

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**DOSAGEM DE IFN- γ , TNF- α e TGF- β NO SORO E NO FLUIDO
CREVICULAR GENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE
CRÔNICA E DE PACIENTES-CONTROLE, ANTES E APÓS O
TRATAMENTO PERIODONTAL BÁSICO**

Gustavo Fatureto Escobar

Uberaba, MG - 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO FATURETO ESCOBAR

**DOSAGEM DE IFN- γ , TNF- α e TGF- β NO SORO E NO FLUIDO
CREVICULAR GENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE
CRÔNICA E DE PACIENTES-CONTROLE, ANTES E APÓS O
TRATAMENTO PERIODONTAL BÁSICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia – Área de Concentração:
Patologia Geral, da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Co-Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Outubro, 2009

*Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro*

- E73d Escobar, Gustavo Fatureto
Dosagem de IFN- γ , TNF- α e TGF- β no soro e no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica e de pacientes-controle, antes e após o tratamento periodontal básico / Gustavo Fatureto Escobar. - - 2009.
73 p. : tab. ; graf. ; fig.
- Tese (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2009.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Virmondés Rodrigues Júnior.
1. Periodontite crônica. 2. ELISA. 3. Citocinas. 4. Tratamento periodontal básico. I. Título. II. Pereira, Sanívia Aparecida de Lima. III. Rodrigues Júnior, Virmondés.
- CDU 616.314

Dedico esta Tese de mestrado a todas as pessoas que amo, especialmente à minha irmã Luciana Fatureto Escobar (*in memoriam*), que, com sua alegria de viver, seu exemplo de luta e capacidade de superação, deixou para mim um legado inestimável.

Expresso aqui minha sincera gratidão:

A Deus, pela minha vida, por minha saúde e por minha capacidade e possibilidade de realizar este trabalho, que tanto me acrescentou na forma de imenso aprendizado.

A meus pais, Neusa Fatureto Escobar e Marco Antônio Escobar, pela companhia e pelo exemplo inestimáveis nesta minha caminhada em busca da construção da minha vida.

A minha orientadora, prof^a. Dr^a. Sanívia Aparecida de Lima Pereira, pela confiança em mim depositada e pela orientação segura na condução deste trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Virmondês Rodrigues Júnior, pelo apoio e pelos ensinamentos no campo da imunologia.

Aos professores Dr. Marcelo Henrique Napimoga, Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira pelo apoio e contribuição que deram ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, colegas, funcionários da UFTM e da UNIUBE, que, de alguma forma, deram sua contribuição para a realização deste trabalho e às pessoas que participaram como voluntárias nesta pesquisa contribuindo, assim, para o desenvolvimento da ciência e para a promoção da saúde.

À Prefeitura Municipal de Uberaba, através da Secretaria de Saúde, que tornou possível a realização de parte importante deste trabalho e, particularmente, à auxiliar de cirurgia dentista Ana Paula Lacerda Grisi Ribeiro, pela colaboração na coleta de material.

À aluna de iniciação científica da UNIUBE, Valéria Bisinoto Gotti, pela atuação no desenvolvimento da pesquisa e aos amigos Betânia Maria Ribeiro e Carlos Alberto Mota Araújo, pelo suporte oferecido no Laboratório de Imunologia da UFTM.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, que é fruto de muito esforço e que reforça a confiança no trabalho honesto, justo e sincero como forma de crescimento pessoal e coletivo.

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros recebidos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Programa de Apoio à Pesquisa da Universidade de Uberaba (PAPE-UNIUBE), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

VI. RESUMO

Pacientes com periodontite crônica (PC) apresentam aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias tanto no soro como no fluido crevicular gengival (FCG). O objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis de IFN- γ , TNF- α e TGF- β no soro e no FCG e comparar os níveis dessas citocinas entre pacientes controles (GC) e com periodontite crônica (PC) antes e após o tratamento periodontal básico (TPB). Foram analisados 20 pacientes com PC e 20 controles. Dados clínicos e radiológicos foram obtidos no momento da coleta do material. O FCG foi coletado utilizando 4 cones de papel absorvente nos locais de maior profundidade de sondagem (PS). Em seguida foi coletado o sangue e centrifugado para obtenção do soro. Nos pacientes PC o FCG e sangue foram coletados antes e 7 dias após o término do TPB. A análise dos níveis de IFN- γ , TNF- α e TGF- β no soro e no FCG foi realizada por ELISA. Foram observados maiores níveis de IFN- γ tanto no soro quanto no FCG de pacientes com PC, quando comparados aos do GC, com diferença significativa ($p < 0,05$). Os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente no FCG após o TPB ($p = 0,0090$). Não houve diferença significativa entre os níveis de IFN- γ no soro antes e após o TPB. Os níveis de TGF- β no FCG estavam significativamente mais elevados no grupo com PC quando comparados ao grupo GC ($p = 0,0342$). Não houve diferença significativa comparando os níveis de TGF- β no FCG antes e após o TPB ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa dos níveis de TNF- α no soro entre os grupos com PC e GC ou comparando o grupo com PC antes e após o TPB. Portanto no FCG os níveis de IFN- γ e de TGF- β foram maiores no grupo com PC, o que poderia estar colaborando para a persistência do quadro inflamatório e destruição tecidual local. Houve aumento dos níveis de IFN- γ no FCG após o TPB, provavelmente devido à resposta imuno-inflamatória transitória decorrente da intervenção clínica, contribuindo para a destruição de periodontopatógenos e resolução da PC.

Palavras - chaves: Citocinas, ELISA, Periodontite crônica, Tratamento Periodontal Básico.

VII. ABSTRACT

Patients with chronic periodontitis (CP) have increased pro-inflammatory cytokines in the serum and gingival crevicular fluid (GCF). The aim of the present study was to assess the relation between clinical parameters and concentrations of IFN- γ , TNF- α e TGF- β within serum and GCF from CP sites and, subsequently, after non surgical periodontal treatment (NSPT) of the CP sites. A total of 40 subjects were divided into 2 groups based on gingival index (GI), pocket probing depth (PPD) and clinical attachment loss (CAL): healthy (HP) and chronic periodontitis (CP). Serum and GCF samples collected from each patient were quantified for IFN- γ , TNF- α e TGF- β using the enzymatic immunosorbent assay (ELISA). The highest mean concentration of IFN- γ was obtained from CP group in both serum and GCF compared to HP group ($P < 0.05$). Interesting, the mean concentration of IFN- γ in GCF increased significantly after 7 days of NSPT. The mean of TGF- β concentrations in GCF for CP were significantly increased when compared to HP ($p < 0.05$), however this difference was not observed in the serum ($P > 0.05$). The levels of TNF- α from serum and GCF in healthy subjects and CP subjects did not showed statistical difference. In conclusion, the mean concentration of IFN- γ and TGF- β was increased in patients with CP suggesting that cytokines were associated with chronic inflammatory process. Also, our results suggest that the NSPT may transitory increase the levels of the IFN- γ , probably due to temporary immunoinflammatory response as a result of the clinical treatment, which promotes the destruction of periodontopathogens and resolution of CP.

Keywords: Cytokines, Chronic Periodontitis, ELISA, Non Surgical Periodontal Treatment

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
I. INTRODUÇÃO.....	01
1. PERIODONTO: CONCEITO.....	01
1.1 Gengiva.....	01
1.2 Ligamento periodontal.....	06
1.3 Cimento.....	07
1.4 Osso alveolar.....	08
2. A DOENÇA PERIODONTAL.....	09
2.1 O papel das citocinas na periodontite crônica (PC).....	12
3. HIPÓTESE.....	19
4. JUSTIFICATIVA	20
5. OBJETIVOS	21
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
III. RESULTADOS.....	39
IV. DISCUSSÃO	56
V. CONCLUSÕES	62
VI. RESUMO	64
VII. ABSTRACT	65
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
IX. ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	Antes do tratamento
B	Branco
BSA	Albumina Sérica Bovina
DT	Depois do tratamento
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio Imunoenzimático
FCG	Fluido crevicular gengival
GC	Grupo Controle
HIV	Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)
IFN- γ	Interferon - gama
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Sintase do Óxido Nítrico induzida
IS	Índice de Sangramento
MMP	Morfo-metaloproteinases
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
NB	Não Branco
NIC	Nível de Inserção Clínica
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC	Periodontite Crônica
PMN	Polimorfonucleares
PS	Profundidade de Sondagem
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante-beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

TPB Tratamiento Periodontal Básico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados no teste de ELISA	32
Tabela 2. Distribuição da idade, do sexo, da cor e do índice de massa corporal em indivíduos com PC e no GC	39
Tabela 3. Comparação dos níveis de PS e NIC entre os grupos PC e GC.....	40
Tabela 4. Classificação dos pacientes quanto ao tipo de periodontite crônica.....	41

LISTA DE FIGURAS

1. Exame clínico periodontal (Sondagem).....	22
2. Exame Radiográfico Periapical.....	23
3. Sonda periodontal Williams® (HUFRIEDY™)	25
4. Cones de papel absorvente número 40 (Endpoints)	26
5. Coleta do FCG com o cone número 40 (Endpoints)	27
6. Armazenamento dos <i>Eppendorf</i>	27
7. Congelamento do FCG e do soro a -70°C.....	28
8. Coleta de sangue.....	29
9. Centrífuga Iuchi ® (Pasolina)	29
10. Aparelho Profi II – ceramic® (Dabi Atlante)	30
11. Digluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard ®).....	30
12. Distribuição das amostras na placa mãe.	31
13. Colocação do Tampão de <i>Coating</i> no recipiente.	33
14. Colocação dos anticorpos de captura nos recipientes.....	33
15. Sensibilização das placas.....	34
16. Placas cobertas com plástico fino Parafilm®.....	34
17. Bloqueio das placas com PBS-BSA 2%.....	35
18. Distribuição das amostras de acordo com a placa mãe	35
19. Máquina <i>Immuno Wash/Model 1575</i> ® (Bio Rad).....	36
20. Diluição dos comprimidos de pNPP e <i>Tris Buffer</i> em água destilada.....	37
21. Máquina <i>Microplate Reader/ Model 3550</i> ® (Bio Rad).....	38

LISTA DE GRÁFICOS

1. Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC	42
2. Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC	42
3. Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC	43
4. Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC	43
5. Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, antes (PC-AT), e após o TPB (PC-DT).....	44
6. Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, antes (PC-AT), e após o TPB (PC-DT).....	44
7. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC ..	45
8. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC	45
9. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes (PC-AT), e após o TPB (PC-DT)	46
10. Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC .	47
11. Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC	47
12. Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC, antes (PC-AT), e após o TPB (PC-DT)	48
13. Níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes do TPB	49
14. Níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG de pacientes com PC, após o TPB	49
15. Níveis de IFN- γ no FCG, dos pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, antes do TPB	50
16. Níveis de IFN- γ no FCG, de pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, após o TPB	50
17. Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC grave localizada, antes e após o TPB	51
18. Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC grave generalizada, antes e após o TPB.....	51

19. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes do TPB	52
20. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave localizada e generalizada, após o TPB	52
21. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave localizada, antes e após o TPB	53
22. Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave generalizada, antes e após o TPB	53
23. Níveis de IFN- γ , no soro de pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes do TPB	54
24. Níveis de IFN- γ , no soro de pacientes com PC grave localizada e generalizada, após o TPB	54

I. INTRODUÇÃO

1. PERIODONTO: CONCEITO

O periodonto (*peri*= em torno de, *odonto*= dente) é composto de tecidos de proteção e de sustentação (SAMPAIO et al., 2005) e compreende os seguintes tecidos: a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar. A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral (LINDHE, 2005).

1.1 Gengiva

É o periodonto de revestimento, também chamado de periodonto de proteção. Das estruturas do periodonto, é a única parte visível clinicamente (HASSELL, 1993).

a) Anatomia macroscópica da gengiva:

A gengiva normal possui coloração róseo-clara e é demarcada coronalmente pela margem gengival livre, e apicalmente pela mucosa alveolar através da junção mucogengival (HASSELL, 1993). É a parte da mucosa bucal que reveste os ossos alveolares e as porções cervicais dos dentes sendo dividida em gengiva livre, interdentária e inserida (LINDHE, 2005).

A gengiva livre possui consistência firme e está situada em torno do dente, inclusive na região interdentária ou na papila (BORGHETTI, 2002). Tanto por vestibular como por lingual, a gengiva livre estende-se a partir da margem gengival até a ranhura gengival livre, que está posicionada em um nível correspondente à junção amelocementária. A ranhura gengival livre está presente apenas em 30 a 40% dos adultos e é mais pronunciada no lado

vestibular dos dentes, ocorrendo com maior frequência na região de incisivos e pré-molares inferiores. Geralmente, a margem gengival livre é arredondada de modo a formar uma pequena envaginação que corresponde ao sulco gengival, o qual está coronal à aderência do epitélio juncional e está limitado, de um lado, pela superfície dentária, e do outro, pelo epitélio sulcular. Sua extensão coronária corresponde à margem gengival (LINDHE, 2005).

A gengiva interdental ou papilar ocupa a ameia gengival, que é o espaço interproximal situado abaixo do ponto de contato. A forma da gengiva interdental é determinada pelo contato entre os dentes, pela largura da superfície proximal e pela anatomia da junção amelocementária (BORGHETTI, 2002). Nas regiões anteriores da dentição, a gengiva interdental tem uma forma piramidal enquanto nos segmentos posteriores da cavidade bucal, onde o contato entre os dentes é mais amplo, a gengiva interdental consiste de duas papilas, uma vestibular e uma lingual conectada por uma área denominada “col”, que é formada por epitélio não queratinizado suscetível a substâncias nocivas aos tecidos periodontais, representando um local predisposto à instalação de periodontite (LINDHE, 2005).

A gengiva inserida é contínua com a gengiva livre e é delimitada na direção coronária pelo sulco marginal (BORGHETTI, 2002) ou ranhura gengival livre (ou, caso não exista, por um plano horizontal que passa ao nível da junção amelocementária) e estende-se em direção apical até a junção mucogengival, onde torna-se contínua com a mucosa alveolar, que é frouxa, móvel, e possui coloração mais avermelhada. A gengiva inserida é firme, resiliente, apresenta cor rósea e frequentemente um pontilhado delicado, caracterizando um aspecto de “casca de laranja” e está firmemente aderida ao periosteio subjacente do osso alveolar. A inserção no osso alveolar e cemento radicular ocorre por meio de fibras do tecido conjuntivo gengival (LINDHE, 2005). No maxilar, a gengiva vestibular é mais larga próximo aos incisivos e mais estreita na região de molares (BORGHETTI, 2002).

b) Histologia gengival:

A gengiva é formada por epitélio, tecido conjuntivo, fibras, células e matriz extracelular e é responsável pela secreção do fluido crevicular gengival (FCG). Além disso, é irrigada por um vasto suprimento sanguíneo e possuindo um sistema de inervação e um sistema de drenagem linfática (LINDHE, 2005).

b1) Epitélio gengival:

O epitélio gengival é dividido em: epitélio bucal, epitélio sulcular e epitélio juncional.

Epitélio bucal

O epitélio bucal reveste a crista e a superfície externa da gengiva livre e inserida, sendo formado por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado dividido em quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e queratinizada. As células produtoras de queratina (queratinócitos) constituem o principal tipo celular do epitélio bucal, que também contém melanócitos e células Langerhans (LINDHE, 2005). Os melanócitos são células que sintetizam pigmentos de melanina, enquanto as células de Langherans desempenham papel importante nos mecanismos de defesa da mucosa bucal (NEWCOMB et al., 1982).

Epitélio sulcular

O epitélio sulcular reveste o sulco gengival e trata-se de um epitélio escamoso estratificado fino, não queratinizado, que se estende desde o epitélio juncional até a crista da margem gengival (TEN CATE, 1998).

Epitélio juncional

O epitélio juncional forma um colar de epitélio estratificado escamoso não queratinizado em torno do dente (LISTGARTEN, 1996).

b2) Fluido crevicular gengival (FCG):

O FCG é uma substância que é eliminada dentro do sulco gengival e é proveniente do tecido conjuntivo gengival. Tem como função limpar o sulco através da lavagem, promover a adesividade ao epitélio pela produção de proteínas plasmáticas, promover atividades antimicrobianas e iniciar a atividade dos anticorpos (LÖE et al., 1999). A transudação do fluido crevicular gengival é o sinal clínico mais precoce de inflamação gengival. O FCG se transforma gradualmente, de um transudato fino e celular para um fluido constituído de soro mais leucócitos (LANG et al., 2009). Na presença de infecções o FCG é um exsudato inflamatório que extravasa da microcirculação para o espaço gengival ou bolsas periodontais em torno dos dentes. Tem um aspecto claro na maioria das vezes, mas dependendo da quantidade de neutrófilos, pode apresentar-se mais opaco e escuro. É composto por soro e produtos da desorganização tecidual, mediadores inflamatórios e anticorpos que atuam contra o biofilme dental (MARTELLO et al, 2005). As áreas inflamadas produzem grande quantidade de FCG em função do aumento da permeabilidade vascular e da ulceração do epitélio da bolsa periodontal. Enzimas derivadas do hospedeiro e seus inibidores, mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro e produtos da degradação tissular são componentes que têm sido analisados sob hipótese de estarem relacionados como possíveis marcadores da progressão da periodontite (ARMITAGE et al., 2005). Portanto, componentes do FCG são utilizados para identificar ou diagnosticar doença

ativa favorecendo o conhecimento prévio do risco de adquirir a doença e determinar sua progressão (CASTRO et al, 2003).

b3) Tecido conjuntivo gengival:

O tecido conjuntivo gengival é o tecido predominante na gengiva. Seus principais constituintes são as fibras colágenas (60% do volume tecidual), fibroblastos (aproximadamente 5%), vasos, nervos e matriz extracelular (aproximadamente 5%) (HASSELL, 1993).

As fibras do tecido conjuntivo são produzidas pelos fibroblastos e podem ser divididas em: fibras colágenas, fibras reticulares, fibras oxitalânicas e fibras elásticas (HASSELL, 1993).

As células do conjuntivo gengival são: fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células inflamatórias (SCHROEDER et al., 1990).

A matriz extracelular do tecido conjuntivo é produzida essencialmente pelos fibroblastos, embora alguns de seus componentes sejam derivados dos mastócitos e do sangue. Seus principais constituintes são glicoproteínas e proteoglicanas (HASSELL et al. 1993).

O suprimento sanguíneo para a gengiva é derivado dos vasos encontrados no periosteio do osso alveolar, também chamados de vasos supraperiosteais. Esse suprimento sanguíneo é dividido em três segmentos: do ligamento periodontal, da gengiva voltada para a cavidade bucal e da gengiva voltada para o dente. A conexão entre os três possibilita a circulação colateral (TEN CATE, 1998).

A inervação gengival é realizada por ramos terminais de fibras nervosas periodontais e por ramos dos nervos infra-orbitário e palatino, ou lingual, mentoniano e bucal (TEN CATE, 1998).

A linfa dos tecidos periodontais é drenada para os nódulos linfáticos da cabeça e do pescoço, entre eles os nódulos linfáticos submentonianos, cervicais profundos e submandibulares (LINDHE, 2005).

1.2 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conectivo frouxo, bastante vascularizado e celular, que envolve as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar. Em direção coronária, o ligamento periodontal é contínuo com a lâmina própria da gengiva e está separado da gengiva por feixes de fibras colágenas que conectam a crista do osso alveolar à raiz (as fibras da crista alveolar) (LINDHE, 2005).

O ligamento periodontal constitui-se de células e de substância intercelular fibrosa (FREEZER e SIMS, 1987). As células mais numerosas são os fibroblastos (35%). As células ósseas, cementárias, mesenquimais indiferenciadas e epiteliais correspondem a apenas 2,44% (FREEZER e SIMS, 1987). Os fibroblastos constituem a maior população de células do ligamento periodontal sendo responsáveis pela síntese e degradação das fibras colágenas e de componentes da substância fundamental amorfa, processo mais intenso em áreas adjacentes ao tecido ósseo (MCCULLOCH et al., 2000). A substância intercelular fibrosa é formada por fibras colágenas, fibras elásticas e pela substância fundamental (TEN CATE, 1998).

As fibras colágenas suportam grandes tensões, porém, sem ter caráter elástico de distensão. Os feixes de fibras são agrupados em: grupo apical, grupo interradicular, grupo oblíquo, grupo horizontal e grupo da crista alveolar (TEN CATE, 1998).

As fibras elásticas, como o próprio nome diz, são capazes de sofrer distensão quando estão sob tensão e ao retirar a força retornar ao estado original.

A substância fundamental é uma matriz amorfa, de origem mesodérmica, com aspecto gelatinoso, onde estão imersos os componentes celulares e fibras do ligamento

periodontal (substância intercelular fibrosa), sendo sintetizada por fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos e odontoblastos (TEN CATE, 1998).

São quatro as funções físicas do ligamento periodontal, sendo elas a transmissão das forças incidentes na região oclusal para o osso e resistência ao impacto; manutenção dos tecidos gengivais e sua relação com as estruturas dentais; manutenção do dente em sua loja óssea e proteção de vasos e nervos presentes em sua estrutura (CARRANZA JR.; UBIOS, 1997). Devido à inserção de fibras em sua estrutura, o osso alveolar é constantemente formado e remodelado graças às forças físicas aplicadas nos elementos dentais. Desta forma, após a perda do elemento dental, cessam os estímulos mecânicos sobre as paredes ósseas alveolares e ocorre a perda do volume ósseo na área.

A irrigação do ligamento periodontal é proveniente das artérias alveolares superior ou inferior, as quais emitem ramificações dentais e dão origem às artérias intraseptais. Além de percorrerem o ligamento, estas artérias penetram no interior dos ossos maxilares (LINDHE, 2005).

A inervação do ligamento periodontal é realizada por quatro terminações nervosas: as terminação nervosas livres, terminações associadas a corpúsculos de Ruffini, terminação espiralada e terminação fusiforme. Não parece haver evidência de suprimento nervoso parassimpático no ligamento periodontal (TEN CATE, 1998; BERKOVITZ et al., 1995).

1.3 Cimento

O cimento é um tecido conjuntivo calcificado que reveste externamente a raiz dos dentes, cuja principal função é inserir as fibras do ligamento periodontal à superfície radicular. Bioquimicamente, o cimento é composto por matriz inorgânica, composta por cerca de 50% de hidroxiapatita, e de uma matriz orgânica, composta, predominantemente, de colágeno tipo I (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1977).

O cimento na superfície da raiz aumenta de espessura pela aposição gradual ao longo da vida, partindo de 50µm na faixa etária de 11 a 20 anos, enquanto na idade de 70 anos aumenta para 130 µm (HOLMSTRUP, 2001).

A reabsorção do cimento pode ocorrer devido a causas sistêmicas e locais, como trauma de oclusão, movimento ortodôntico, pressão de dentes mal posicionados em erupção, dentes reimplantados, doença periapical e periodontite, deficiência de vitamina D e A, deficiência de cálcio, hipotireoidismo, doença de *Paget*, ou pode ocorrer sem etiologia aparente. O cimento pode ser reparado se a intensidade da pressão é reduzida e se o tecido conjuntivo circundante permanecer intacto (HOLMSTRUP, 2001).

1.4 O osso alveolar

O osso alveolar consiste dos dois ossos maxilares, ou seja, o osso da maxila e o da mandíbula, quando abrigam os alvéolos dentais em sua estrutura. A manutenção do osso alveolar depende da presença do elementos dentais e da estimulação que estes provocam nas paredes ósseas por meio das fibras colágenas. O osso alveolar apresenta a lâmina dura é um tecido ósseo compacto sem trabéculas ósseas, o que lhe confere o aspecto radiopaco. Apresenta fibras colágenas extrínsecas mineralizadas perifericamente denominadas fibras de Sharpey (TEN CATE, 1998).

2. A DOENÇA PERIODONTAL

Envolve as doenças do periodonto de proteção (gingivite) e do periodonto de sustentação (periodontite).

A gingivite acontece pela exposição do tecido gengival ao biofilme dental, resultando na inflamação do mesmo. A gengiva torna-se avermelhada, brilhante com aumento de volume. A consistência torna-se diminuída e com tendência a sangramento (HAFFAJEE et al., 1999). A gingivite é uma doença reversível, voltando à normalidade, após um programa efetivo de controle de biofilme bacteriano (LÖE et al., 1999).

Já a periodontite é um processo complexo e multifatorial onde a interação dos componentes do biofilme dental e os mecanismos de defesa do hospedeiro determinam a instalação e a progressão da doença. Está bem documentado que a causa primária de periodontite é o acúmulo permanente de biofilme dental na interface dentogengival, que atrai infiltrado leucocitário desencadeando destruição de tecido conjuntivo, reabsorção do osso alveolar e formação de bolsas periodontais. Esta resposta tecidual é caracterizada por apresentar leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e acúmulo linfocitário. Essas células secretam mediadores inflamatórios e citocinas que determinam a imunopatogênese da periodontite (SKALERIC et al., 1997).

A periodontite é uma doença, geralmente crônica, provocada pela infecção de microrganismos Gram negativos e resposta inflamatória do hospedeiro (AZUMA, 2006; EMINGIL et al, 2006), acometendo grande parte da população mundial. Esses periodontopatógenos se acumulam sobre os dentes, na forma de colônia bacteriana, chamada antigamente de placa bacteriana ou atualmente de biofilme dental, provocando necrose dos tecidos de proteção e sustentação. Quando não diagnosticada e tratada corretamente pode levar à perda dos dentes (EMINGIL et al, 2006).

As principais características da periodontite crônica (PC) são: mais prevalente em adultos, mas pode ocorrer em crianças e adolescentes; a quantidade de perda óssea é compatível com a quantidade de fatores locais; cálculo subgingival é um achado comum; padrão microbiano variado; progressão lenta a moderada, mas pode ter períodos de progressão rápida; pode estar associada a fatores predisponentes locais, tais como fatores iatrogênicos; pode ser modificada e/ou associada a doenças sistêmicas, como a diabetes e a infecção por HIV. É designada como localizada, caso afete 30% dos sítios da boca, e generalizada, quando afeta acima de 30% de sítios. É chamada de leve, quando a perda de inserção clínica (NIC) é de 1 a 2 mm; de moderada, de 3 a 4mm e de severa ou grave, quando é igual ou superior a 5mm. (CONSENSUS REPORT, 1999; PARAMETERS ON CHRONIC PERIO, 2000 a,b).

O desenvolvimento da PC depende da interação entre a microbiota oral residente no biofilme dentogengival e a resposta do hospedeiro. As bactérias colonizam e invadem o tecido periodontal e o hospedeiro utiliza uma variedade de mecanismos de defesa para manter um equilíbrio dinâmico com a flora microbiana oral residente. Como um resultado dessas interações entre as bactérias e o hospedeiro, uma seqüência de mecanismos imunes é ativada, mesmo às custas de danos aos tecidos periodontais. A maioria dos danos ao tecido é causada pela resposta do hospedeiro à infecção, levando à degradação do tecido conjuntivo (ALPAGOT et al., 2008).

Evidências baseadas em estudos microbiológicos, imunológicos e clínicos têm demonstrado que algumas formas da periodontite em adultos podem se manter estáveis por muitos anos, enquanto em outras formas, apesar de tratamento extenso, continua a progredir, levando finalmente à perda dentária. A suscetibilidade do paciente é de fundamental importância para o desenvolvimento da periodontite e, apesar das bactérias periodontais serem os agentes etiológicos principais, a resposta imune do hospedeiro a essas bactérias é de fundamental importância (SEYMOUR; GEMMELL, 2001).

Nas lesões periodontais encontra-se frequentemente infiltrado de células inflamatórias contendo linfócitos e macrófagos. Estudos sugerem que os linfócitos T são as células predominantes nas lesões estáveis, enquanto os linfócitos B e plasmócitos estão aumentados em número nas lesões progressivas. Isso sugere que células T secretoras de citocinas Th₁ são as principais reguladoras da inflamação nas lesões iniciais ou estáveis (TSAI et al., 2007)

A PC é uma infecção local de baixa intensidade associada com reação sistêmica moderada. Pacientes que sofrem das formas graves dessa doença parecem ter uma perturbação na homeostase sistêmica (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). Nem todos os pacientes com PC manifestam as mesmas respostas sistêmicas. Acredita-se que a resposta sistêmica individual à PC possa ser modulada por diferentes fatores genéticos (polimorfismo) e ambientais como tabagismo ou obesidade (D'AIUTO et al., 2004). Entre as manifestações sistêmicas estão: aumento dos níveis séricos de proteína C-Reativa, IL-1 e IL-6; hiper-fibrinogenemia e leucocitose moderada (LOOS et al., 2000; SLADE et al., 2000; LALLA et al., 2007).

O papel patogênico da microbiota subgingival na iniciação e na progressão da PC é largamente aceito. Os patógenos periodontais afetam local e sistemicamente as respostas imune e inflamatória. A resposta inflamatória local às bactérias Gram-negativas ou produtos bacterianos é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias nos tecidos periodontais, incluindo PMN neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Alguns indivíduos respondem à agressão microbiana com liberação de altas concentrações de mediadores inflamatórios como as PGE₂, IL-1 e TNF- α . Estas citocinas estão envolvidas na destruição do tecido conjuntivo periodontal e do osso alveolar, podendo iniciar uma resposta sistêmica de fase aguda (NOACK et al., 2001).

Diversas citocinas e fatores de crescimento, produzidos e liberados por células inflamatórias, desempenham papel importante na destruição tecidual e, conseqüentemente, na

progressão da PC, apesar de serem fundamentais para o reparo e a regeneração dos tecidos lesados pela doença (CEZÁRIO; FIGUEIREDO, 2004).

2.1 O papel das citocinas na periodontite crônica (PC)

A partir do final dos anos 1980 evidenciou-se que a produção local e o acúmulo de mediadores inflamatórios é o principal mecanismo responsável perda de inserção periodontal e pela perda óssea (TONETTI, 2009).

Estudos de hibridização *in situ* de estratos teciduais e FCG sugeriram que a saúde periodontal era caracterizada por baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e por níveis aumentados de inibidores teciduais de metaloproteinases e citocinas que suprimem a resposta imuno-inflamatória (TGF- β) (PAGE et al., 1991).

Citocinas são reguladores celulares que têm uma influência importante na produção e ativação de diferentes células efetoras. Estas células se dividem em subgrupos; dentre estes subgrupos estão as células Th1, Th2 e Treg que de acordo com as suas funções, são correlacionadas com a suas citocinas distintas. Células Th1 secretam IFN- γ e TNF- α e predominam em reações inflamatórias mediadas por células. Células Th2 secretam IL-4, que ajudam a produção de anticorpos e desempenham um papel proeminente nas respostas anti-helmínticas e alérgicas (SUÁREZ et al., 2004). Células T reguladoras (Treg) secretam citocinas, como o TGF- β , que regulam a indução e a atividade das células T efetoras controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009). Células T e macrófagos são uma fonte importante de produção de citocinas apesar de serem secretadas por várias células que desempenham papéis importantes em muitas respostas fisiológicas. Por exemplo, quando macrófagos são ativados, expressam complexos de histocompatibilidade de classe II tais como HLA-DR que lhes permitem apresentar antígenos aos linfócitos T. As células T são ativadas quando elas se ligam a esses antígenos processados e apresentados pelos macrófagos.

A ativação de células T resulta na secreção de citocinas, incluindo IFN- γ e TNF- α , que amplificam a resposta inflamatória (ROSS, 1999).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular envolvidas na iniciação e estágios efetores da imunidade e da inflamação, nos quais regulam a amplitude e a duração da resposta. São usualmente produzidas de forma temporária e extremamente potentes, geralmente agindo em concentrações picomolares, interagindo com receptores específicos da superfície celular, que são geralmente expressos em números relativamente baixos (BALKWILL; BURKE, 1989). Algumas citocinas são produzidas por um tipo específico de célula, assim como, a IL-2 é produzida por células T, enquanto outras, incluindo a IL-1 e IL-6, são produzidas por vários tipos de células. As células alvo, também podem ser restritas ou diversas. Muitas citocinas são pleiotrópicas, possuindo múltiplas atividades em diferentes células alvo e/ou ações recorrentes sobre reguladores celulares (HAMBLIN, 1993). A resposta de uma célula a uma certa citocina depende da concentração local, do tipo de célula e de outros reguladores celulares a que ela está constantemente exposta. As citocinas interagem em uma rede: primeiro, induzindo a si próprias; segundo, transmodulando os receptores de superfície celulares; e terceiro, por interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas nas funções celulares (BALKWILL; BURKE, 1989). A maioria das respostas imunes ocorre localmente ao invés de sistemicamente, limitada a uma pequena área tecidual e, frequentemente, entre duas células que são conjugadas uma à outra (MOSMANN, 1991). A partir da descoberta da IL-2 em 1976, mais de vinte citocinas foram caracterizadas como sendo essenciais para muitas das funções de proliferação e diferenciação das células imunes (SEYMOUR; GEMMELL, 2001).

As citocinas avaliadas em nossa pesquisa são: TNF- α , TGF- β e IFN- γ . A seguir, serão detalhadas suas características e funções.

TNF- α

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente nos estágios precoces de inflamação aguda (IWAMOTO et al., 2003), estimulando a reabsorção e inibindo a formação óssea (SHIMA, 2000).

TNF- α desempenha papel decisivo na resistência a uma vasta gama de microrganismos patogênicos, contribuindo tanto para as respostas imunes inatas como para as adaptativas (GRAVES; COCHRAN, 2003). Esta citocina age em várias fases dos mecanismos de recrutamento do leucócito, induzindo o aumento de produção de moléculas de adesão e a produção de quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMP) (PFIZENMAIER et al., 1996; DINARELLO, 2000). Além disso, TNF- α estimula a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas co-estimulatórias e a atividade bactericida dos fagócitos (GARLET et al., 2006).

Macrófagos podem ser estimulados por TNF- α a produzirem óxido nítrico (NO), um radical anti-microbiano altamente reativo, que é derivado da L-argenina e oxigênio molecular numa reação catalisada pela enzima iNOS (CHAKRAVORTTY; HENSEL, 2003; GARLET et al., 2006).

Monócitos circulantes produzem citocinas como o TNF- α , especialmente na presença do alto fluxo sanguíneo existente no tecido gengival inflamado (LALLA et al., 2007).

Várias citocinas estão envolvidas na resposta imune Th1. Estas incluem: IFN- γ e TNF- α (BELARDELLI e FERRANTINI, 2002). A fagocitose das partículas de hidroxapatita (HA) por monócitos humanos em áreas enxertadas leva à liberação de TNF- α , citocina envolvida na ativação osteoclástica (LAQUERRIERI et al., 2003; OROZCO et al., 2007).

TGF- β

TGF- β pode atuar tanto na cicatrização quanto na destruição tecidual (FAVA et al., 1991). A presença de TGF- β em sítios com infecção e inflamação pode levar ao recrutamento, à aderência e à atividade dos leucócitos (ADAMS et al., 1991). O TGF- β é identificado em sítios inflamatórios crônicos e demonstra apresentar propriedades pró-inflamatórias, promovendo quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e linfócitos (LIN et al., 2000; SUAREZ et al., 2004).

TGF- β é um peptídeo multifuncional envolvido no desenvolvimento embriológico, cicatrização de feridas, progressão de tumores, inflamação e regulação imune (SKALERIC et al., 1997). Sua principal fonte são as plaquetas, mas os monócitos/macrófagos, células endoteliais e fibroblastos também liberam este fator de crescimento (BUDUNELI et al., 2001). É uma citocina bem conhecida por seus efeitos potenciais no reparo, regeneração e na regulação de metaloproteinases de matriz, as quais mediam o colapso do tecido conjuntivo. TGF- β inibe a liberação de procólagenase e suprime a produção de colagenase por fibroblastos e macrófagos (PAGE, 1991; ALPAGOT et al., 2008). Além disso, ativa diretamente a expressão gênica para a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo as proteínas colágenas (HEFTI, 1999; BUDUNELI et al., 2001). O TGF- β também aumenta a fibrogênese, sendo importante na cicatrização que acompanha a inflamação crônica (ADAMS et al., 1991). Entretanto, foi identificado em sítios de inflamação aguda e crônica com propriedades pró-inflamatórias tais como a promoção de quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos e aumento da expressão de integrina e adesão leucocitária ao endotélio e a matriz extracelular. Este recrutamento e a ativação exageradas de leucócitos pode levar a lesões crônicas destrutivas (SKALERIC et al., 1997). Sendo assim, o TGF- β pode atuar tanto na cicatrização quanto na destruição tecidual (CEZÁRIO; FIGUEIREDO, 2004).

Na lesão inflamatória, células mononucleares são estimuladas por altos níveis de TGF- β a secretarem outras citocinas pró-inflamatórias importantes na rede de moléculas reguladoras da resposta do hospedeiro a microorganismos e na defesa imunológica. Dessa forma, foi demonstrado que os monócitos liberam TGF- β após a exposição aos lipopolisacarídeos bacterianos. Especificamente, os produtos da parede celular de *Fusobacterium nucleatum*, uma das bactérias envolvidas na evolução da gengivite e da PC, desencadearam o aumento de níveis de mRNA de TGF- β e a secreção de peptídeos pelos monócitos sanguíneos periféricos.

Os microorganismos periodontopatogênicos têm sido mostrados como indutores da produção de TGF- β por fagócitos mononucleares *in vitro*. Esta citocina também foi encontrada em tecidos gengivais obtidos de pacientes com gengivite e PC. Usando imunohistoquímica, o TGF- β foi identificado intracelularmente em estágios precoces da inflamação, e extracelularmente, no tecido gengival obtido de pacientes com PC avançada. Estas observações sugerem que o TGF- β possa estar envolvido tanto na inflamação precoce como em aspectos destrutivos crônicos da PC (SKALERIC et al., 1997).

O TGF- β poderia agir diretamente em células T potencialmente patogênicas para inibir sua diferenciação e função efetora, ou para induzir sua diferenciação em células Treg Foxp3⁺, ou uma combinação de ambos (THOMPSON e POWRIE, 2004).

No estudo de Buduneli et al. (2001), avaliou-se a quantidade de TGF- β 1 no FCG de pacientes tratados com Ciclosporina A e notou-se aumento dessa citocina nos sítios com gengivite quando comparados aos sítios saudáveis, mostrando sua relação com o processo inflamatório. De acordo com Skaleric et al. (1997), sítios com inflamação moderada e severa podem apresentar níveis elevados de TGF- β no FCG. Cardoso et al. (2008) também encontraram expressão elevada de citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β em tecidos periodontais doentes. O TGF- β 1 foi encontrado em todas as amostras de FCG de 10 humanos

pesquisados, em níveis variando de 49.5 a 868.6 ng/ml. A medida das concentrações de TGF- β_1 revelou uma correlação significativa entre a profundidade de sondagem e o TGF- β_1 . Níveis significativamente aumentados de TGF- β_1 foram detectados nas amostras de fluido de bolsas mais profundas. Esta correlação está de acordo com resultados anteriores, nos quais a quantidade aumentada de proteína foi demonstrada através de imunohistoquímica no tecido gengival de pacientes com periodontite mais avançada. Leucócitos constituem cerca de 47% das células somáticas no sulco gengival e migram constantemente dos vasos dentogengivais para o sulco de gengivas saudáveis ou cronicamente inflamadas. O número de leucócitos no FCG aumenta com a intensificação da inflamação gengival (SKALERIC et al., 1997). Foi demonstrado que as células polimorfonucleares representam uma fonte importante de TGF- β_1 . Anteriormente, observou-se que monócitos humanos, após a ativação com *Fusobacterium nucleatum* liberaram níveis aumentados de TGF- β . Pode-se então dizer que o acúmulo de biofilme a longo prazo na área dentogengival representa um desafio constante para a atração leucocitária, degranulação, e liberação de TGF- β no FCG. Além disso, níveis aumentados de TGF- β no FCG recrutam leucócitos adicionais, já que a citocina foi demonstrada como sendo quimiotática para neutrófilos e monócitos (SKALERIC et al., 1997).

IFN- γ

IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, envolvida tipicamente em respostas do tipo Th1, que produzem IFN- γ , induzindo imunidade celular e à produção de citocinas pró-inflamatórias (TAKAHASHI et al., 2005), podendo contribuir para sustentar as reações inflamatórias através da sobre-regulação da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (SEDGWICK et al., 2000; VADAY et al., 2001; GARLET et al., 2006).

IFN- γ é essencial para o desencadeamento da atividade microbicida dos macrófagos, como também para promover a subsequente imunidade do tipo Th1 (PAGE et al., 1991).

A produção de IFN- γ pode aumentar a fagocitose de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos, inibindo a progressão da infecção (TSAI et al., 2007).

A combinação das citocinas IL-18 e IL-12 pode aumentar sinergicamente as concentrações de IFN- γ , a partir de células *natural killer* (NK) e células T (LOTZE et al., 2002), induzindo à atividade osteoclástica de reabsorção óssea (YAMADA et al., 2002; OROZCO et al., 2007).

Estudos concluíram que citocinas Th1, como o IFN- γ , seriam as predominantes em lesões de periodontite crônica (PC) (TSAI et al., 2007).

3. HIPÓTESE

Existe aumento dos níveis de TNF- α , IFN- γ e diminuição dos níveis de TGF- β no soro e no fluido crevicular gengival (FCG) nos pacientes com periodontite crônica (PC), quando comparados com o grupo-controle (GC). Nos pacientes com PC, existe diminuição dos níveis de TNF- α , IFN- γ e aumento dos níveis de TGF- β após o tratamento periodontal básico (TPB).

4. JUSTIFICATIVA

A compreensão do comportamento das citocinas TNF- α , IFN- γ e TGF- β frente à PC poderia contribuir no aprimoramento de terapias que visem a melhora ou resolução clínica da PC.

5. OBJETIVOS

1. Comparar os níveis de TNF- α , IFN- γ e TGF- β entre os indivíduos com e sem PC.
2. Avaliar os níveis de TNF- α , IFN- γ e TGF- β no soro e no FCG nos indivíduos com PC, antes e após o TPB.
3. Comparar os níveis de IFN- γ e TGF- β , antes e após o TPB, no soro e no FCG.
4. Comparar os níveis de IFN- γ e TGF- β nos pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, no FCG e no soro, antes e após o TPB.

II. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto CAAE n° 0030.0.227.000-06 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba sob o n°.: 0033/06-CEP-UNIUBE (Anexo 1).

Os pacientes foram selecionados durante atendimento público de periodontia, realizado na Unidade Básica de Saúde “Randolfo Borges”, pertencente à Secretaria de Saúde do município de Uberaba-MG, sob autorização prévia dessa unidade (Anexo 2). Foram incluídos pacientes que estavam conscientes da pesquisa e que aceitaram assinar o termo de consentimento livre após esclarecimento (Anexo 3). Foi realizada anamnese dos pacientes, obtendo dados relativos a doenças pré-existentes, tabagismo, sedentarismo e uso de medicamentos. A veracidade das respostas e a aceitação do Tratamento Periodontal Básico (TPB) proposto, para aqueles que apresentavam PC, foram confirmadas mediante assinatura do paciente. Em seguida, foi realizado exame clínico periodontal (Figura 1), preenchimento do periograma e exame radiográfico periapical de todos os dentes (Figura 2). Posteriormente, os pacientes foram pesados e medidos, para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), objetivando eliminar pacientes com obesidade.

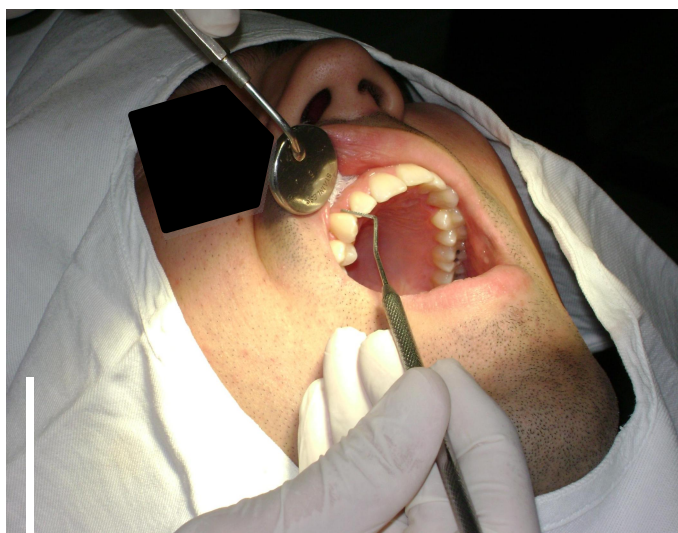


Figura 1: Exame clínico periodontal (Sondagem).

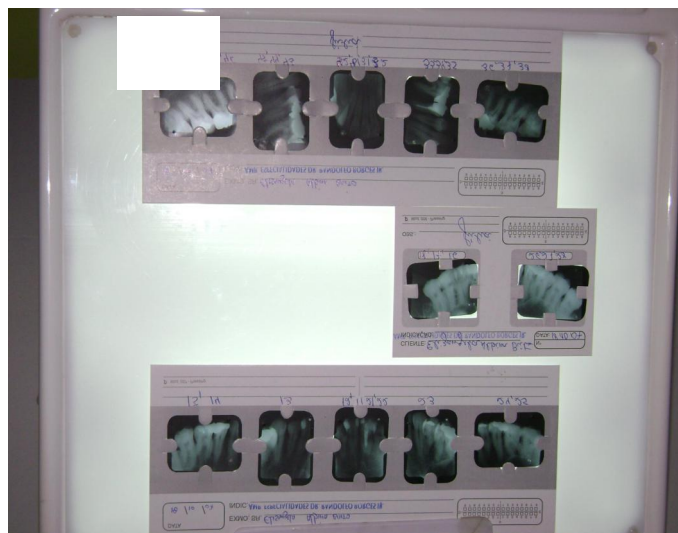


Figura 2: Exame Radiográfico Periapical

Foram selecionados 40 pacientes sendo subdivididos em pacientes com periodontite crônica (PC) (n=20) e pacientes-controle, sem periodontite crônica (GC) (n=20). O número de pacientes com PC encontra similares na literatura, havendo trabalhos que avaliaram o FCG de 17 pacientes com PC (TSAI et al., 2007) e mesmo com 15 (IWAMOTO et al., 2003).

Os pacientes com PC e GC estavam homogeneizados com relação ao sexo, à cor e à idade.

✓ Critérios de inclusão:

- Para o grupo com periodontite crônica (PC):

Os pacientes deveriam apresentar, no mínimo, 15 dentes naturais, sendo pelo menos 10 posteriores, excluindo terceiros molares; apresentar periodontite moderada ou acentuada, com perda do nível de inserção clínica (NIC) de 3 a 4mm (moderada) ou $>$ ou $=$ a 5mm (grave), em, pelo menos, um sítio ou dente por sextante, critério este que foi observado em outros estudos (EBERSOLE; TAUBMAN, 1994; TSAI et al., 2007).

Em casos de periodontite, tem sido recomendado que a gravidade seja categorizada com base na quantidade de perda de inserção, como segue: discreto = 1-2mm; moderado = 3-

4mm; e grave = igual ou superior a 5mm de perda clínica de inserção. Essa perda é mensurada com uma sonda periodontal e a medida é a distância compreendida entre o limite cemento/esmalte e a base do sulco gengival (ARMITAGE, 2002). Sendo assim, em nossa pesquisa, os pacientes se caracterizam como portadores de periodontite grave. Ainda assim, tem sido recomendado que a periodontite seja considerada localizada se até 30% dos dentes estiverem afetados; e generalizada, se mais de 30% dos dentes, estiverem envolvidos (ARMITAGE, 2002). Em nosso trabalho, foram incluídos pacientes portadores de periodontite localizada e generalizada. Outro critério de inclusão foi a presença de sangramento gengival em, pelo menos, um sítio ou dente por sextante e perda óssea detectada no exame radiográfico. O índice de placa (a medida visual da quantidade de biofilme supragengival acumulado em um sítio) não está claramente associado com os sinais clínicos da periodontite crônica (PC) (CHAMPAGNE et al., 2003) e, portanto, não foi utilizado no presente estudo.

- Para o grupo controle (GC):

Apresentar, no mínimo, 15 dentes naturais e todos os dentes com profundidade de sondagem de 0 a 2mm, sem sangramento gengival e sem perda óssea ao exame radiográfico periapical.

- ✓ Critérios de exclusão:

Apresentar alguma doença sistêmica, leucocitose e hiperglicemia detectadas no hemograma (Anexo 4), ser fumante, fazer uso de antibióticos ou anti-inflamatórios ou ter sido submetido a tratamento periodontal, no mínimo, 6 meses antes do estudo. A ativação da inflamação sistêmica resulta na elevação crônica de mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda, as quais são observadas, também no diabetes, na doença coronariana cardíaca, no

tabagismo e na periodontite (SOUTHERLAND et al., 2006). Sendo assim, estas alterações patológicas poderiam interferir na quantidade de citocinas avaliadas.

Exame radiográfico e clínico periodontal:

Os exames radiográfico e clínico-periodontal (Anexo 5) foram realizados por um único periodontista. O exame clínico periodontal foi realizado utilizando sonda periodontal Williams® (HUFRIEDY™, Chicago, IL, USA) (Figura 3), com um diâmetro de ponta de 0.45mm (LALLA E., 2007), em seis sítios por dente: méso-vestibular; vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e méso-lingual. Através do exame periodontal, foi possível obter a profundidade de sondagem (PS) em 6 sítios por dente. A PS é a distância, em milímetros, da margem mais coronal da gengiva livre à penetração mais apical da sonda (TSAI et al., 2007). O nível de inserção clínica (NIC) é a distância, em milímetros, da junção cimento-esmalte à penetração mais apical da sonda (TSAI et al., 2007).



Figura 3: Sonda periodontal Williams® (HUFRIEDY™)

Coleta e centrifugação do FCG:

O FCG pode fornecer um indicador do *status* imuno/inflamatório de cada paciente (CHAMPAGNE et al., 2003). Nos pacientes com PC, a coleta do FCG ocorreu nos sítios onde a PC era mais grave e com PS mais profunda. A seleção dos sítios para a coleta do FCG apresenta divergências em outros trabalhos, mas, em geral, concorda-se que um ou dois sítios por quadrante seria uma amostra representativa de cada paciente (CHAMPAGNE et al.,

2003). Em nosso trabalho, o FCG foi colhido em quatro sítios para atingir a quantidade suficiente. Após o TPB desses pacientes, realizado pelo mesmo periodontista que os examinou e que durou em média 3 sessões (1 por semana), foi feita uma segunda coleta de FCG. Os dentes selecionados foram isolados com gaze estéril e os sítios de coleta foram secados delicadamente com seringa de ar. Foram colocados 4 cones de papel (*Endpoints*), número 40 (Figuras 4 e 5), isoladamente em cada sítio de coleta, permanecendo 30s cada um. Esta quantidade de cones de papel número 40 foi estabelecida através de um piloto. Neste piloto, determinou-se que 4 cones, número 40, absorveram proteína suficiente para detecção. Os cones contaminados com sangue ou saliva foram desprezados. Esses cones foram colocados em *Eppendorf* (Figuras 6 e 7) contendo 0,5 ml de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), solução tampão, pH 7,2, composta de 1,9g de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4); 5,1g de Fosfato de sódio (Na_2HPO_4); 42,5g de Cloreto de sódio (NaCl) e 500 ml de água ultrapurificada, destilada em aparelho Milli Q[®] (Millipore). Esta solução de PBS também foi utilizada em outros estudos (TSAI et al., 2007). Tanto os *Eppendorf* quanto a solução PBS estavam estéreis. Em seguida foram congelados a -70°C .

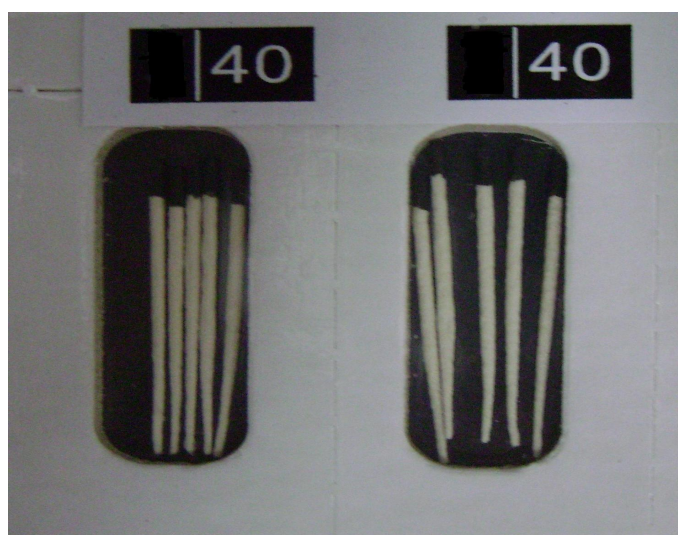


Figura 4: Cones de papel absorvente número 40 (Endopoints)



Figura 5: Coleta do FCG com o cone número 40 (Endpoints)

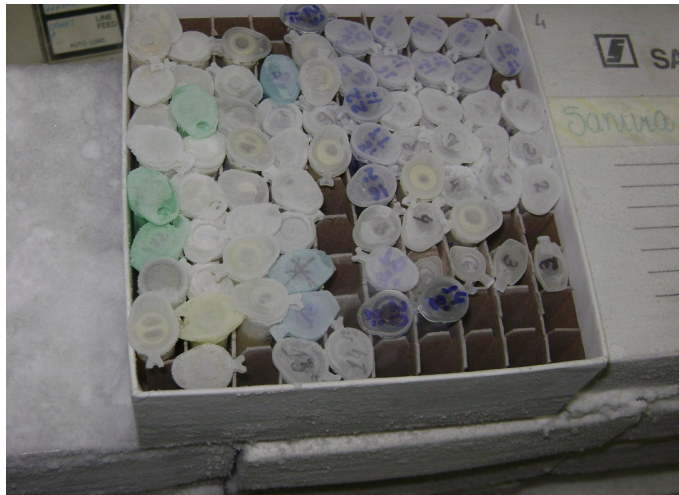


Figura 6: Armazenamento dos *Eppendorf*



Figura 7: Congelamento do FCG e do soro a -70°C

Coleta e centrifugação do sangue:

Para a coleta do sangue o braço do paciente foi garroteado (Figura 8). Posteriormente, selecionou-se uma veia adequada, sendo realizada antisepsia do local com álcool 70% de forma circular e de dentro para fora.

Foram colhidos dois tubos de sangue nos pacientes do grupo PC, na ocasião ainda não tratados, sendo que um foi utilizado para realização de hemograma (3 ml) e outro para o teste *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA R&D System Inc., MN, USA) (2 ml). O hemograma foi realizado para auxiliar no diagnóstico de algumas doenças sistêmicas como doenças infecciosas e diabetes. Estes pacientes encontravam-se em jejum de oito horas, para efetividade do exame de glicemia. Após realização do TPB, coletou-se outro tubo de sangue (3ml), sendo este material destinado apenas para o teste ELISA.



Figura 8: Coleta de sangue

Para realização do ELISA, o sangue foi centrifugado em centrífuga Iuchi® (Pasolina) (Figura 9), a 1500 r.p.m (rotações por minuto), por dez minutos. Em seguida, foi retirado 1,5 ml do soro, colocado em *Eppendorf* estéril e congelado a -70°C .



Figura 9: Centrífuga Iuchi ® (Pasolina)

Tratamento periodontal básico (TPB):

Os indivíduos do grupo PC receberam o TPB, consistindo de raspagens e alisamento radiculares, utilizando o aparelho Profi II-ceramic® (Dabi Atlante) (Figura 10). Realizou-se controle químico com Digluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard®) (Figura 11), administrado na forma de bochechos com 15ml de solução durante 1 minuto antes de cada intervenção do TPB.



Figura 10: Aparelho Profi II-ceramic® (Dabi Atlante)



Figura 11: Digluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard®).

Após o término do TPB foram realizadas novas coletas de FCG e de sangue total para verificação dos resultados dos níveis das citocinas no FCG e no soro após o TPB.

A coleta de FCG e do soro foi realizada no início e sete dias após o término do TPB. Este período é aparentemente curto, porém, um acompanhamento mais longo poderia levar à reinfecção e/ou diluir o efeito sistêmico da terapia periodontal (TPB) oferecida (LALLA et al., 2007). Isto explica o motivo de não colhermos o FCG 1 mês ou mais após o término do TPB como vimos em outros estudos (TSAI et al., 2007).

Preparação da Placa Mãe

O FCG foi centrifugado a 5000 r.p.m por 15 minutos a 4°C. Em cada poço da placa destinada à preparação da placa mãe, foram colocados 300µl de amostra, seja de FCG ou soro e realizado o mapa para ELISA (Figura 12).

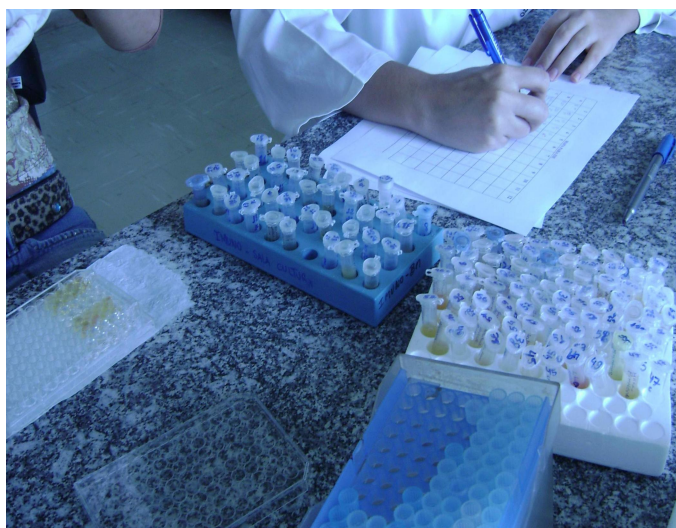


Figura 12: Distribuição das amostras na placa mãe

Quantificação das citocinas do soro e do FCG:

Para a quantificação das citocinas do soro e do FCG, primeiramente, foi realizada a sensibilização das placas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α , anti-IFN- γ ou anti-TGF- β (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados no teste de ELISA

ANTICORPOS	DILUIÇÃO	FABRICANTE	CÓDIGO
Anticorpo monoclonal humano Anti-TNF- α	1:250	BD	555212
Anticorpo monoclonal humano Anti-IFN- γ	1:250	BD	555142
Anticorpo monoclonal humano Anti-TGF- β .	1:500	R&D	MAB240

Realizou-se uma mistura de 20 ml de Tampão de *Coating* (Figura 13) e 80 μ l de anticorpo (Figuras 14 e 15) – mudando apenas para o TGF- β , que foi de 40 μ l. Em cada poço foram colocados 100 μ l da solução e a placa foi coberta com plástico fino (Parafilm®) (Figura 16) e incubada *overnight* a 4°C.

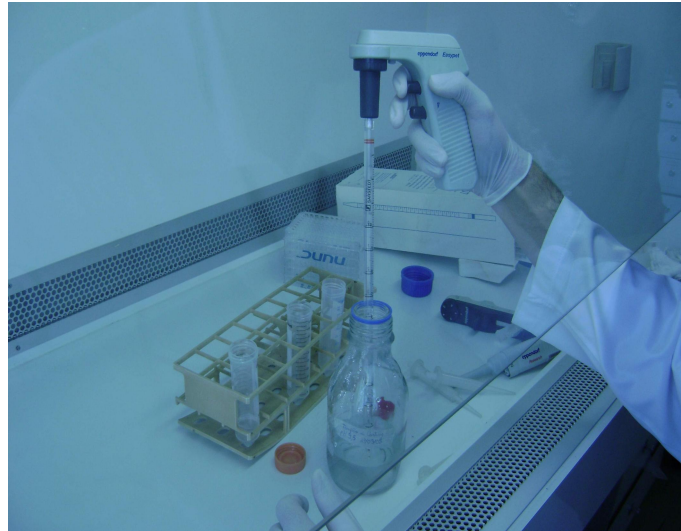


Figura 13: Colocação do tampão de *Coating* no recipiente

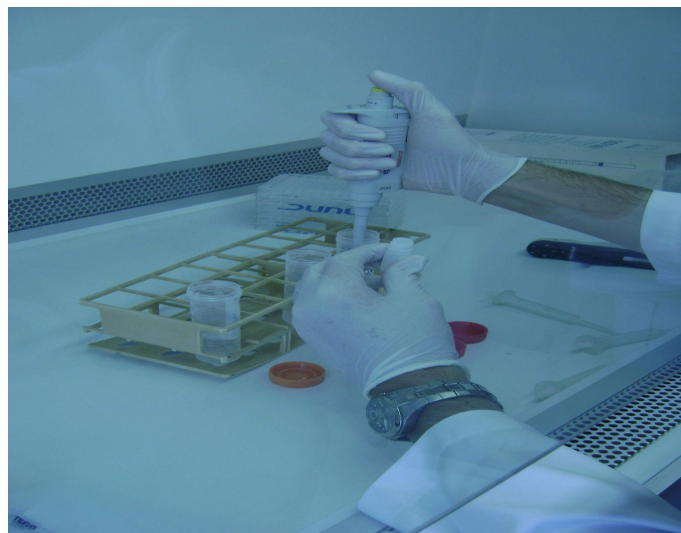


Figura 14: Colocação dos anticorpos de captura nos recipientes.

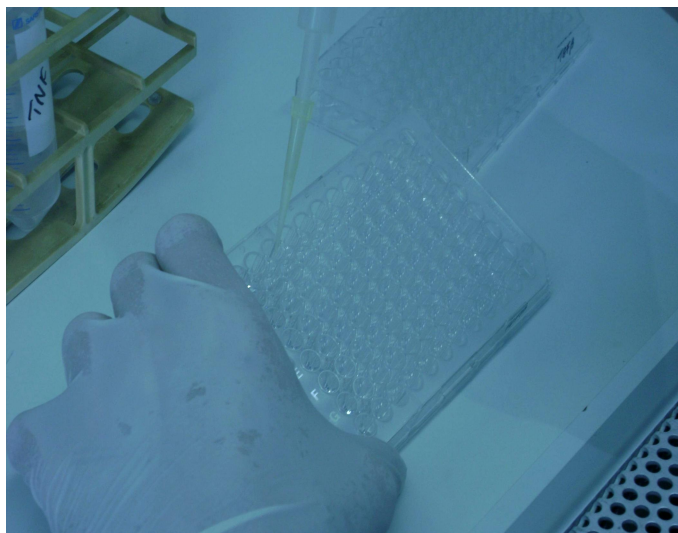


Figura 15: Sensibilização das placas

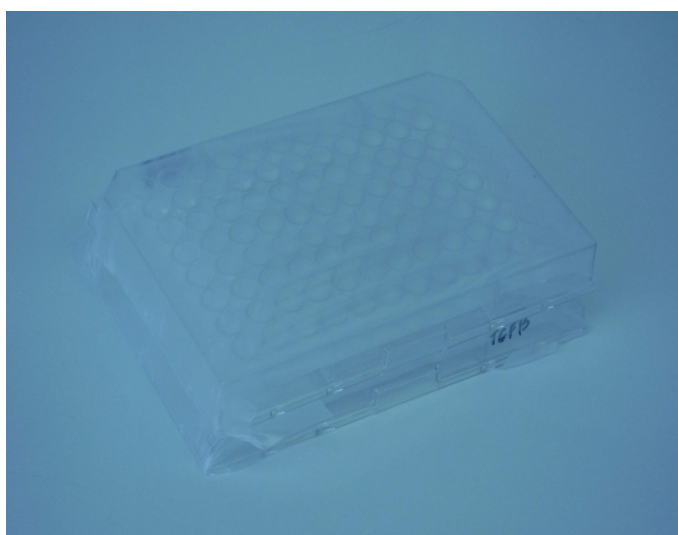


Figura 16: Placas cobertas com plástico fino Parafilm®

Após o tempo de incubação das placas sensibilizadas o excesso de anticorpo foi desprezado. As placas foram bloqueadas colocando-se 200 μ l de PBS-BSA 2% em cada poço e mantidas em temperatura ambiente por 4 horas (Figura 17). Ao término das 4 horas o excesso de PBS-BSA 2% foi desprezado. Em cada poço, foram colocados 50 μ l de PBS-BSA 1%. Nas fileiras 11 e 12, destinadas à determinação da curva, foram adicionados, a cada poço,

mais 50 μ l de PBS-BSA 1%. Nos demais poços, das fileiras de 1 a 10, foram distribuídos 50 μ l das amostras de FCG e soro de acordo com o mapa para ELISA da placa mãe (Figura 18).



Figura 17: Bloqueio das placas com PBS-BSA 2%

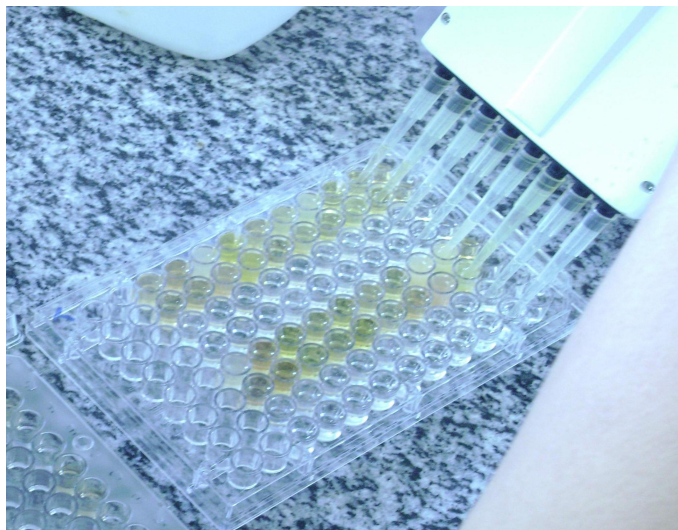


Figura 18: Distribuição das amostras de acordo com a placa mãe.

Nas fileiras 11 e 12 foram feitas as curvas para cada citocina. Na placa para TNF- α foi adicionado um recombinante TNF- α na concentração de 110ng/ml. 10 μ l de recombinante foram misturados a 540 μ l de PBS. Aos poços 11A e 12A foram adicionados 100 μ l dessa

solução em cada. Na placa para IFN- γ foi adicionado um recombinante IFN- γ na concentração de 1 μ g/ml. 2 μ l de recombinante foram misturados a 1 ml de PBS. Aos poços 11A e 12A foram adicionados 100 μ l dessa solução cada. Na placa para TGF- β foi adicionado um recombinante TGF- β na concentração de 2 μ g/ml. 2 μ l de recombinante foram misturados a 2 ml de PBS. Aos poços 11A e 12A foram adicionados 100 μ l dessa solução em cada. Após colocação dos recombinantes foi realizada a diluição seriada até os poços 11G e 12G. Ao final, 100 μ l desses poços foram desprezados, de modo que em cada poço houvesse apenas 100 μ l de solução e os poços 11H e 12H permanecessem apenas com PBS.

As placas foram tampadas com plástico fino e incubadas *overnight* a 4^aC. Após o tempo de incubação necessário, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS *tween* em máquina ImmunoWash/Model 1575® (Bio Rad) (Figura 19).

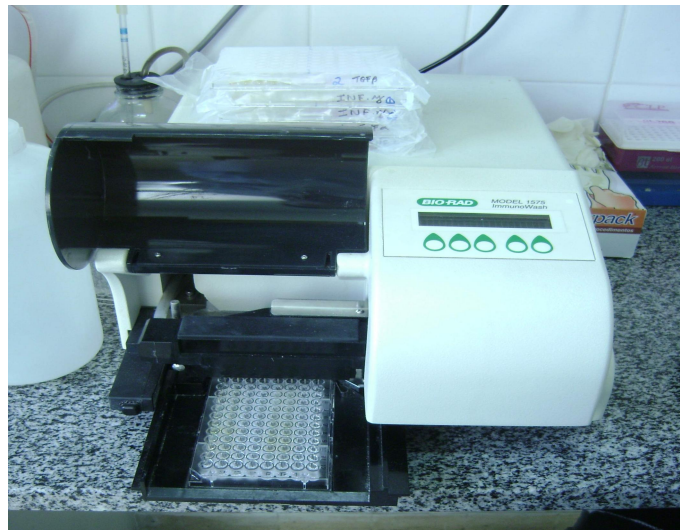


Figura 19: Máquina *ImmunoWash/Model 1575*® (Bio Rad)

Após a lavagem das placas, foram colocados os anticorpos de detecção biotinizados. Foram misturados a 20ml de PBS, 80 μ l de anticorpo de detecção biotinizado TNF- α em diluição de 1:250. A outros 20ml de PBS foram adicionados 80 μ l de anticorpo de detecção biotinizado IFN- γ em diluição de 1:250. 100 μ l de anticorpo de detecção biotinizado TGF- β

em diluição 1:200 foram misturados a 20ml de PBS. 100µl desses anticorpos de detecção foram distribuídos a cada poço das placas, cada anticorpo para sua referida placa. As placas, então, foram incubadas em estufa a 37°C por cerca de 3 horas.

Após esse tempo, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS *tween* em máquina *ImmunoWash/Model 1575*® (Bio Rad). 100µl de uma mistura de 60ml de PBS-BSA 2% + 30µl de Estreptoavidina Pharmigen cat. 554065 lot. 54864 foram distribuídos em cada poço. As placas foram, então, mantidas por 2 horas em estufa a 37°C.

Após 2 horas, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS *Tween* em máquina *ImmunoWash/Model 1575/Bio Rad* ®. Em um recipiente, ao abrigo da luz, foram diluídos em 60 ml de destilada, três comprimidos de pNPP – Sigma Fast No N 2765 lot. 010K-8200 e três comprimidos de *Tris Buffer* – *Sigma Fast* No T-8790 lot. 010K8201 (Figura 20). Em cada poço das placas foram colocados 100µl dessa solução e as placas também foram mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo de luz para não acelerar a coloração.

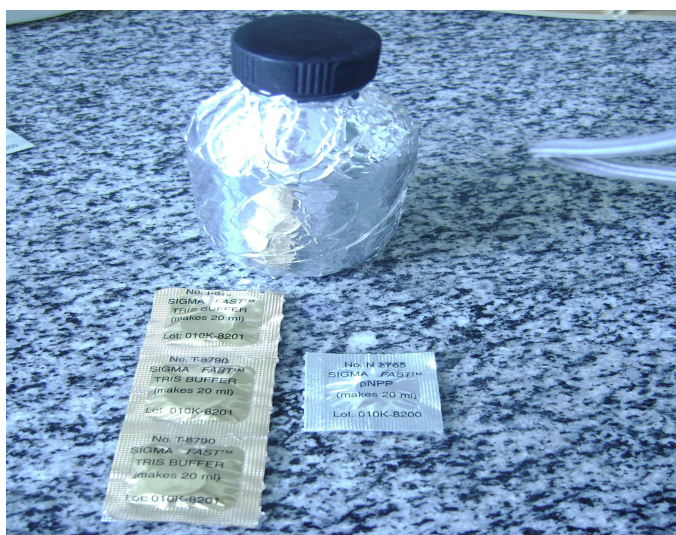


Figura 20: Diluição dos comprimidos de pNPP e *Tris Buffer* em água destilada

As leituras começaram a ser realizadas decorridos 30 minutos da mistura da solução reveladora por meio da máquina Microplate Reader/ Model 3550 Bio Rad® (Figura 21).

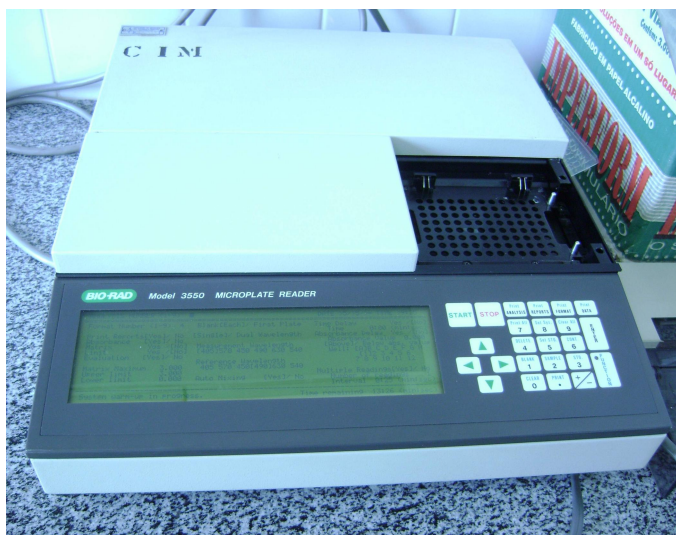


Figura 21: Máquina *Microplate Reader/ Model 3550*® (Bio Rad).

A quantidade de citocinas foi determinada em picogramas (pg). Os resultados foram calculados utilizando a curva padrão criada em cada ensaio.

Análise estatística:

Para a análise estatística, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 4.0®. Na comparação entre os pacientes com PC e os pacientes do GC utilizou-se o teste *t* em casos de distribuição normal e o teste *Mann Whitney* nos casos de distribuição não normal. Para variáveis qualitativas utilizou-se o teste exato de *Fisher*. Para as correlações utilizou-se a correlação de *Pearson*. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 0,05 (5%).

III. RESULTADOS

A média de idade dos pacientes com PC e do GC foi, respectivamente, 42 anos e 35,7 anos (Tabela 2). Dos 20 pacientes com PC, 11 (55%) eram do sexo feminino e 9 (45%) do sexo masculino. Dos 20 pacientes do GC, 13 (65%) eram do sexo feminino e 7 (35%) do sexo masculino (Tabela 2). Dos 20 pacientes com PC, 19 (95%) eram brancos (B) e 1(5%) não-brancos (NB). Dos 20 pacientes do GC, 20 (100%) eram brancos (B) (Tabela 2). A média do índice de massa corporal (IMC), nos pacientes com PC e nos pacientes do GC foi, respectivamente, 4,58 e 4,89 (Tabela 2). Dos 20 pacientes com PC, 10 apresentavam a forma grave localizada e 10 a forma grave generalizada.

Tabela 2. Distribuição da idade, do sexo, da cor e do índice de massa corporal de indivíduos com PC e do GC.

	Pacientes com Periodontite crônica (PC) (n=20)	Pacientes do Grupo Controle (GC) (n=20)
Idade (anos) * X±S	42±12,880	35,7±10,327
Sexo ** M:F	9:11	7:13
Cor *** B:NB	19:1	20:0
IMC**** X±S	4,58± 1,02	4,89±1,09

Legenda: X: Média; S: Desvio Padrão; M: Masculino; F: Feminino;
B: Branco; NB: Não-branco.

*Teste t de *Student*; $t=-1,707$; $p = 0,096$

**Teste exato de Fisher; $P=1$

***Teste exato de Fisher; $P=1$

****Teste t de *Student*; $p = 0,87$

Na tabela 3 observamos que a PS e o NIC foram significativamente maiores nos pacientes com PC.

Tabela 3. Comparação dos níveis de PS e NIC entre os grupos PC e GC.

	PC=20	GC=20
PS (mm)	2,93*	1,66*
Mediana (máx-mín)	(3,29-2,42)	(1,82-1,54)
NIC (mm)	3,06 [#]	1,00 [#]
Mediana (máx-mín)	(3,29-2,61)	(1,13-1,00)

Legenda: PS: profundidade de sondagem; NIC: Nível de inserção clínica; PC: Periodontite crônica; GC: grupo controle

**Mann-Whitney*, $p < 0,001$

[#]*Mann-Whitney*, $p < 0,001$

Os pacientes com PC foram classificados como portadores de periodontite crônica grave por apresentarem NIC $>$ ou $=$ a 5mm (ARMITAGE, 2002). De acordo com a literatura a periodontite pode ser classificada em grave localizada se até 30% dos dentes estiverem afetados e generalizada, se mais de 30% dos dentes, estiverem envolvidos (ARMITAGE, 2002). Embora alguns autores classifiquem a periodontite em localizada e generalizada de acordo com a PS e NIC médios (D'AIUTO et al., 2004). A definição exata do que significa periodontite para fins de pesquisa ainda é muito controversa (PRESHAW, 2009). Dos 20 pacientes com PC, 10 foram classificados como portadores de PC grave localizada e 10 como portadores de PC grave generalizada (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos pacientes quanto ao tipo de periodontite crônica

Tipo de Periodontite Crônica	Porcentagem de Dentes com NIC > ou = a 5mm	n de pacientes
Moderada	0%	01
Grave localizada	22,22%	09
Grave localizada	23,81%	
Grave localizada	28%	
Grave localizada	12%	
Grave localizada	26,67%	
Grave localizada	9,68%	
Grave localizada	24%	
Grave localizada	6,67%	
Grave localizada	17,24%	
Grave generalizada	53,57%	10
Grave generalizada	41,67%	
Grave generalizada	43,48%	
Grave generalizada	55%	
Grave generalizada	56,25%	
Grave generalizada	100%	
Grave generalizada	66,67%	
Grave generalizada	53,85%	
Grave generalizada	32,14%	
Grave generalizada	59,26%	

IFN- γ

Níveis de IFN- γ no FCG

Pacientes com periodontite crônica (PC) apresentaram níveis significativamente maiores de IFN- γ no FCG ($p = 0,0029$) quando comparados ao grupo controle (GC) (Gráfico 1). Após o TPB, esses pacientes continuaram a apresentar níveis significativamente maiores de IFN- γ , quando comparados ao GC, no FCG ($p = 0,0002$) (Gráfico 2).

Antes do TPB:

($p = 0,0029$)

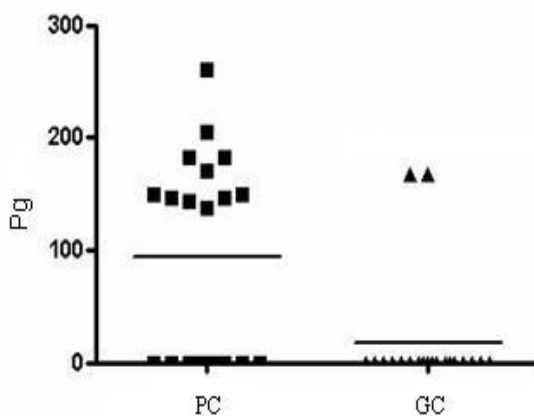


Gráfico 1: Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC.

Após o TPB:

($p = 0,0002$)

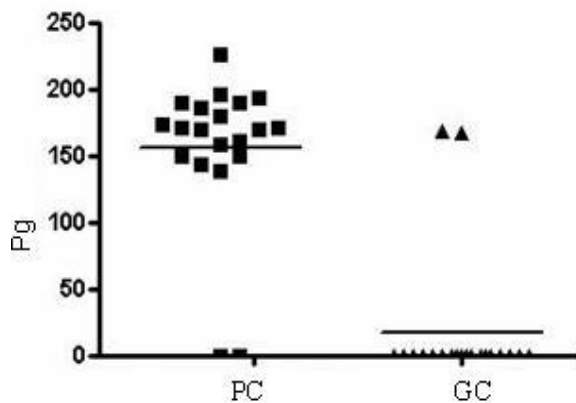


Gráfico 2: Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC.

Níveis de IFN- γ no soro

Pacientes com PC apresentaram níveis significativamente maiores de IFN- γ , quando comparados ao GC ($p = 0,0255$) (Gráfico 3). Após o TPB, esses pacientes (PC) continuaram a apresentar níveis significativamente maiores de IFN- γ , quando comparados aos controles (GC) ($p = 0,0458$) (Gráfico 4).

Antes do TPB:

($p = 0,0255$)

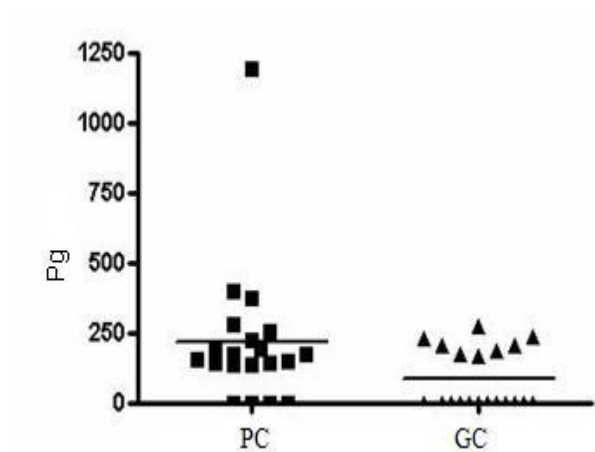


Gráfico 3: Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, antes do TPB, e pacientes do GC.

Após o TPB:

($p = 0,0458$)

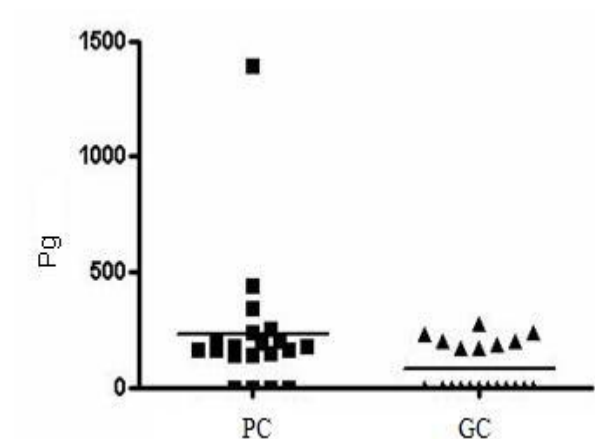


Gráfico 4: Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, após o TPB, e pacientes do GC.

Comparação dos níveis de IFN- γ nos PC antes e após o TPB, no FCG

Após o TPB, os pacientes com PC apresentaram níveis significativamente mais elevados de IFN- γ no FCG quando comparados aos mesmos pacientes (PC) antes do TPB ($p = 0,0090$) (Gráfico 5).

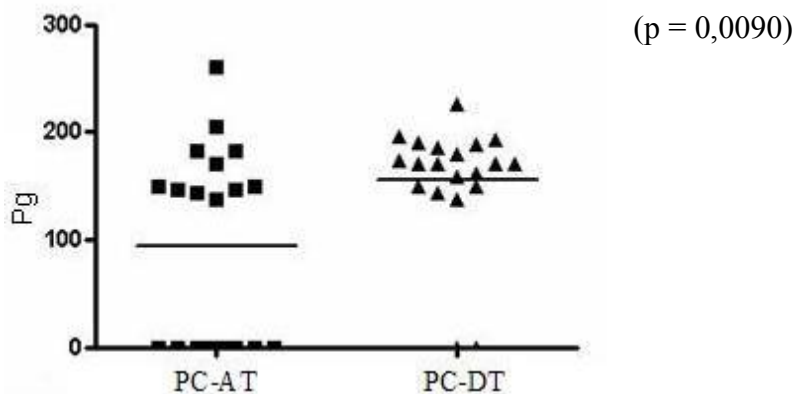


Gráfico 5: Níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC, antes (PC-AT) e após o TPB (PC-DT).

Comparação dos níveis de IFN- γ nos PC antes e após o TPB, no soro

No soro não houve diferença significativa quando comparamos os níveis de IFN- γ nos pacientes com PC, antes e após o TPB ($p = 0,1242$) (Gráfico 6).

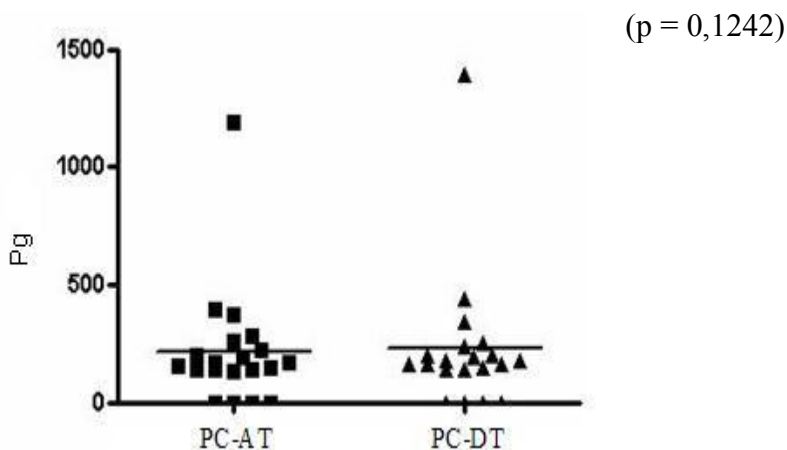


Gráfico 6: Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC, antes (PC-AT) e após o TPB (PC-DT).

TGF- β

Níveis de TGF- β no FCG antes do TPB

Pacientes com PC apresentaram níveis significativamente maiores de TGF- β no FCG quando comparados ao GC ($p = 0,0342$) (Gráfico 7).

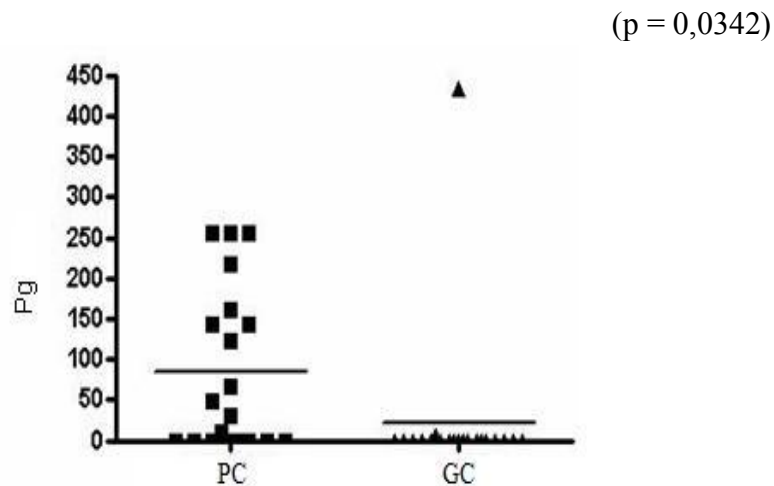


Gráfico 7: Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes do TPB e pacientes do GC.

Níveis de TGF- β no FCG após o TPB

Após o TPB, não houve diferença significativa ao comparar os níveis de TGF- β de pacientes com PC e os níveis de TGF- β dos pacientes do GC no FCG ($p = 0,1289$) (Gráfico 8).

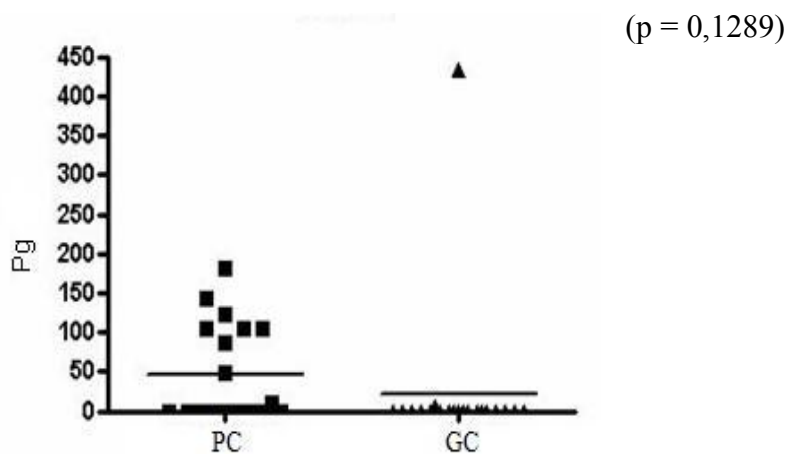


Gráfico 8: Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, após o TPB e pacientes do GC.

Comparação de TGF- β no FCG em PC antes e após o TPB

Não foi observada diferença significativa comparando-se os níveis de TGF- β no FCG entre os pacientes com PC, antes e após o TPB ($p = 0,1353$) (Gráfico 9).

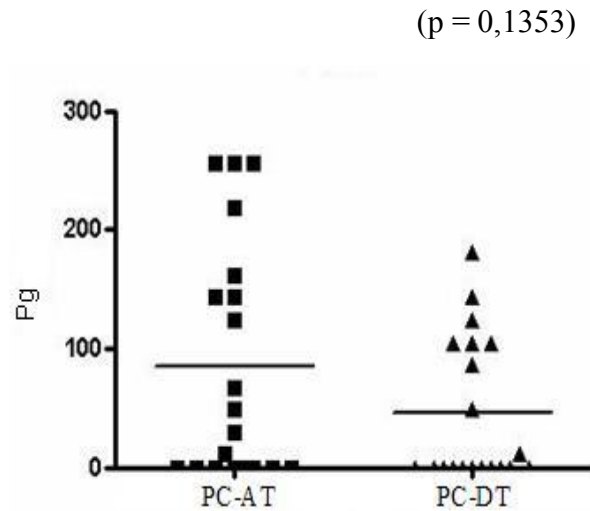


Gráfico 9: Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes (PC-AT) e após o TPB (PC - DT).

As demais comparações, no soro, não puderam ser realizadas em função de algumas dosagens indetectáveis de TGF- β .

TNF- α

Níveis de TNF- α no soro, antes do TPB

Não houve diferença significativa com relação aos níveis de TNF- α , entre pacientes com PC e pacientes do GC, no soro ($p = 0,8438$) (Gráfico 10).

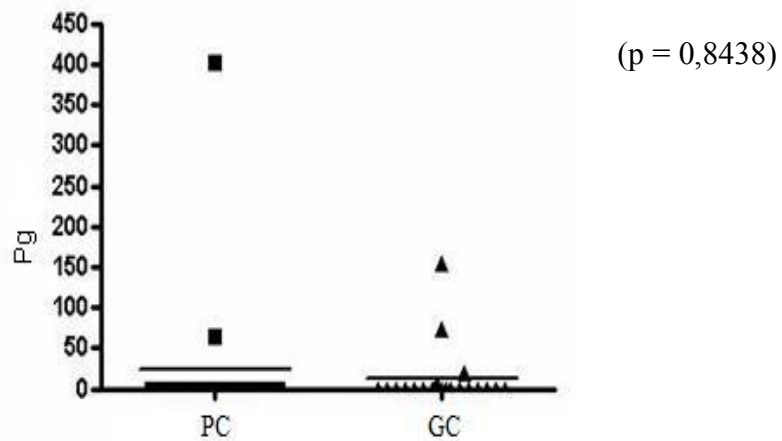


Gráfico 10: Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC, antes do TPB e pacientes do GC.

Níveis de TNF- α no soro, após o TPB

Não houve diferença significativa comparando os níveis de TNF- α em pacientes com PC, submetidos ao TPB e os pacientes do GC, no soro ($p = 0,7422$) (Gráfico 11).

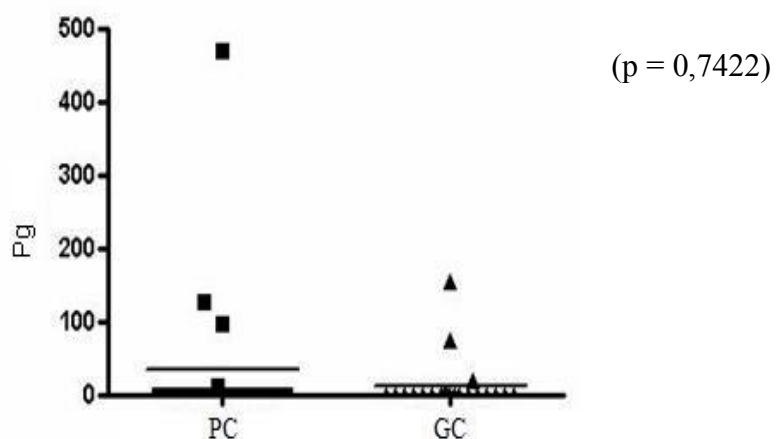


Gráfico 11: Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC após o TPB e pacientes do GC.

Comparação entre os níveis de TNF- α , no soro, antes e após o TPB

Não foi observada diferença significativa comparando-se os níveis de TNF- α no soro, antes e após o TPB ($p = 0,1250$) (Gráfico 12).

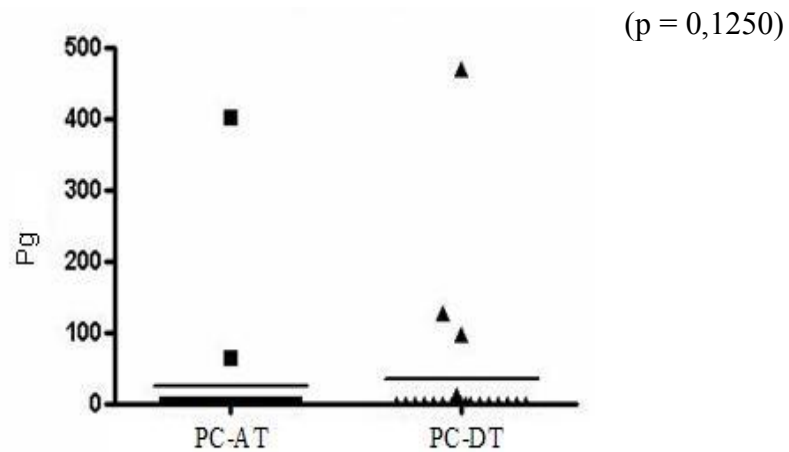


Gráfico 12: Níveis de TNF- α no soro de pacientes com PC, antes (PC - AT) e após o TPB (PC - DT).

As demais comparações, no FCG, não puderam ser realizadas em função de algumas dosagens indetectáveis de TNF- α .

Comparação entre os níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG de pacientes com PC, antes e após o TPB

Quando comparados, os níveis de IFN- γ e TGF- β não apresentavam diferença significativa antes do TPB ($p = 0,839$) (Gráfico 13) e passaram a apresentar diferença significativa após o TPB ($p < 0,001$) (Gráfico 14). Após o TPB houve aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição dos níveis de TGF- β .

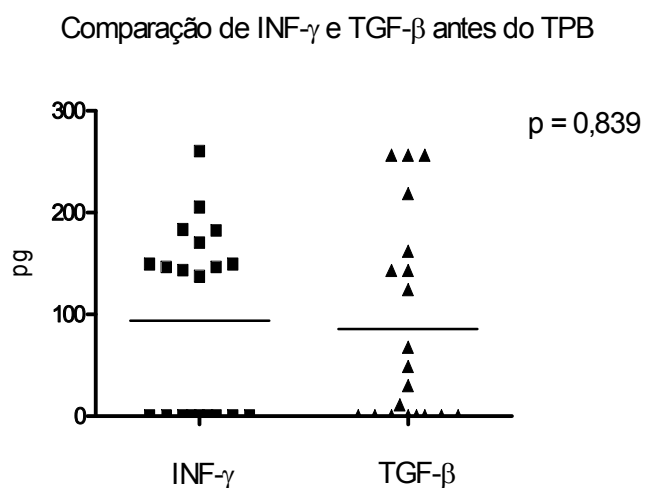


Gráfico 13 – Níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG, de pacientes com PC, antes do TPB

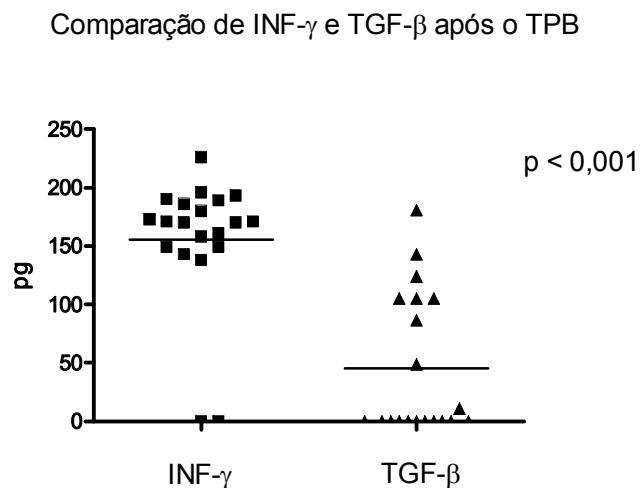


Gráfico 14 – Níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG, de pacientes com PC, após o TPB

Níveis de IFN- γ no FCG dos pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, antes e após o TPB

Havia diferença significativa ($p = 0,0355$) entre os níveis de IFN- γ dos pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes do TPB, no FCG (Gráfico 15). Após o TPB, os níveis de IFN- γ dos pacientes com PC grave localizada aumentaram, passando a não apresentar diferença significativa ($p = 0,5787$) quando comparados com os níveis dos pacientes com PC grave generalizada (Gráfico 16).

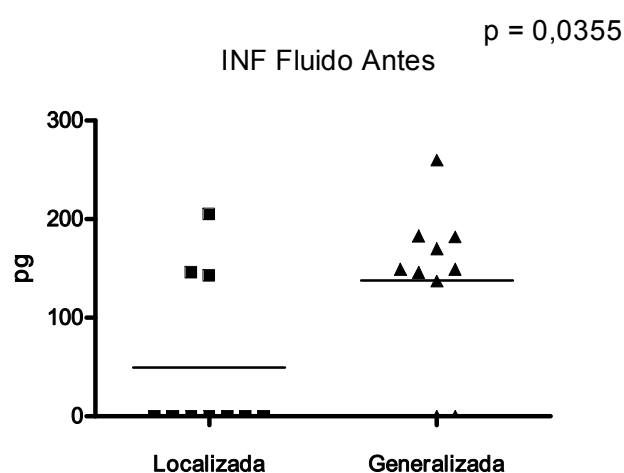


Gráfico 15 – Níveis de IFN- γ no FCG, de pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, antes do TPB

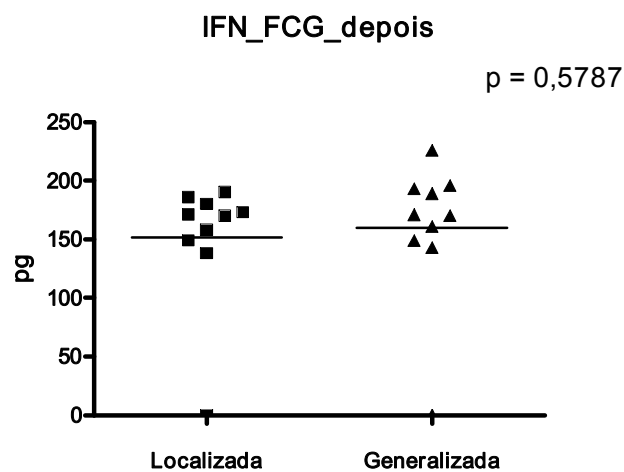


Gráfico 16 – Níveis de IFN- γ no FCG, dos pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, após o TPB

Os níveis de IFN- γ no FCG dos pacientes com PC grave localizada aumentaram significativamente após o TPB ($p = 0,0115$), no FCG (Gráfico 17). Os níveis de IFN- γ no FCG dos pacientes com PC grave generalizada, não tiveram alterações significativas antes e após o TPB ($p = 0,1215$) (Gráfico 18).

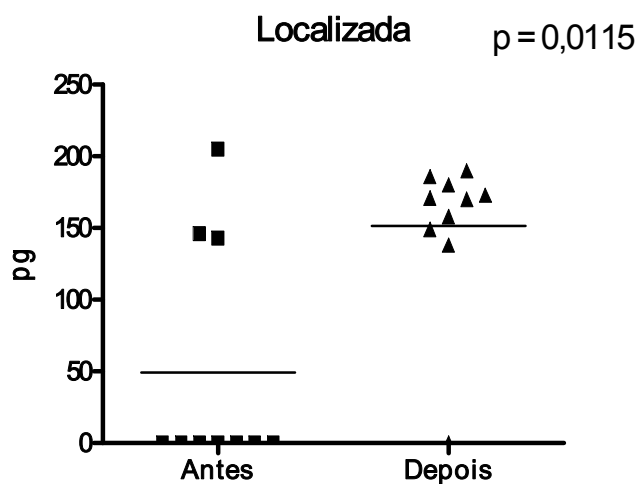


Gráfico 17 – Níveis de IFN- γ no FCG dos pacientes com PC grave localizada, antes e após o TPB

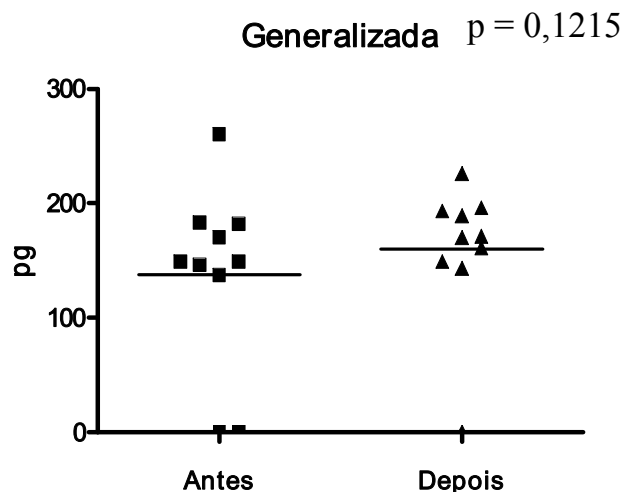


Gráfico 18 – Níveis de IFN- γ no FCG dos pacientes com PC grave generalizada, antes e após o TPB

Níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, antes e após o TPB.

Os níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave generalizada eram maiores que os níveis dos pacientes com PC grave localizada, antes do TPB. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1051$) (Gráfico 19). Após o TPB, esses níveis diminuíram para próximo dos níveis dos pacientes com PC grave localizada ($p = 0,7959$) (Gráfico 20).

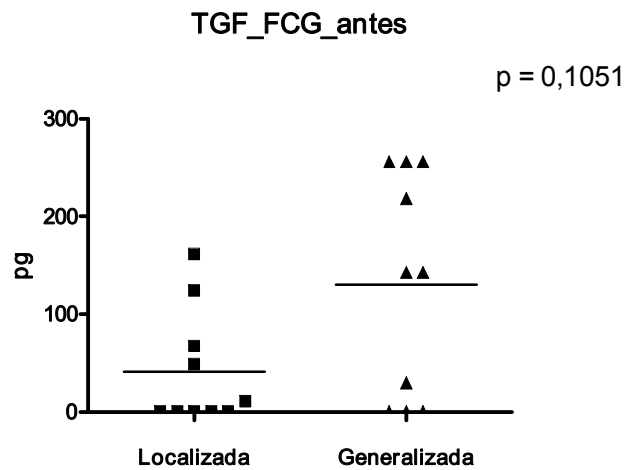


Gráfico 19 – Níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes do TPB

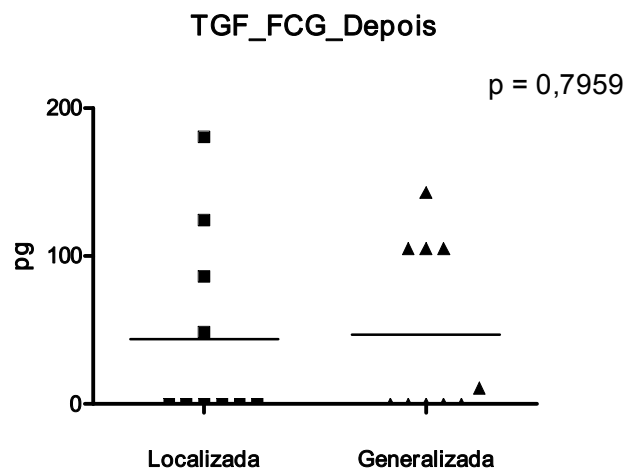


Gráfico 20 – Níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave localizada e generalizada, após o TPB

Os níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave localizada não sofreram alteração significativa antes e após o TPB ($p = 0,9118$) (Gráfico 21). Os níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC grave generalizada diminuíram após o TPB. Essa diminuição não foi estatisticamente significativa mas biologicamente importante ($p = 0,0892$) (Gráfico 22).

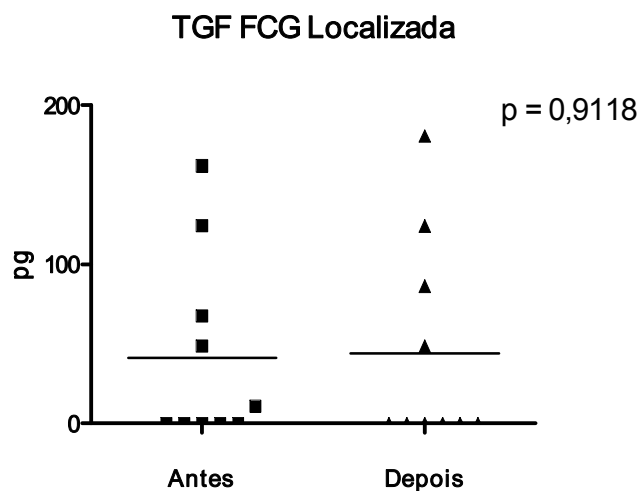


Gráfico 21 – Níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave localizada, antes e após o TPB

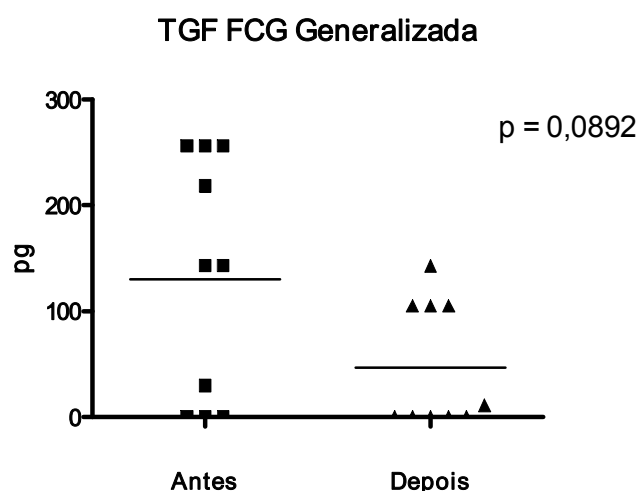


Gráfico 22 – Níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave generalizada, antes e após o TPB

Níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada, antes e após o TPB

Não houve diferença significativa nos níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes e após o TPB (Gráficos 23 e 24).

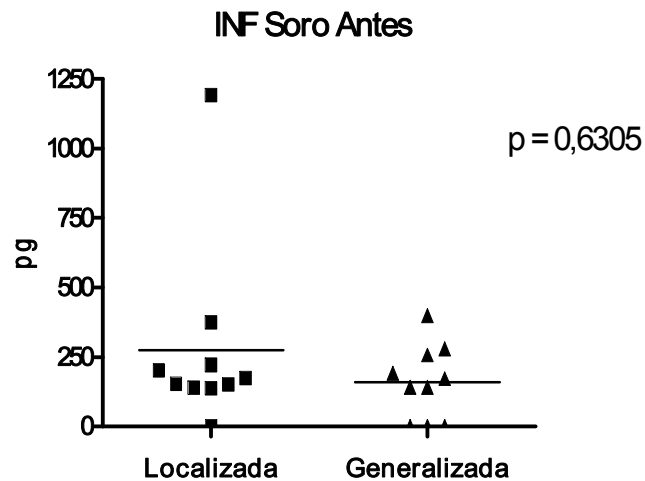


Gráfico 23 – Níveis de IFN- γ no soro dos pacientes com PC grave localizada e generalizada, antes do TPB

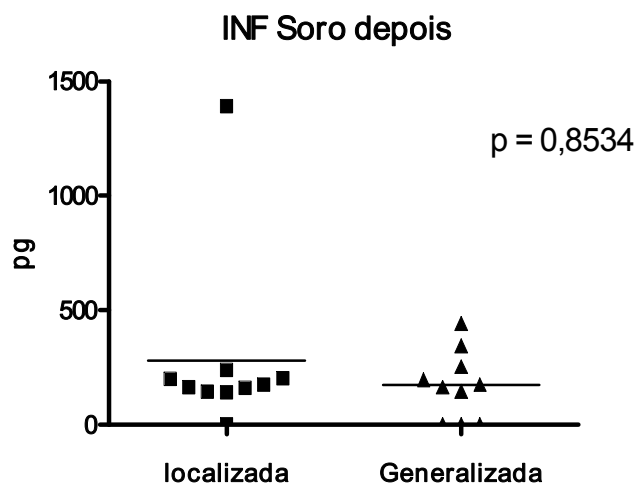


Gráfico 24 – Níveis de IFN- γ no soro dos pacientes com PC grave localizada e generalizada, após o TPB

Não houve correlação significativa entre PS, NIC, IMC e os níveis de IFN- γ . Não houve também correlação significativa entre os níveis de IFN- γ e TGF- β , antes e após o TPB.

IV. DISCUSSÃO

Níveis de IFN- γ

Encontramos níveis significativamente maiores de IFN- γ no FCG e no soro de indivíduos com PC antes do TPB quando comparados aos pacientes do GC. O IFN- γ é uma citocina produzida principalmente por células T CD8+ efectoras, e por células CD4 do subtipo Th1, cuja função principal é a ativação de macrófagos (RODRIGUES, 2004). É uma citocina importante na proteção contra agentes agressores, pois macrófagos estimulados produzem metabólitos tóxicos para as bactérias (BAHIA-OLIVEIRA et al, 2000). Porém, a persistência da agressão bacteriana leva a constante liberação de IFN- γ pelo hospedeiro, contribuindo para a permanência do quadro inflamatório (GAMET et al, 2006). Vários estudos demonstraram maiores níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC quando comparados aos pacientes sem PC (SALVI et al., 1998; TSAI et al., 2007; JOHNSON e SERIO, 2007; DUTZAN et al, 2009). O aumento dos níveis de IFN- γ no soro de pacientes com PC já foi demonstrado em vários estudos (ZONG et al., 2005; TSAI et al., 2007).

Após o TPB os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente no FCG dos pacientes com PC. Houve aumento significativo desses níveis nos pacientes com PC quando comparados aos pacientes do GC. Não encontramos na literatura trabalhos que descreveram aumento de IFN- γ no FCG após o TPB. Aliás, a maioria dos trabalhos relata decréscimo da quantidade absoluta de IFN- γ no FCG após TPB (EBERSOLE e TAUBMAN, 1994; TSAI et al., 2007). Entretanto, nesses estudos a quantificação de IFN- γ no FCG foi realizada no início do TPB e após um mês do término do TPB, diferente do presente estudo, onde a quantidade de IFN- γ foi avaliada antes do TPB e após 7 dias do TPB. O aumento da quantidade total de IFN- γ no FCG de pacientes com PC após o TPB sugere uma exacerbação transitória da

resposta inflamatória o que poderia contribuir para a destruição de patógenos periodontais favorecendo a resolução da PC como já descrita em outros estudos (DUTZAN et al, 2009).

Não houve diferença significativa quando comparamos os níveis de IFN- γ no soro dos pacientes com PC antes e após o TPB, o que está de acordo com a literatura (GORSKA et al., 2003; LALLA et al., 2007). No entanto, alguns autores descreveram menor nível de IFN- γ nos pacientes com PC após o TPB (ZONG et al., 2005; TSAI et al., 2007; WRIGHT et al, 2008).

Níveis de TGF- β

Antes do TPB pacientes com PC apresentavam níveis significativamente maiores de TGF- β no FCG quando comparados ao GC. No entanto, alguns autores descreveram baixos níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC (BABEL et al, 2006). TGF- β é uma citocina pleiotrópica pertencente ao grupo das células T reguladoras (Treg), que são citocinas que regulam a indução e a atividade das células T efetoras controlando respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009), sendo também importante no metabolismo do tecido conjuntivo durante a PC (BABEL et al., 2006). Apresenta papel modulador, aumenta o reparo cicatricial, acelera a remodelação de tecido conjuntivo e promove angiogênese. A ausência de TGF- β provavelmente contribui para a destruição periodontal (BABEL et al., 2006). Portanto, maiores níveis de TGF- β no FCG de pacientes com PC estariam ocorrendo não somente como forma de modular a resposta inflamatória frente à persistente agressão bacteriana, mas também para minimizar a extensão do tecido lesado durante a evolução da PC (CARDOSO et al., 2008).

Após o TPB os níveis de TGF- β no FCG diminuíram, no entanto de forma não significativa. Pelo fato do TGF- β ser uma citocina moduladora da resposta imuno-inflamatória (DUTZAN et al, 2009), a tendência na diminuição dos níveis de TGF- β no FCG

após o TPB indicaria exarcebação transitória do quadro inflamatório provocado pelo TPB. Essa possível exarcebação, após os 7 dias término do TPB, promoveria intensificação da resposta como forma de resolução da doença crônica.

Níveis de TNF- α

Estudos demonstraram aumento dos níveis de TNF- α em amostras de tecido gengival de pacientes com PC (BEKLEN et al. 2007). TNF- α , juntamente com outras citocinas, como IL-1 β , induz produção de metaloproteinases de matriz (MMPS), enzimas que mediam múltiplas funções, tanto na destruição tecidual, quanto na resposta imune ligadas à inflamação periodontal. As metaloproteinases MMP-1 e MMP-3, produzidas por fibroblastos gengivais podem exercer papel importante na destruição de tecidos durante a PC (BEKLEN et al. 2007). Camundongos com deficiência no receptor p55 para TNF- α (p55 TNF-KO) desenvolvem periodontite menos grave em resposta à infecção por *A. actinomycetemcomitans* (*A.a.*), com reação inflamatória e perda óssea alveolar significativamente menor (GARLET et al., 2006). Entretanto não encontramos diferença significativa ao compararmos a quantidade total de TNF- α no soro comparando pacientes com PC e pacientes do GC. Como a quantidade total de TNF- α foi indetectável no FCG, levantamos a hipótese de que possa ter acontecido adsorção dessa citocina aos cones de papel absorvente impedindo que fosse liberada durante a centrifugação das amostras.

Após o TPB não houve diferença significativa com relação aos níveis de TNF- α do soro entre pacientes com PC e pacientes do GC. Entretanto, já foi demonstrada redução significativa dos níveis séricos de TNF- α após o TPB (IWAMOTO et al., 2003) provavelmente porque os autores administraram minociclina-HCL em cada bolsa periodontal durante o TPB, o que teria contribuído efetivamente para a redução da carga bacteriana e consequentemente do quadro inflamatório.

Por outro lado, um estudo demonstrou aumento significativo nos níveis circulantes de TNF- α , no período entre 60 a 120 minutos após o início do TPB em pacientes com PC de moderada a avançada. Nesse estudo, as alterações do TNF- α foram negativamente correlacionadas de forma significativa com os sítios de 4 a 6mm de profundidade de sondagem e positivamente correlacionadas com sítios $>$ ou $=$ a 7mm. Esses achados podem explicar porque alguns pacientes relatam alterações sistêmicas durante o TPB e reforçam a possibilidade de que a PC possa estar associada com alterações inflamatórias sistêmicas mediadas direta ou indiretamente por episódios recorrentes de bacteremias transitórias ou endotoxemias. Embora os possíveis efeitos traumáticos do TPB em si não possam ser excluídos como desencadeadores de tais alterações (IDE et al., 2004)

IFN- γ x TGF- β

Antes do TPB os pacientes com PC não apresentavam diferença significativa entre os níveis IFN- γ e de TGF- β , indicando quadro inflamatório crônico equilibrado entre agressão e defesa, pois IFN- γ é importante na ativação de macrófagos que produzem metabólitos tóxicos para as bactérias (BAHIA-OLIVEIRA et al, 2000) e TGF- β apresenta papel modulador no controle de respostas imunes exacerbadas (DUTZAN et al., 2009). Após o TPB houve aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição dos níveis de TGF- β , com diferença significativa. Este balanço Th1/Treg determinaria a suscetibilidade do paciente à PC (CARDOSO et al., 2008). Portanto, esses resultados sugerem alteração no balanço Th1/Treg com aumento da citocina pró-inflamatória e diminuição da citocina reguladora, o que estaria promovendo aumento da resposta inflamatória como forma de eliminar os patógenos periodontais e promover resolução da PC.

Níveis de IFN- γ e TGF- β na PC grave localizada x PC grave generalizada:**• Níveis de IFN- γ**

Antes do TPB pacientes com PC grave generalizada apresentavam níveis significativamente maiores de IFN- γ no FCG quando comparados aos pacientes com PC grave localizada. Entretanto, Tsai et al. (2007) não encontraram diferença significativa entre a quantidade total de IFN- γ antes do TPB, no FCG, quando se comparou sítios com NIC $>$ ou $=$ a 6mm e sítios com NIC $<$ que 6mm. Salvi et al. (1998) mostraram níveis de IFN- γ aumentados em pacientes com PC grave.

Após o TPB houve aumento dos níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC grave localizada, atingindo níveis similares aos do grupo PC grave generalizada. Este aumento acontece, provavelmente, de forma transitória, já que trabalhos mostram declínio dos níveis de IFN- γ após um mês dos término do TPB (TSAI et al., 2007). Após o TPB os níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC grave localizada aumentaram significativamente, o que não aconteceu com os níveis de IFN- γ no FCG de pacientes com PC grave generalizada, o que está de acordo com a literatura, que mostra maior razão entre citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-4) está associado a um grau menor de extensão da PC (TSAI et al., 2007; UKAI et al., 2001).

• Níveis de TGF- β

Antes do TPB os pacientes com PC grave generalizada apresentavam maiores níveis de TGF- β quando comparados aos pacientes com PC grave localizada. Isto também foi observado por Skaleric et al. (1997), mostrando níveis de TGF- β aumentados em sítios com maiores NIC. Níveis de mRNA de Foxp3, características de células Treg estavam aumentados em amostras gengivais de pacientes com PC em relação a pacientes com gengivite e em sítios

ativos de PC quando comparados com sítios inativos (DUTZAN et al., 2009). Esses achados estão de acordo com a literatura, que demonstra maiores níveis de TGF- β em pacientes com maior extensão de PC. Após o TPB esses níveis apresentaram uma tendência de diminuição, refletindo a exacerbação do quadro inflamatório como forma de resolução da PC. Esta tendência foi mais sutil que a observada nos pacientes com PC grave localizada, o que está de acordo com a literatura, que associa menor razão entre citocinas pró e anti-inflamatórias com um maior grau de extensão de PC (TSAI et al., 2007; UKAI et al., 2001).

Embora não tenhamos encontrado na literatura estudos que comparassem PC grave localizada e PC grave generalizada quanto aos níveis de TGF- β e IFN- γ após o TPB, de acordo com o presente estudo acreditamos que pacientes com PC grave localizada e PC grave generalizada podem apresentar comportamento imunológico diferente, reagindo também diferentemente ao TPB.

V. CONCLUSÕES

1. Os níveis de IFN- γ e TGF- β estavam aumentados significativamente no FCG e no soro de pacientes com PC;
2. Os níveis de TNF- α não se alteraram antes e após o TPB. Estes níveis foram detectáveis apenas no soro;
3. Os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente no FCG, após o TPB nos pacientes com PC. No soro, os níveis de IFN- γ não sofreram alteração significativa após o TPB;
4. Os níveis de TGF- β decresceram de modo não significativo após o TPB no FCG. No soro, não foi possível detectar os níveis do TGF- β após o TPB;
5. Antes do TPB não encontramos diferença significativa entre os níveis de IFN- γ e os níveis de TGF- β no FCG. Após o TPB houve aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição dos níveis de TGF- β no FCG, com diferença significativa;
6. Antes do TPB os níveis de IFN- γ e TGF- β no FCG estavam diminuídos nos pacientes com PC grave localizada quando comparados aos pacientes com PC grave generalizada;
7. Após o TPB, os níveis de IFN- γ subiram no FCG dos pacientes com PC grave localizada de modo significativo, alcançando os níveis dos pacientes com PC grave generalizada;
8. Após o TPB, os níveis de TGF- β no FCG dos pacientes com PC grave generalizada diminuíram de modo não-significativo aproximando-se dos níveis dos pacientes com PC grave localizada.

Conclusão Final:

Pacientes portadores de PC apresentam maiores níveis no FCG e no soro, tanto da citocina pró-inflamatória IFN- γ , quanto da citocina T-reguladora TGF- β , quando comparados aos pacientes do GC. Após o TPB, os níveis de IFN- γ aumentaram significativamente no FCG dos pacientes com PC. Na PC generalizada os pacientes apresentavam níveis significativamente maiores de IFN- γ e de TGF- β no FCG, quando comparados aos pacientes com PC localizada. Após TPB dos pacientes com PC localizada houve aumento significativo dos níveis de IFN- γ no FCG, quando comparados aos mesmos pacientes antes do TPB. Portanto, o aumento dos níveis de IFN- γ no FCG após o TPB nos pacientes com PC sugere aumento da intensidade da resposta inflamatória, que favoreceria a destruição de periodontopatógenos locais contribuindo para a melhora ou resolução clínica da PC.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.H. et al. Transforming growth factor- β induces human T lymphocyte migration in vitro. **J. Immunol.**, v.147, p.609-612, 1991.
2. ALPAGOT, T.; KONOPKA, K.; BHATTACHARYYA, M.; GEBREMEDHIN, S.; DÜZGÜNES, N. The association between gingival crevicular fluid TGF- β_1 levels and periodontal status in HIV-1(+) patients. **J. Periodontol.**, v.79, n.1, p.123-30, 2008.
3. ARMITAGE, G. C. Classificando a doença periodontal: um antigo dilema. In: ROBERTSON, P. B.; DEROUEN, T. A. **Periodontologia 2000** - Controvérsias em Periodontologia, n. 1, 2002.
4. AZUMA, M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. **J. Periodontal Res.**, v.41, n.5, p.361-73, 2006.
5. BABEL, N.; CHEREPNEV, G.; BABEL, D.; TROPMANN, A.; HAMMER, M.; VOLK, H.-D.; REINKE, P. Analysis of tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , Interleukin- 10, IL-6, and Interferon- γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 12, p.1978-1983, 2006.
6. BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **J. Infect. Diseases**, v. 182, p. 634-638, 2000.
7. BALKWILL, F. R.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol. Today**, v. 9, p. 299-304, 1989.
8. BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HKKANEN, M.; GÜRGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T. MMPs, Il-1, and TNF are regulated by Il-17 in periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 4, p. 347-351, 2007.
9. BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M. Cytokines as a link between innate and adaptative antitumor immunity. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 201-208, 2002.
10. BERKOVITZ, B. K. B.; MOXHAN, B. J.; NEWMAN, H. N. **The periodontal ligament in health and disease**. 2. ed., London: Mosby Wolfe, 1995.

11. BIRKEDAL-HANSEN, H.; BUTLER, W. T.; TAYLOR, R. E. Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. **Calcif Tissue Res.**, v. 23, n. 1, p. 39-44, 1977.
12. BORGHETTI, A.; MONNET-CORTI, V. **Cirurgia plástica periodontal**. Tradução de Sandra Dias Loguércio. Porto Alegre: Artmed, 2002.
13. BUDUNELI, N.; KÜTÜKÇÜLER, N.; AKSU, G.; ATILLA, G. Evaluation of transforming G factor- β 1 level in crevicular cyclosporin A-treated patient. **J. Periodontol.**, v.72, n. 4, p. 526-531, 2001.
14. CARDOSO, C. R.; GARLET, G. P.; MOREIRA, A. P.; MARTINS JÚNIOR, WÁLTER; ROSSI, M. A. ; SILVA, J. S. Characterization of CD4⁺CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chonic periodontitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, 2008.
15. CARRANZA Jr. F. A; UBIOS, A. M. As estruturas de suporte do dente. In: CARRANZA Jr. F. A., NEWMAN, M. G. **Periodontia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 32-53.
16. CASTRO, C.E.; KOSS, M.A.; LOPEZ, M.E. Biochemical markers of the periodontal ligament. **Med. Oral**, v. 8, n. 5, p. 322-8, 2003.
17. CEZÁRIO, E.M.; FIGUEREDO, C.M. Quantidade elevada do fator de crescimento transformante beta em sítios com destruição tecidual, em pacientes com periodontite crônica. **R. Ci. Med. Biol.**, v. 3, n. 2, p. 176-180, 2004.
18. CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Inducible nitric oxide synthase and controlo f intracellular bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 621-7, 2003.
19. CHAMPAGNE, C. M. E.; BUCHANAN, W.; REDDY, M. S.; PREISSER, J. S.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 31, p. 167-180, 2003.
20. CONSENSUS REPORT: chronic peridontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 38, 1999.
21. D'AIUTO, F.; READY, D.; TONETTI, M.S. Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. **J. Periodontal Res.**, v.39, n.4, p.236-241, 2004.

22. DINARELLO, C. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 188, p. 503-8, 2000.
23. 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- κ B ligand, interleukin (IL) – 17, IL-10 and transforming growth factor- β during the progression of chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, p. 396-403, 2009.
24. EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontol. 2000**, v. 23, p. 19-49, 2000.
25. EMINGIL, G.; TERVAHARTIALA, T.; MANTYLA, P.; MAATTA, M.; SORSA, T.; ATILLA, G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v.77, n.12, p.2040-50, 2006.
26. FAVA, R.A. et al. Transforming growth factor b1 (TGF-b1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-driven synovial inflammation and hyperplasia. **J. Exp. Med.**, v.173, p.1121-1132, 1991.
27. FREEZER, S. R.; SIMS, M. A. A transmission electron-microscope stereological study of the blood vessels, oxytalan fibres and nerves of mouse-molar periodontal ligament. **Arch. Oral Biol.**, v. 32, n.6, p.407-412, 1987.
28. GARLET, G. P.; CARDOSO, C. R. B.; CAMPANELLI, A. P.; FERREIRA, B. R.; ÁVILA-CAMPOS, M. J.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. British Society for Immunology. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 147, p. 128-138, 2006.
29. GORSKA, R.; GREGOREK, H.; HOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALINSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p.1046-1052, 2003.
30. GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 391-401, 2003.
31. HAFFAJEE, A. et al. Plaque microbiology in health and disease. In: NEWMAN, H. N.; WILSON, M. **Dental plaque revisited: oral Biofilms in health and disease**. Cardiff, UK: Boline, 1999; p. 8-14.

-
32. HAMBLIN, A. S. In: MALE, D., editor. **Cytokines and cytokine receptors**. Oxford: Oxford University Press, 1993.
33. HASSELL, T. M. Tissues and cells of the periodontium. **Periodontol.** 2000, v. 3, p. 9-38, 1993.
34. HEFTI, A. F. Aspects of cell biology of the normal periodontium. **Periodontol.** 2000, v. 3, p. 64-75, 1999.
35. HOLMSTRUP, P. Anatomia microscópica do Peridonto. In: WILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. **Fundamentos de Periodontia**, São Paulo: Quintessence ed. Ltda., 2001, p. 27-46.
36. IDE, MARK; JAGDEV, DALJIT; COWARD, PAULA Y.; CROOK, MATIN; BARCLAY, G. ROBIN; WILSON, RON F. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 3, p.420-428, 2004.
37. IWAMOTO, y; NISHIMURA, F.; SOGA, Y.; TAKEUCHI, K.; KURIHARA, M.; TAKASHIBA, S.; MURAYAMA, Y. Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, but not adiponection levels in patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 8, p. 1231-6, 2003.
38. JOHNSON, R. B.; SERIO, F. G. The contribution of Interleukin-13 and -15 to the cytokine network within normal and diseased gingiva. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 4, 2007.
39. LALLA, E.; KAPLAN, S.; YANG, J.; ROTH, G. A.; PAPAPANOU, P. N.; GREENBERG, S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selection, and tumor necrosis factor- α secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. **J. Periodont. Res.**, v. 42, p. 274-282, 2007.
40. LANG, N. P.; SCHÄTZLE, M. A.; LÖE, H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 10, p. 3-8, 2009.
41. LAQUERRIERE, P.; GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; JALLOT, E.; BALOSSIER, G.; FRAYSSINET, P.; GUENOUNOU, M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 24, p. 2739-2747, 2003.

-
42. LIN, S.K. et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor-beta 1 in induced rat periapical lesions. **J. Endod.**, v.26, n.6, p.335-340, 2000.
43. LINDHE, Jan; KARRING, Thorkild; LANG, Niklaus P. (edit.) **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Tradução de Andrea Braga Moleri et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
44. LISTGARTEN, M. A. Electron microscopic study of the gingivo-dental junction of man **American Journal of Anatomy.**, v. 119, p. 147-178, 1996.
45. LOE, H.; LISTGARTEN, M. A.; TERRANOVA, V. P. A gengiva: estrutura e função. In: GENCO, R. J.; COHEN, D. W.; GOLDMAN, H. M. **Periodontia contemporânea**. 3.ed. São Paulo: Editora Santos; 1999. p. 3-32.
46. LOOS, B. G.; CRAANDIJK, J.; HOEK, F. J.; WERT-HEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER VELDEN, U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients [In Process Citation]. **J. Periodontol.**, v. 71, p.1528-1534, 2000.
47. LOTZE, M. T.; TAHARA, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 as a novel, distinct, and distant member of the interleukin-1 family promoting development of the adaptative immune response: the interleukin-18 issue of the Journal of Immunotherapy. **J. Immunother.**, v.25 (Suppl. 1): S1-S3, 2002.
48. MARTELLO ND, ROSSETTI PHO. **Periodontologia 2000**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005, v. 8.
49. MCCULLOCH, C. A. G.; LEKIG, P.; MCKEE, M. D. M. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. **Periodontol. 2000**, v. 24, p.56-72, 2000.
50. MOSMANN, T. R. Cytokines: is there biological meaning? **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, p. 311-4, 1991.
51. NEWCOMB, G.; SEYMOUR, G. J.; POWELL, R. N. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. **J. Clin. Periodontol.**, v.9, p. 297, 1982.
52. NOACK, B.; GENCO, R.J.; TREVISAN, M.; GROSSI, S.; ZAMBON, J.J.; DE NARDIN, E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J. Periodontol.**, v.72, n.9, p. 1221-7, 2001.
-


-
53. OROZCO, A.; GEMMELL, E.; BICKEL, M.; SEYMOUR, G. J. Interleukin 18 and periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 7, p. 586-593, 2007.
54. PAGE, R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontal Res.**, v. 26, p. 230-242, 1991.
55. PARAMETER ON CHRONIC PERIODONTITIS WITH ADVANCED LOSS OF PERIODONTAL SUPPORT. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 856-858, 2000b.
56. PARAMETER ON CHRONIC PERIODONTITIS WITH SLIGHT TO MODERATE LOSS OF PERIODONTAL SUPPORT. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 853-855, 2000a.
57. PFIZENMAIER, K.; WAJANT, H.; GRELL, M. Tumor necrosis factors in 1996. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 7, p.271-8, 1996.
58. PRESHAW, P. M. Definitions of periodontal disease in research. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, p.1-2, 2009.
59. RODRIGUES, D. B. R. Aspectos morfológicos e imunopatológicos na cardiopatia chagásica crônica: avaliação (*in situ*) de TNF- α , IFN- γ , IL-4, TGF- β , iNOS, Fas e Bcl-2. **Tese de doutorado em Patologia Geral-FMTM**, 2004.
60. ROSS, R. Atherosclerosis, **N. Engl. J. Med.**, v. 340. N. 2, p.115-126, 1999.
61. SALVI, G. E.; BROWN, C. E.; FUJIHASHI, K. et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 33, p.212-25, 1998.
62. SAMPAIO, José Eduardo Cezar et al. O periodonto: anatomia e histofisiologia. In: PAIVA, Javan Seixas de.; ALMEIDA, Rodrigo Veras de. (coord.) **Periodontia: a atuação clínica baseada em evidências científicas**. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
63. SCHOEREDER, H.; PAGE, R. The normal periodontium. In: SCHLUGER, S; YODELIS, R; PAGE, R.; JOHNSON, R. **Periodontol. diseases.**, 2. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, v. 11, 1990.
64. SEDGWICK, J. D.; RIMINTON, D. S.; CYSTER, J. G. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunol. Today**, v. 21, p.110-13, 2000.
-

-
65. SEYMOUR, G.J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontol. Scand.**, v. 59, n. 3, p. 167-73, 2001.
66. SHIMA MAHDAVI-IZAI. Periodontal disease, Oral health and Cardiovascular disease among females in Sweden. **J. Periodontol.**, v.71, p.1882-1886, 2000.
67. SKALERIC, U. et al. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. **J. Oral Sci.**, v.105, n.2, p.136-142, 1997.
68. SLADE, G. D.; OFFENBACHER, S.; BECK, J. D.; HEISS, G.; PANKOW, J. S. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the U.S. population. **J. Dent. Res.**, v. 79, p. 49-57, 2000.
69. SOUTHERLAND, Janet H.; TAYLOR, George W.; MOSS, Kevin; BECK, James D.; OFFENBACHER, Steven. Commonality in chronic inflammatory diseases: periostitis, diabetes, and coronary artery disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 130-143, 2006.
70. SUAREZ, L.J. et al. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v.75, n.9, p.1209-1215, 2004.
71. TAKAHASHI, K.; AZUMA, T.; MOTOHIRA, H.; KINANE, D.F.; KITETSU, S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.32, p.369-374, 2005.
72. TEN CATE, A. R. **Oral histology: development, structure and function**. 5th ed. St. Louis: Mosby, 1998.
73. THOMPSON, C.; POWRIE, F. Regulatory T cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p.408-414, 2004.
74. TONETTI, M. S. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. **J. Clin. Periodontol.**, v.36, n.10, p.15-19, 2009.
75. TSAI, C.C.; KU, C.H.; HO, Y.P.; HO, K.Y.; WU, Y.M.; HUNG, C.C. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic

- periodontitis before and after periodontal initial therapy. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v.23, n.1, p. 1–7, 2007.
76. UKAI, T.; MORI, Y.; ONOYAMA, M. et al. Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, p.901-8, 2001.
77. WRIGHT, H. J.; MATTHEWS, J. B.; CHAPPLE, I. L.; LING-MOUNTFORD, N.; COOPER, P. R. Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. **J. Immunol.**, v. 181, n. 8, p. 5775-84, 2008.
78. VADAY, G. G.; FRANITZA, S.; SCHOR, H. et al. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, p.885-92, 2001.
79. YAMADA, N.; NIWA, S.; TSUJIMURA, T.; IWASAKI, T.; SUGIHARA, A.; FUTANI, H. et al. Interleukin-18 and interleukin-12 synergistically inhibit osteoclastic bone-resorbing activity. **Bone**, v.30, p.901-908, 2002.
80. ZONG, M.; YANG, P. S.; QI, X. M. et al. Changes of circulating IFN-gamma, IL-4 in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v.14, p.131-3, 2005.

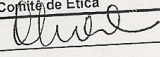
VII. ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação pelo CEP-UNIUBE – Comitê de Ética em Pesquisa

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

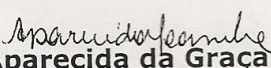
CAAE - 0030.0.227.000 - 06

*Entrega R1
saúde*

PROJETO RECEBIDO NO CEP	
Projeto de Pesquisa DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C DE FASE AGUDA, CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS EM PA COM OU SEM DOENÇA PERIODONTAL	
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica	Grupo Grupo III
Pesquisador Responsável	
CPF 66141583687	Pesquisador Responsável Sanívia Aparecida de Lima Pereira
Comitê de Ética	
Data de Entrega 03/05/2006	Recebimento:  Assinatura

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

Anexo 2 – Autorização da Secretaria Municipal de Saúde para pesquisa em ambulatório

GOVERNO MUNICIPAL Uberaba <small>uma cidade para todos</small>			PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERABA Secretaria Municipal de Saúde Depto de Gestão, Qualificação e Desenvolvimento de RH	
MEMORANDO INTERNO	Nº989E/2006		DATA: 11/08/2006	
EMITENTE		DESTINATÁRIO		
Aparecida da Graça Coimbra Diretora do Depto de Gestão, Qualificação e Desenvolvimento de Recursos Humanos		Adriana Bessa Ferreira Ambulatório Randolfo Borges		
ASSUNTO: Informação (presta)				
M E N S A G E M				
<p>Prezada Senhora,</p> <p>Considerando a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, Informamos que o requerente Gustavo Fatureto Escobar está apto a iniciar suas atividades de pesquisa nessa Unidade de Saúde. Anexo segue cópia da documentação.</p> <p>Atenciosamente,</p> <p style="text-align: center;">  Aparecida da Graça Coimbra Diretora do Depto de Gestão, Qualificação e Desenvolvimento de Recursos Humanos </p>				

Anexo 3 – Termos de esclarecimento e de consentimento

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você tem um tipo de doença denominada Doença periodontal ou Periodontite e está sendo convidado a participar do estudo “ Dosagem dos níveis séricos de proteína C de fase aguda , citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em pacientes com ou sem doença periodontal” .Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante.O objetivo deste estudo é avaliar a presença de proteína C de fase aguda, citocinas e quimiocinas no soro de pacientes portadores de periodontite , se essas estão aumentadas em comparação aos pacientes sem periodontite e se após o tratamento periodontal básico, esses níveis séricos são diminuídos e caso você participe, será necessário fazer exames de sangue, coleta de amostra de fluido gengival, exames radiográficos, perguntas sobre sua saúde geral e o tratamento periodontal básico completo.Você poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para colher o sangue do seu braço.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento.Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido.A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo.Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento.Sei que meu nome não será divulgado, quenão terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, ___ / ___ / _____

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: Gustavo F. Escobar- 3321 7029

Anexo 4 – Hemograma



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA – DEPTO. CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.
RUA FREI PAULINO, 30 CEP: 38025-180 - UBERABA - MG.
FONE: (034) 3318 5289 - 33185299 FAX: 34 3318-5651

Uberaba, 29 de novembro de 2007.

Nome: _____

Médico solicitante: Virmondés Rodrigues Júnior

RESULTADO HEMOGRAMA**SERIE VERMELHA**

Hemácias	4.78	Milhões/mm ³
Hematócrito	43.9	%.
Hemoglobina	14.4	g/dl.
VCM	91.8	um ³
HCM	30.1	g/dl
CHCM	32.8	%.

SERIE BRANCA

Leucócitos	7.5	Mil/mm ³
Bastonetes	01	%.
Segmentados	52	%.
Eosinófilos	07	%.
Basófilos	00	%.
Linfócitos	35	%.
Monócitos	05	%.

Plaquetas 237 mil/mm³

Método: CITOMETRIA AUTOMATIZADA - HORIBA ABX PENTRA 120 E 60

Betânia Maria Ribeiro (CRBM-1337)
Responsável Técnico Laboratório de Imunologia

Anexo 5 – Ficha clínica, anamnese e periograma

Dr. Gustavo Fatureto Escobar n° _____
 Cirurgião - Dentista - **Periodontista** CRO/MG 24506 **PGPG -UFTM**
 Rua Segismundo Mendes, 562, Centro. Uberaba-MG Tel.(34) 33217029

DADOS PESSOAIS

Nome: _____
 Data de Nasc.: ___/___/___ Sexo: _____ Profissão: _____ Est. Civil: _____
 Endereço: _____
 Tel. Res.: _____ Tel. Com.: _____ Cel.: _____
 Renda: _____ Raça: _____

CONDIÇÕES SISTÊMICAS

1-Sistema Cardiovascular	8-Pressão Arterial
2-Sistema Respiratório	9- Sensibilidade Imunitária
3-Sistema Digestório	10- Hábitos Nocivos
4-Sistema Gêrito- Urinário	11- Está sob tratamento médico?
5-Sistema Endócrino	12- Faz uso de algum medicamento?
6-Sistema Nervoso	Qual?
7-Doenças Sistêmicas	Obs.:
	Queixa Principal

Data: ___/___/___	Afirmo serem verdadeiras as respostas acima e concordo com o tratamento proposto autorizando assim a realização deste.. _____ CPF _____ Assinatura do paciente ou responsável
Assinatura do C.D.	

EXAME CLÍNICO

<p>I.F. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>M.G. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">8 7 6 5 4 3 2 1</p> <p style="text-align: center;">D</p> <p style="text-align: center;">8 7 6 5 4 3 2 1</p> <p>M.G. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>I.F. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>	<p style="text-align: right;">I.F. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">M.G. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">8 7 6 5 4 3 2 1</p> <p style="text-align: right;">E</p> <p style="text-align: right;">1 2 3 4 5 6 7 8</p> <p style="text-align: right;">M.G. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">I.F. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>
--	---

OBS.: _____

Anexo 6 – Apresentação dos resultados deste trabalho em Eventos Científicos

- ESCOBAR, G. F.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; NAPIMOGA, M. H.; RODRIGUES, D. B. R.; PEREIRA, S. A. L. **Evaluation of levels of IFN- γ , TNF- α e TGF- β in serum and GCF of control and periodontal disease patients before and after periodontal treatment.** EUROPERIO 6, 6th CONGRESS OF THE EUROPEAN FEDERATION OF PERIODONTOLOGY, Stockholm, Sweden, 2009.
- ESCOBAR, G. F.; GOTTI, V. B.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; NAPIMOGA, M. H.; RODRIGUES, D. B. R.; NAPIMOGA, J. T. C; RIBEIRO, B. M.; PEREIRA, S. A. L. Evaluation of levels of IFN- γ , TNF- α e TGF- β in serum and GCF of control and periodontal disease patients before and after periodontal treatment. XXXIII CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY, II EXTRA SECTION OF CLINICAL IMMUNOLOGY, Ribeirão Preto, Brazil, 2008.
- GOTTI, V. B.; ESCOBAR, G. F.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; NAPIMOGA, M. H.; RODRIGUES, D. B. R.; NAPIMOGA, J. T. C; RIBEIRO, B. M.; PEREIRA, S. A. L. Dosagem dos níveis séricos e gengivais de IFN-GAMA, TNF-ALFA e TGF-BETA em pacientes com ou sem doença periodontal. 26^a REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, Águas de Lindóia, SP, 2009.

Anexo 7 – Normas adotadas para elaboração desse trabalho

As normas adotadas para elaboração desse trabalho foram as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- ◆ Normas para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos: NBR 14724/ Jul, 2001;
 - ◆ Normas para Apresentação de Citações em Documentos: NBR 10520/Jul, 2001;
 - ◆ Normas para Elaboração de Referências: NBR 6023/ Ago, 2000.
-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)