duração acima de 6 meses deverão apresentar relatórios parciais semestrais;
3. Pesquisas com duração acima de 12 meses deverão apresentar relatórios anuais;
4. Após a conclusão da pesquisa deverá ser apresentado relatório final ao CEP/UFMA.

Anexo D – Artigo submetido

Article title: Activation of murine splenocytes sensitized with MCF7 cancer cells by carbohydrates isolated from *Attalea speciosa* Mart. mesocarp

MS ID : 4179209111463030

Authors : Josemar M F Godinho Jr, Elza Moraes, Leticia P P Pontes, Diego S Arruda, Caroline Costa, **Johnny R Nascimento**, Mayara C Pinto, Graciomar C Costa, Flávia M M Amaral, Rosane N M Guerra, Flávia R F Nascimento and Ana Paula S Azevedo-Santos

Journal : BMC Complementary and Alternative Medicine

Dear Dr Azevedo-Santos

Thank you for submitting a new version of your article.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures.

http://www.biomedcentral.com/imedia/4179209111463030_article.pdf (2499K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1613812848147011_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

Best wishes,

Miss Carisse Reyes

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>