

UNIVERSIDADE DE UBERABA

AMANDA KARINA ANTUNES
KARINA BARBOSA DE OLIVEIRA

Avaliar os níveis de IL-8, IL-1 β e IL-6 em fluido gengival de pacientes com e sem doença periodontal

UBERABA-MG

2019

Amanda Karina Antunes
Karina Barbosa de Oliveira

Avaliar os níveis de IL-8, IL- 1 β e IL-6 em fluido gengival de pacientes com e sem doença periodontal

Pesquisa científica trabalho de conclusão de curso; apresentada pelo curso de odontologia da universidade de Uberaba, como requisito para a obtenção do título de cirurgião dentista.

Orientadora: Prof. Denise Bertulucci Rocha
Rodrigues

UBERABA-MG
2019

Antunes, Amanda Karina.
A89a Avaliar os níveis de IL-8, IL-1B e IL-6 em fluido gengival de
pacientes com e sem doença periodontal / Amanda Karina Antunes,
Karina Barbosa de Oliveira. – Uberaba, 2019.
42 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba. Curso
de Odontologia, 2019.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

1. Periodontite. 2. Gengivas – Doenças. 3. Citocinas. I. Oliveira,
Karina Barbosa de. II. Rodrigues, Denise Bertulucci Rocha. III.
Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 617.632

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171

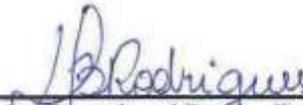
Amanda Karina Antunes
Karina Barbosa de Oliveira

**AVALIAR OS NÍVEIS DE IL-8, IL-1 β E IL-6 EM FLUIDO GENGIVAL
DE PACIENTES COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL**

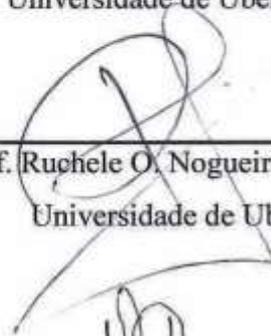
Pesquisa científica trabalho de conclusão de curso;
apresentada pelo curso de Odontologia da
Universidade de Uberaba, como requisito para a
obtenção do título de cirurgião dentista.

Aprovado em 29/6/2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues
Universidade de Uberaba



Prof. Ruchele O. Nogueira G. Martins
Universidade de Uberaba



Prof. Denise Tornavoi
Universidade de Uberaba

AGRADECIMENTO

Agradecemos aos nossos pais pelo apoio incondicional na realização de todo o curso. Aos amigos que tornaram essa luta mais branda e alegre. Aos professores que compartilharam seus conhecimentos para que sejamos futuros colegas de trabalho. Agradecemos à nossa orientadora em especial Prof. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues por ter paciência em nos explicar e ensinar. Agradecemos à aluna de mestrado Lorena Teodoro de Castro Cassanta que nos ajudou no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O periodonto quando acometido por alterações patológicas pode desenvolver várias doenças. Dentre essas, as mais comuns são a gengivite e a periodontite. A gengivite em seu estágio inicial causará inflamação no epitélio gengival, e quando houver progressão para o tecido conjuntivo causará a periodontite, que pode levar a perda de inserção e progressiva destruição óssea. Essas doenças podem estar associadas inicialmente com o acúmulo de biofilme, mas também por colonizações de patógenos relativamente definidos de microrganismos, além de envolver a resposta inflamatória do sistema imune do indivíduo. A sua persistência levará a resposta imune adaptativa e a produção e liberação de algumas Inter leucinas e quimiocinas que irão colaborar para o início da ativação da resposta imune local. A IL-8 é uma quimiocinas importante para atrair neutrófilos para o local da agressão e as citocinas, IL-1 β e IL-6 são citocinas fundamentais na formação do processo inflamatório local, pois ambas citocinas parecem ter efeitos diretos ou indiretamente na osteoclastogênese. Avaliar os níveis de IL-8, IL-1 β e IL-6 em fluido do sulco gengival de pacientes com e sem doença periodontal. Este estudo foi constituído por 69 pacientes, onde obteve-se amostras de Fluido Crevicular Gengival (FCG) para compor 3 grupos: controle (n=20), gengivite (G) (n=20) e periodontite crônica (PC) (n=29). A IL-8, IL-1 β e IL-6 foram dosadas utilizando-se a técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Biosciences, EUA), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram considerados significativos quando o $p < 0,05$. Os níveis de IL-6 e IL-1 β foi significativamente maior no grupo PC e gengivite quando comparada com o grupo controle (KW $p=0.0018$; KW $p < 0.0001$, respectivamente). Não houve diferença na concentração de IL-8 (KW $p=0.3427$). Ao compararmos apenas o grupo de periodontite crônica e o grupo de gengivite observou-se que não houve diferença na concentração das citocinas IL-6 (MW $p=0.8726$) e IL-8 (MW, $p=0.1588$), porém a IL-1 β (KW $p=0.0076$) foi significativamente maior no 1. Diante dos resultados e das limitações do presente estudo, conclui-se que IL-1 β e IL-6 podem estar envolvidos nas diferentes fases das doenças periodontais, seja na tentativa de evitar danos adicionais ou exacerbá-los, porém mais estudos são necessários para confirmar nossos achados e esclarecer o papel destas e outras moléculas.

Palavras Chave: Gengivite; Periodontite, Quimiocinas; IL-8; Citocinas; IL-6.

ABSTRACT

The periodontium when affected by pathological alterations can develop several diseases. Among these, the most common are gingivitis and periodontitis. Gingivitis in its early stage will cause inflammation in the gingival epithelium, and when there is progression to the connective tissue it will cause periodontitis, which can lead to loss of insertion and progressive bone destruction. These diseases may be associated initially with biofilm accumulation, but also by colonizations of relatively defined pathogens of microorganisms, as well as involving the inflammatory response of the individual's immune system. Its persistence will lead to the adaptive immune response and the production and release of some Interleukins and chemokines that will collaborate to initiate the activation of the local immune response. IL-8 is an important chemokine to attract neutrophils to the site of aggression, and cytokines, IL-1 β and IL-6 are key cytokines in the formation of the local inflammatory process, since both cytokines appear to have direct or indirect effects on osteoclastogenesis. To assess the levels of IL-8, IL-1 β and IL-6 in gingival sulcus fluid of patients with and without periodontal disease. This study consisted of 69 patients, where Gingival Crevicular Fluid (GG) samples were obtained to compose three groups: control (n = 20), gingivitis (G) (n = 20) and chronic periodontitis (29). IL-8, IL-1 β and IL-6 were measured using the *Cytometric Bead Array* (CBA) technique (BD Biosciences, USA), according to the manufacturer's instructions. The results were considered significant when $p < 0.05$. The levels of IL-6 and IL-1 β were significantly higher in the PC group and gingivitis when compared to the control group (KW $p = 0.0018$; KW $p < 0.0001$, respectively). There was no difference in IL-8 concentration (KW $p = 0.3427$). When comparing only the chronic periodontitis group and the gingivitis group, it was observed that there was no difference in the concentration of IL-6 cytokines (MW $p = 0.8726$) and IL-8 (MW, $p = 0.1588$), but IL- β (KW $p = 0.0076$) was significantly higher in 1. Given the results and limitations of the present study, we conclude that IL-1 β and IL-6 may be involved in the different phases of periodontal diseases, whether in an attempt to avoid additional damage or exacerbation, but more studies are needed to confirm our findings and clarify the role of these and other molecules.

Palavras-chave: Gingivitis; Periodontitis, Chemokines; IL-8; Cytokines; IL-6

LISTA DE FIGURAS

Figura A - Quantificação da IL-6, avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes controle, pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

Figura B - Quantificação da IL-1 β avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes controle, pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

Figura C - Quantificação da IL-8 avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes controle, pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

Figura D – Quantificação da IL-6 avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

Figura E – Quantificação da IL-8 avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

Figura F - Quantificação da IL-1 β avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes com Periodontite Crônica e pacientes com gengivite;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e periodontais dos pacientes do grupo controle, grupo gengivite e do grupo periodontite crônica. Análise respectiva às amostras de fluido crevicular gengival (FCG).

LISTA DE ABREVIATURAS

- **IL-8** – Interleucina 8;
- **IL-1 β** – Interleucina 1 β ;
- **IL-6** – Interleucina 6;
- **FCG** – Fluido Crevicular Gengival;
- **G** – Gengivite;
- **PC** – Periodontite;
- **CBA** – Cytometric Bead Array;
- **KW** – Kruskal-Wallis;
- **MW** – Mann-Whitney;
- **PA** – Periodontite Agressiva;
- **RANK-RANKL** – Receptor ativador do fator nuclear Kapa B/ligante do receptor do fator nuclear Kapa B;
- **Kappa B** – Fator nuclear;
- **OPG** – osetoprotegerina;
- **TNF α** – Fator de Necrose Tumoral α ;
- **IL-17** – Interleucina 17;
- **TCD4+** - Linfócito T;
- **TGF β** – Transforming growth fator β / Fator de transformação do crescimento β
- **Th17** – Linfócito T helper 17;
- **IL-23** – Interleucina 23;
- **CXCL8** – Interleucina 8;
- **LPS** – Lipopolissacarídeo;
- **IL-1** – Interleucina 1;
- **SOFAT** –
- **HIV** – Virus da imunodeficiência adquirida;
- **PBS 1x** – Tampão fosfato salino / phosphate buffered saline;
- **TLCR** –
- **NP 40** –
- **Ac** – Anticorpos;

- **PE** – Fluorocromo Ficoeritina;
- **Mm** – Milímetros;
- **P. gingivalis** – Porphyromonas gingivalis;
- **NLRP3** – Inflamassoma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Resposta Imune nas Doenças Periodontais	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivo específico	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 Caracterização da Amostra	21
4.2 Recrutamento dos pacientes	21
4.3 Coleta do Material	22
4.4 Quantificação de Citocinas por CBA	22
4.5 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 AVALIAÇÃO DOS PACIENTES	24
5.2 ANÁLISE DA IL-6, IL-1B E IL-8 POR CBA NAS AMOSTRAS DE FCG	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8. CONCLUSÃO	32

REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	38
ANEXO A	38
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES SEM DOENÇA PERIODONTAL QUE CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE.	38
ANEXO B	41
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL QUE CONSTITUÍRAM O GRUPO EXPERIMENTAL.	41
ANEXO C	44
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: APROVAÇÃO DO PROJETO	44

1. INTRODUÇÃO

O periodonto compreende as estruturas de suporte e proteção do elemento dental (gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar), as quais podem ser acometidas por condições patológicas denominadas Doenças Periodontais (TENG, 2003; DIAS, PIOL, ALMEIDA, 2006), que são processos inflamatórios crônicos (DA SILVA et al., 2015) que afeta quase 90% da população (PIHLSTROM, TABAK, 2005).

As doenças periodontais são classificadas em doenças gengivais, periodontite crônica e agressiva, periodontite como manifestação de doenças sistêmicas, doenças periodontais necrosantes, abscessos do periodonto, periodontites associadas a lesões endodônticas, e deformidades e condições de desenvolvimento ou adquiridas (ARMITAGE, 1999). Dentre estas, existem duas mais comuns: a gengivite e a periodontite, sendo esta última classificada em crônica ou agressiva (CEKICI et al., 2014).

A gengivite é uma inflamação da gengiva caracterizada por vermelhidão e tumefação gengival e aumento do sangramento dos tecidos moles ao redor dos dentes (LINDHE, 2014). Não há envolvimento dos tecidos de suporte, como osso alveolar e ligamento periodontal, portanto sem haver perda óssea e destruição tecidual (BECK, JUNIOR ARBES, 2006).

Nas periodontites ocorre perda de inserção e destruição óssea progressiva (FLEMMIG, 1999). A periodontite crônica é uma doença de progressão lenta (BROWN, LOE, 1993) caracterizada por alterações de textura e volume da gengiva; sangramento à sondagem; aumento da profundidade de sondagem; perda de inserção; recessão gengival; perda óssea; aumento da mobilidade dentária; e eventual perda do dente; e pode ser localizada, quando menos de 30% dos dentes são afetados; e generalizada, quando ultrapassa esse limite (LINDHE, 2014).

A periodontite agressiva (PA) é uma doença de progressão rápida, altamente destrutiva (ARMITAGE, 1999), caracterizada por intensa destruição dos tecidos periodontais de suporte e com predileção por indivíduos jovens e pelos dentes primeiros molares e incisivos (ARMITAGE, 1999; LINDHE, 2014).

A perda óssea alveolar é uma das mais importantes manifestações clínicas da periodontite. A principal via de indução de reabsorção óssea é a via RANK-RANKL (KONG et al., 1999). Quando o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), citocina chave da osteoclastogênese, se liga ao receptor ativador do fator

nuclear Kappa B (RANK) na superfície de precursores de osteoclastos, estes se diferenciam em osteoclastos, os quais promovem reabsorção óssea (KONG et al., 1999). A osteoclastogênese é regulada pelos osteoblastos através da produção do RANKL e da osetoprotegerina (OPG) (BAUM, GRAVALLESE, 2014).

As doenças periodontais estão associadas com o acúmulo de biofilme e colonização de bactérias (PAGE, SCHROEDER, 1976). Os patógenos periodontais constituem um grupo relativamente definido de microrganismos e incluem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* e espécies de *Treponema* (HAFFAJEE, SOCRANSKY, 1994).

Em 1996 o Simpósio Mundial de Periodontia designou como principais patógenos periodontais o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.A), a *P. gingivalis* e a *Tannerella forsythia* (CONSENSUS REPORT, 1996).

No entanto, a presença de periodontopatógenos não é suficiente para o desenvolvimento das doenças periodontais, visto que determinadas respostas inflamatórias do hospedeiro resultam em destruição dos tecidos do periodonto (LIU, LERNER, TENG, 2010).

1.1 Resposta Imune nas Doenças Periodontais

A patogênese das doenças periodontais inicialmente esteve associada ao papel infeccioso dos microrganismos no biofilme dental, mas atualmente acredita-se que a resposta imune do hospedeiro pode levar ao desenvolvimento destas condições (KAYAL, 2013).

O estágio inicial destas doenças é representado pela gengivite, onde a inflamação se restringe ao epitélio gengival; mas a infecção pode progredir para o tecido conjuntivo, levando ao desenvolvimento da periodontite (LISTGARTEN, 1986).

Quando os indivíduos abstêm da escovação dos dentes, há acúmulo de biofilme o qual, juntamente com os produtos microbianos, induzem uma resposta inflamatória que ativa o sistema imune inato (KAYAL, 2013). Macrófagos e neutrófilos são ativados e fagocitam os microrganismos; o sistema complemento também é ativado e os mastócitos liberam histamina, a qual provoca vasodilatação, aumentando o fluxo

sanguíneo e o recrutamento de fagócitos (JANEWAY JUNIOR, MEDZHITOV, 2002; CEKICI et al., 2014). Essa resposta inicial é um mecanismo de defesa fisiológico, levando ao desenvolvimento da gengivite (LINDHE, 2014).

Essa resposta inflamatória resulta na formação de um infiltrado celular inflamatório nos tecidos subjacentes à bolsa periodontal (PAGE, SCHROEDER, 1976); na liberação de citocinas e quimiocinas, através das quais células inflamatórias são recrutadas para o tecido gengival; e há propagação da inflamação (KAYAL, 2013). A disseminação do processo inflamatório em direção ao tecido conjuntivo adjacente leva à destruição dos tecidos de suporte do elemento dental e à reabsorção óssea, sinais cardinais das periodontites (GRAVES, 1999).

A persistência da lesão leva à ativação da resposta imune adaptativa pelo processamento dos antígenos e sua apresentação por células dendríticas e macrófagos às células T (CEKICI et al., 2014). A evolução da doença é acompanhada pela produção e liberação de citocinas como Interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 e Fator de necrose tumoral (TNF- α) (ALVES, SILVEIRA, 2009).

As células do sistema imunológico, dentre elas neutrófilos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos, são encontradas em todas as fases da doença periodontal, compondo o infiltrado inflamatório, no entanto, nas doenças periodontais os sinais e mecanismos inflamatórios estão desregulados (COLE, SEYMOUR, POWELL, 1987).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células Th17 (HARRINGTON et al., 2005), a quais se diferenciam a partir de células TCD4+ naive por meio da ação das citocinas TGF- β , IL-1 β e IL-6 (HARRINGTON et al., 2005; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). Ela medeia a liberação de IL-6 e IL-8, resultando na migração e ativação de neutrófilos (MIOSSEC, KOLLS, 2012), e atua no processo de osteoclastogênese (ESKAN et al., 2012), sendo implicada na patogênese das doenças periodontais, pois evidências sugerem que células Th17 produtoras de IL-17 estão presentes em tecidos com PC (CARDOSO et al., 2009).

Uma importante citocina para a manutenção e expansão de células Th17, é a IL-23 (HARRINGTON et al., 2005). Ela vem sendo apontada como uma importante molécula na patogênese das periodontites (MOUTSOPOULOS et al., 2012), devido aos seus efeitos na osteoclastogênese (MA et al., 2017) e na estimulação do desenvolvimento de células T patogênicas, caracterizadas pela produção de IL-17, IL-6 e TNF (LANGRISH et al., 2005).

A IL-8, também conhecida como CXCL8, é importante nos processos inflamatórios devido à sua propriedade quimiotática de neutrófilos (BAGGIOLINI, WALZ, KUNKEL, 1989), recrutando estas células para o sulco gengival através do tecido periodontal vascularizado (PETKOVIC et al., 2010). Ela é secretada por vários tipos celulares (LAWLOR, CAMP, GREAVES, 1992) e induz a adesão de células polimorfo nucleares no endotélio vascular (CARVETH et al., 1989).

A IL-8 é expressa por queratinócitos gengivais, leucócitos e células endoteliais microvasculares (SFAKIANAKIS, BARR, KREUTZER, 2002) e vários estímulos podem induzir sua produção, tais como citocinas, LPS e produtos virais (GAMONAL et al., 2000). As bactérias do “complexo vermelho” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), principais constituintes do biofilme e estritamente relacionadas com a patogênese das doenças periodontais, podem modular a expressão da IL-8 no epitélio gengival (BELIBASAKIS, THURNHEER, BOSTANCI, 2013).

A IL-6 parece estar envolvida com as fases iniciais da doença periodontal (EBERSOLE et al., 2014) e seus níveis no FCG e na saliva reduzem com a resolução da gengivite (LEISHMAN, SEYMOUR, FORD, 2013). Ela atua em sinergismo com a IL-1 β , intensificando a inflamação (SAWADA et al., 2013) e fibroblastos gengivais obtidos de tecidos com periodontite são mais responsivos ao LPS da *P. gingivalis* do que fibroblastos de tecidos saudáveis, secretando níveis elevados de IL-6 quando expostos por menos tempo e em menor dose a este fator de virulência (KANG, HU, GE, 2016). Rifas e Avioli (1999) descreveram uma nova citocina osteoclastogênica derivada de células T que apresenta habilidade de estimular a produção de IL-6 em osteoblastos humanos. Esta citocina foi denominada Fator Osteoclastogênica Secretado de Células T Ativadas (SOFAT) e induz a osteoclastogênese independente do sistema RANK/RANKL (RIFAS, WEITZMANN, 2009). O SOFAT induz a produção de IL-6 por osteoblastos e estimula a formação de osteoclastos a partir de monócitos na ausência de osteoblastos ou RANKL exógeno (RIFAS, WEITZMANN, 2009).

A IL-1 β é produzida por células TCD4+ obtidas de pacientes com periodontite agressiva e estimuladas com *P. gingivalis* (GONZALES et al., 2014) e está envolvida com a diferenciação de osteoclastos (AKIYAMA et al., 2014). Nas periodontites, o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) não é capaz de reduzir a produção da IL-1 β (GILOWSKI et al., 2014), a qual está associada com a ativação do inflamassoma NLRP3 (MONTENEGRO RAUDALES et al., 2016).

Esta pesquisa tendo como objetivo determinar a relação entre as doenças periodontais e os níveis de citocinas e quimiocinas produzidos localmente, uma vez que, a IL-6 e a IL-8 tem papel importante em processos inflamatórios gerais.

2. JUSTIFICATIVA

A periodontite crônica e agressiva caracteriza-se por rápida perda de inserção e destruição óssea. A rápida destruição periodontal é um fator de extrema importância a ser estudada, pois, além da presença de uma infecção composta por uma microbiota altamente virulenta, existe ainda, o alto nível de susceptibilidade do indivíduo, podendo a resposta imune ser um fator determinante na extensão do dano tecidual. Segundo alguns autores, em função do acúmulo de biofilme, ocorre um aumento da inflamação, e consequentemente, o aumento do número de microrganismos e seus metabólitos, levam a um aumento de IL-8 que irá estimular a migração contínua de neutrófilos através dos tecidos periodontais. A IL-6 também tem sido demonstrada na saliva e no fluido gengival e níveis elevados desta citocina, está associada com a gravidade da destruição periodontal. Desta forma, células e diversas moléculas do sistema imune parecem contribuir na ativação de uma resposta imune intensa, influenciando ativamente na gravidade doença. Os mecanismos da resposta do hospedeiro na gravidade da agressão inicial e a duração da doença, merecem mais esclarecimentos. Conhecer o padrão que diferencie os portadores da periodontite agressiva dos indivíduos saudáveis irá auxiliar no diagnóstico precoce da doença e na introdução de novas abordagens terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de citocina no fluido crevicular gengival de pacientes com e sem doença periodontal.

3.2 Objetivo específico

Analisar os níveis da quimiocinas IL-8 e das citocinas IL-6 e IL-1 β no fluido gengival de pacientes com e sem doença periodontal (grupo controle).

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização da Amostra

Este estudo será constituído por 69 pacientes, onde obteve-se amostras de Fluido Crevicular Gengival (FCG) para compor 3 grupos: controle (n=20), gengivite (G) (n=20) e periodontite crônica (PC) (n=29). O grupo controle foi composto por indivíduos que não apresentaram parâmetros clínicos e radiográficos característicos da doença periodontal; e os grupos PC e G por indivíduos com doença periodontal, agrupados de acordo com a classificação proposta pela Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999).

4.2 Recrutamento dos pacientes

Os pacientes dos grupos controle, PC e G, com idade entre 13 e 76 anos de idade, independente do gênero, foram recrutados na Policlínica Odontológica Integrada da Universidade de Uberaba (UNIUBE), no período de setembro de 2016 a maio de 2017. Os indivíduos deste estudo foram submetidos à anamnese, exames clínicos, exames periodontais e radiográficos. O exame periodontal foi realizado por um único calibrador, foi utilizada sonda milimetrada e obteve-se os seguintes parâmetros: profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem.

Foram excluídos os pacientes tabagistas, em uso de imunossuppressores, diabéticos, positivos para o HIV, portadores de doenças autoimunes, portadores de periodontite agressiva e indivíduos submetidos a tratamento periodontal previamente à coleta do material. Também foram excluídos os elementos dentais com tratamento endodôntico prévio e aqueles com lesões endodônticas. Estes critérios foram verificados por meio de anamnese, análise de prontuários e através de exames clínicos e radiográficos. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob número CAAE 57940216.0.0000.515; parecer 1.754.646.

4.3 Coleta do Material

A coleta do líquido crevicular é um procedimento não invasivo e foi realizada utilizando cone de papel absorvente inserido no interior do sulco gengival.

Para o grupo controle, PC e G foi coletado FCG de pacientes com gengiva saudável e de pacientes com doença periodontal (PC e gengivite), respectivamente. Neste último caso, a coleta foi realizada nos sítios mais comprometidos periodontalmente. Previamente à coleta, secou-se a mucosa gengival com seringa tríplice e realizou-se o isolamento relativo com roletes de algodão. Em seguida, o cone de papel (Meta®Biomed, Korea) foi inserido no sulco gengival, onde foi mantido por 30 segundos. Foram coletados 5 cones de cada paciente, os quais foram colocados em 150µl de solução tampão contendo PBS 1X, TLCK e NP40; e foram congelados em freezer a -70°C.

4.4 Quantificação de Citocinas por CBA

A IL-8, IL-1 β e IL-6 foram dosadas utilizando-se a técnica de Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences, EUA), conforme instruções do fabricante. As amostras e as citocinas recombinantes foram incubadas com microesferas com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina. Em seguida, foram adicionados anticorpos (Ac) específicos para cada citocina conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE). Após incubação, as microesferas foram lavadas com solução própria do kit do fabricante e analisadas em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, EUA) utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, EUA). As microesferas específicas para cada citocina foram separadas pela emissão de intensidades diferentes de fluorescência emitida à 660nm e a quantidade de citocina conjugada a cada uma delas pela intensidade de fluorescência emitida à 585nm. Após aquisição dos dados das amostras e citocinas recombinantes, estes foram levados ao software FCAP Array 2.0 (SoftFlow-EUA) e as concentrações das citocinas foram calculadas a partir da curva padrão. Posteriormente, as concentrações foram corrigidas pela concentração total de proteínas presentes no FCG, previamente quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® 2000.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A verificação da distribuição das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. As variáveis apresentaram distribuição não normal e foram analisadas pelos testes não paramétricos Mann-Whitney (MW) para comparação de dois grupos ou Kruskal-Wallis (KW) seguido pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos. Os dados foram expressos em mediana com valores mínimo e máximo e percentis. A correlação entre duas variáveis com distribuição não normal foi analisada pelo teste de Spearman (rS). Os resultados serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos pacientes

Foram avaliadas 69 amostras de FCG, sendo 20 do grupo controle, 20 do grupo com gengivite e 29 do grupo PC, cuja média de idade dos pacientes foi de 22,00, 23,79 e 48,69 anos, respectivamente. O grupo controle foi constituído de 5 pacientes do sexo masculino e 15 do feminino; o grupo com gengivite foi constituído de 4 pacientes do sexo masculino e 16 do feminino; e o grupo PC de 11 pacientes do sexo masculino e 18 do feminino. No grupo controle foi encontrada uma profundidade de sondagem média de 3mm, considerada normal e a perda de inserção clínica e o sangramento à sondagem foram zero. No grupo G encontrou-se profundidade de sondagem normal, ou seja, 3mm, ausência de perda de inserção clínica e sangramento à sondagem em 95% dos casos, característica comum em pacientes com esta condição periodontal. No grupo PC os pacientes apresentaram profundidade de sondagem maior que 3mm, com uma média de 7,16mm; a média da perda de inserção clínica foi de 8,05mm e o sangramento durante a sondagem foi observado em 7,4% dos casos, conforme tabelas a seguir.

Tabela 1 - Características demográficas e periodontais dos pacientes do grupo controle, grupo gengivite e do grupo periodontite crônica. Análise respectiva às amostras de fluido crevicular gengival (FCG).

	Controle (n=20)	G (n=20)	PC (n=29)
Gênero (M/F)	5 (25%) / 15 (75%)	4 (20%) / 16 (80%)	11 (38%) / 18 (62%)
Idade (média e desvio padrão)	22,00 +/- 1,58*	23,79 +/- 11,2**	48,69 +/- 11,15*/**
Profundidade de sondagem (média e desvio padrão)	3mm +/- 0*	3mm +/- 0**	7,16mm +/- 2,83*/**
Perda de inserção clínica (média e desvio padrão)	0*	0**	8,05mm +/- 3,38*/**
Sangramento à sondagem	0	95%	7,4%

*p<0,0001 - Controle versus Periodontite crônica

**p<0,0001 – Gengivite versus Periodontite crônica

5.2 Análise da IL-6, IL-1 β e IL-8 por CBA nas Amostras de FCG

A concentração da IL-6 (KW $p=0.0018$) e IL-1 β (KW $p<0.0001$) foi significativamente maior no grupo PC e gengivite quando comparada com o grupo controle. Não houve diferença na concentração de IL-8 (KW $p=0.3427$) (Figura C).

Figura A

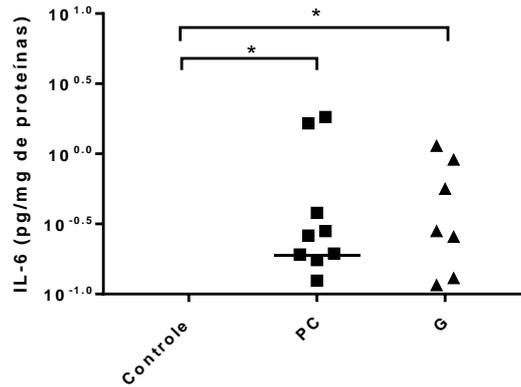


Figura B

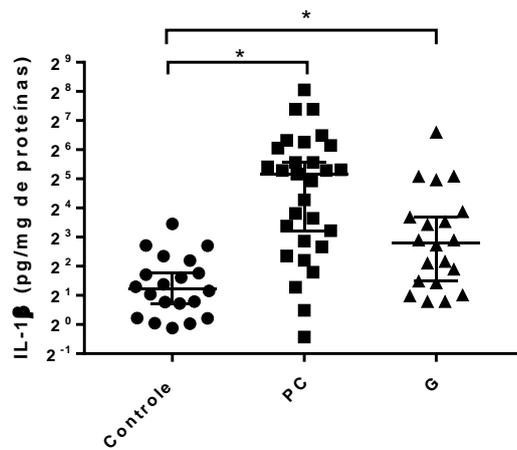
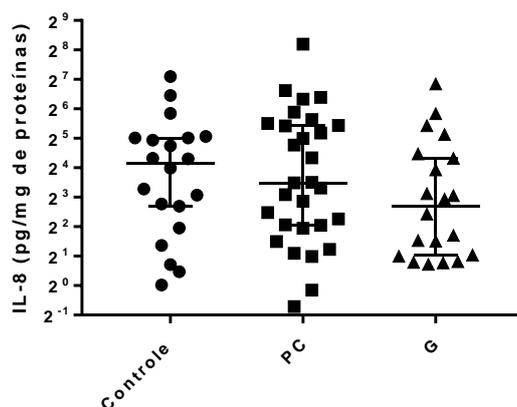


Figura C



Quantificação da IL-6 (A), IL-1 β (B) e IL-8 (C) avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes controle, pacientes com PC e pacientes com gengivite. Os resultados são apresentados como a quantidade de proteínas relativas em relação às proteínas totais presentes no líquido. Os dados são expressos em mediana, valores mínimo e máximo e percentis.

Ao compararmos apenas o grupo de periodontite crônica e o grupo de gengivite observou-se que não houve diferença na concentração das citocinas IL-6 (MW $p=0.8726$) e IL-8 (MW, $p=0.1588$), porém a IL-1 β (KW $p=0.0076$) foi significativamente maior no grupo 1.

Figura D

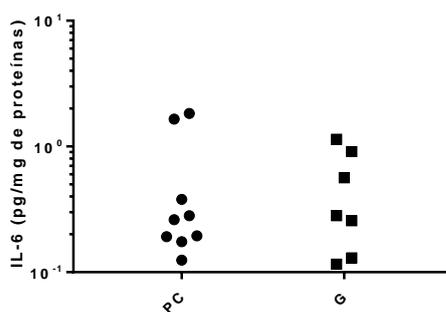


Figura E

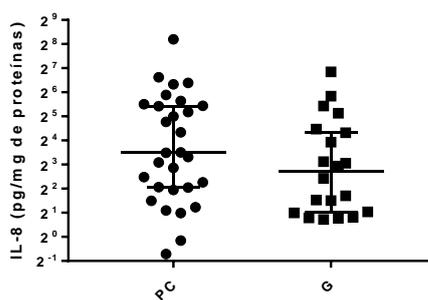
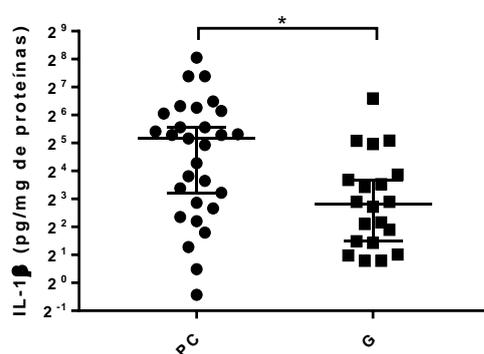


Figura F



Quantificação da IL-6 (D), IL-8 (E) e IL-1 β (F) avaliada por CBA nas amostras de FCG de pacientes com PC e G. Os resultados são apresentados como a concentração de proteínas relativas em relação à concentração de proteínas totais presentes no líquido. Os dados são expressos em mediana, valores mínimo e máximo e percentis.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a concentração da IL-6, IL-1 β e IL-8 no FCG de pacientes com gengivite e periodontite crônica e de pacientes do grupo controle.

Em relação ao gênero dos pacientes com periodontite crônica, a maioria era do sexo feminino. Nos casos de gengivite, 20% eram do sexo masculino e 80% do sexo feminino. Nossos resultados contrastam com outros estudos que mostraram que o sexo masculino é o mais propenso a desenvolver periodontite (HONG et al., 2016), no entanto, Zorina e colaboradores (2016) relataram que o sexo feminino apresenta maior risco de desenvolver a doença. Em relação á gengivite, nosso trabalho corrobora outros achados que demonstram ser o sexo feminino o mais acometido por gengivite (CARVAJAL et al., 2016).

Estes resultados estão de acordo com outros autores que relatam que a periodontite é mais comum em indivíduos adultos e com idades mais avançadas (HONG et al., 2016); e que a gengivite acomete adultos e adolescentes (CARVAJAL et al., 2016). O levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde do Brasil em 2004 revelou que a gengivite é mais comum em indivíduos jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Assim, estes dados demonstram que a gravidade das doenças periodontais aumenta com o avançar da idade, conforme demonstrado por Rivas, Salas, Treviño (2000) e Lindhe (2014).

Em relação à citocina IL-1 β , os nossos resultados mostraram um aumento significativo da mesma no grupo de periodontite crônica comparada com o grupo de gengivite e o grupo controle e também houve diferença entre gengivite e o controle. Níveis elevados desta molécula são encontrados em amostras de pacientes com periodontite (GUMUS et al., 2014; ZHU et al., 2015; RANGBULLA et al., 2017), mas diminui significativamente após tratamento periodontal (RANGBULLA et al., 2017). No entanto, outros autores não encontraram diferença significativa na concentração da IL-1 β na ausência ou na presença de periodontite crônica (MOURA et al., 2017). Ela está correlacionada com importantes parâmetros clínicos periodontais, tais como sangramento a sondagem, perda de inserção clínica e profundidade de sondagem (SAKALOUSKIENE et al., 2016). A IL-1 β é produzida por células TCD4+ obtidas de pacientes com periodontite agressiva e estimuladas com *P. gingivalis* (GONZALES et al., 2014) e está envolvida com a diferenciação de osteoclastos (AKIYAMA et al., 2014). Nas periodontites, o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) não é capaz de

reduzir a produção da IL-1 β (GILOWSKI et al., 2014), a qual está associada com a ativação do inflamassoma NLRP3 (MONTENEGRO RAUDALES et al., 2016). Enfim, nossos achados reforçam a ideia de que a IL-1 β está envolvida com a progressão/gravidade das doenças periodontais, conforme sugerido por outros estudos, os quais também demonstraram a produção aumentada desta citocina na periodontite crônica em relação á gengivite (OROZCO et al., 2006).

No presente estudo, a concentração da IL-6 foi estatisticamente diferente entre os grupos, sugerindo que esta citocina pode estar colaborando no processo de reabsorção óssea. Em modelos experimentais não foi observada diferença na expressão da IL-6 entre o grupo controle e o grupo com periodontite induzida por ligadura (MATSUDA et al., 2016). No entanto, Ebersole e colaboradores (2015) e Zhang e colaboradores (2016) demonstraram que os níveis de IL-6 na saliva e no FCG aumentam com a gravidade da destruição periodontal.

Outros dados apontam o papel da IL-6 na patogênese das doenças periodontais (NOH et al., 2013; EBERSOLE et al., 2015; ZHANG et al., 2016). A IL-6 parece estar envolvida com as fases iniciais da doença periodontal (EBERSOLE et al., 2014) e seus níveis no FCG e na saliva reduzem com a resolução da gengivite (LEISHMAN, SEYMOUR, FORD, 2013). Ela atua em sinergismo com a IL-1 β , intensificando a inflamação (SAWADA et al., 2013) e fibroblastos gengivais obtidos de tecidos com periodontite são mais responsivos ao LPS da *P. gingivalis* do que fibroblastos de tecidos saudáveis, secretando níveis elevados de IL-6 quando expostos por menos tempo e em menor dose a este fator de virulência (KANG, HU, GE, 2016). Assim sendo, nossos dados sugerem que, em resposta ao biofilme e aos microrganismos, células presentes nos tecidos periodontais secretam IL-6 de forma contínua, contribuindo para a progressão da gengivite em periodontite.

A IL-8 é expressa por queratinócitos gengivais, leucócitos e células endoteliais microvasculares (SFAKIANAKIS, BARR, KREUTZER, 2002) e vários estímulos podem induzir sua produção, tais como citocinas, LPS e produtos virais (GAMONAL et al., 2000).

As bactérias do “complexo vermelho” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), principais constituintes do biofilme e estritamente relacionadas com a patogênese das doenças periodontais, podem modular a expressão da IL-8 no epitélio gengival (BELIBASAKIS, THURNHEER, BOSTANCI, 2013). De acordo com Ertugrul e colaboradores (2013), o aumento dos níveis desta citocina no

FCG é proporcional à gravidade da doença periodontal e da inflamação. Ainda segundo os autores, em função do acúmulo de biofilme, do aumento da inflamação e do aumento do número de microrganismos e seus metabólitos, a IL-8 estimula a migração contínua de neutrófilos através dos tecidos periodontais para o FCG. Níveis elevados da IL-8 estão presentes em amostras de tecidos gengivais e de FCG de pacientes com periodontite e gengivite (GAMONAL et al., 2000; ERTUGRUL et al., 2013; LAGDIVE et al., 2013; NOH et al., 2013), mas sua quantidade reduz após tratamento periodontal (GAMONAL et al., 2001). A presença desta molécula em tecidos gengivais periodontalmente comprometidos também tem sido demonstrada por meio de estudos imunohistoquímicos (KOSS et al., 2014). No entanto, outros estudos demonstraram que a concentração de IL-8 é maior no grupo controle do que no grupo de pacientes com PC (GOUTOUDI, DIZA, ARVANITIDOU, 2012). Outro estudo descreveu que há uma correlação forte entre a quantidade de IL-8 e atividade da enzima elastase, produzida por neutrófilos no FCG de pacientes com periodontite, cujo biofilme é colonizado pelos microrganismos *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola* (JIN, SODER, CORBET, 2000). Assim sendo, nossos dados sugerem os microrganismos presentes no biofilme são capazes de induzir a produção de IL-8, a qual atrai neutrófilos para o sulco gengival no intuito de eliminar os periodontopatógenos, no entanto o contínuo recrutamento dessas células pode contribuir para o dano tecidual associado às doenças periodontais.

A similaridade na produção de IL-8 entre os grupos deve-se ao fato de que o sulco gengival é uma região de constante estímulo antigênico, requerendo a presença de células imunes atraídas para o microambiente gengival por moléculas quimiotáticas como a IL-8 (GAMONAL et al., 2000).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Na análise proteica a concentração das citocinas IL-6 e IL-1 β foi significativamente maior no grupo PC e G quando comparada com o grupo controle.
- ✓ Não houve diferença na concentração da IL-8

8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados e das limitações do presente estudo, conclui-se que IL-6 e IL-1 β podem estar envolvidos nas diferentes fases das doenças periodontais, seja na tentativa de evitar danos adicionais ou exacerbá-los, porém mais estudos são necessários para confirmar nossos achados e esclarecer o papel destas e outras moléculas.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 942-9, 2007.

AKIYAMA, T. et al. Porphyromonas gingivalis-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta but suppresses that by interleukin-17A: importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. **J Biol Chem**, v. 289, n. 22, p. 15621-30, 2014.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J Clin Invest**, v. 84, n. 4, p. 1045-9, 1989.

BAUM, R.; GRAVALLESE, E. M. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. **Curr Osteoporos Rep**, v. 12, n. 1, p. 9-16, 2014.

BELIBASAKIS, G. N.; THURNHEER, T.; BOSTANCI, N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the "red complex" species. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81581, 2013.

BROWN, L. J.; LOE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 2, p. 57-71, 1993.

CARDOSO, C. R. et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2009.

CARVAJAL, P. et al. Prevalence, severity, and risk indicators of gingival inflammation in a multi-center study on South American adults: a cross sectional study. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 5, p. 524-534, 2016.

CARVETH, H. J. et al. Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 162, n. 1, p. 387-93, 1989.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 64, n. 1, p. 57-80, 2014.

COLE, K. L.; SEYMOUR, G. J.; POWELL, R. N. Phenotypic and functional analysis of T cells extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. **J Periodontol**, v. 58, n. 8, p. 569-73, 1987.

CONSENSUS REPORT. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. **Ann Periodontol**, v. 1, n. 1, p. 926-32, 1996.

DA SILVA, M. D. et al. IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 1, p. 19-31, 2015.

EBERSOLE, J. L. et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 9, p. 853-61, 2014.

ESKAN, M. A. et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. **Nat Immunol**, v. 13, n. 5, p. 465-73, 2012.

FLEMMIG, T. F. Periodontitis. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 32-8, 1999.

GAMONAL, J. et al. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. **J Periodontol**, v. 71, n. 10, p. 1535-45, 2000.

GAMONAL, J. et al. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 3, p. 194-203, 2001.

GILOWSKI, L. et al. Amount of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 7, p. 729-34, 2014.

GONZALES, J. R. et al. T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with Porphyromonas gingivalis. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 7, p. 1835-43, 2014.

GOUTOUDI, P.; DIZA, E.; ARVANITIDOU, M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. **Int J Dent**, v. 2012, 2012.

GRAVES, D. T. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 482-490, 1999.

GUMUS, P. et al. Saliva and serum levels of pentraxin-3 and interleukin-1beta in generalized aggressive or chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 85, n. 3, 2014.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-32, 2005.

HONG, M. et al. Prevalence and risk factors of periodontitis among adults with or without diabetes mellitus. **Korean J Intern Med**, v. 31, n. 5, p. 910-9, 2016.

JANEWAY JUNIOR., C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JIN, L.; SODER, B.; CORBET, E. F. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 929-39, 2000.

KANG, W.; HU, Z.; GE, S. Healthy and Inflamed Gingival Fibroblasts Differ in Their Inflammatory Response to Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide. **Inflammation**, v. 39, n. 5, p. 1842-52, 2016.

KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **Biomed Res Int**, v. 2013, 2013.

KONG, Y. Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, n. 6717, p. 315-23, 1999.

KOSS, M. A. et al. Histopathologic and histomorphometric studies and determination of IL-8 in patients with periodontal disease. **J Indian Soc Periodontol**, v. 18, n. 2, p. 145-9, 2014.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v. 201, n. 2, p. 233-40, 2005.

LAWLOR, F.; CAMP, R.; GREAVES, M. Epidermal interleukin 1 alpha functional activity and interleukin 8 immunoreactivity are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. **J Invest Dermatol**, v. 99, n. 4, p. 514-5, 1992.

LEISHMAN, S. J.; SEYMOUR, G. J.; FORD, P. J. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. **Dis Markers**, v. 35, n. 5, p. 543-9, 2013.

LINDHE, J. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 13, n. 5, p. 418-30, 1986.

LIU, Y. C.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontol** **2000**, v. 52, n. 1, p. 163-206, 2010.

MA, N. et al. Involvement of interleukin23 induced by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. **Mol Med Rep**, v. 15, n. 2, p. 559-566, 2017.

MATSUDA, Y. et al. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. **J Periodontal Res**, v. 51, n. 5, p. 639-46, 2016.

MATSUSHIMA, K. et al. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. **J Exp Med**, v. 169, n. 4, p. 1485-90, 1989.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 763-76, 2012.

MONTENEGRO RAUDALES, J. L. et al. Dental Calculus Stimulates Interleukin-1beta Secretion by Activating NLRP3 Inflammasome in Human and Mouse Phagocytes. **PLoS One**, v. 11, n. 9, 2016.

MOURA, M. F. et al. Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1beta, Tumor Necrosis Factor-alpha, Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. **J Periodontol**, v. 88, n. 8, p. 778-787, 2017.

MOUTSOPOULOS, N. M. et al. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. **J Autoimmun**, v. 39, n. 4, p. 294-303, 2012.

NOH, M. K. et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. **Exp Ther Med**, v. 6, n. 3, p. 847-851, 2013.

OROZCO, A. et al. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 4, p. 256-60, 2006.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest**, v. 34, n. 3, p. 235-49, 1976.

PETKOVIC, A. B. et al. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 5, p. 478-85, 2010.

PIHLSTROM, B. L.; TABAK, L. The National Institute of Dental and Craniofacial Research: research for the practicing dentist. **J Am Dent Assoc**, v. 136, n. 6, p. 728-37, 2005.

RANGBULLA, V. et al. Salivary IgA, Interleukin-1beta and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. **Chin J Dent Res**, v. 20, n. 1, p. 43-51, 2017.

RIFAS, L.; AVIOLI, L. V. A novel T cell cytokine stimulates interleukin-6 in human osteoblastic cells. **J Bone Miner Res**, v. 14, n. 7, p. 1096-103, 1999.

RIFAS, L.; WEITZMANN, M. N. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 11, p. 3324-35, 2009.

SAKALAUSKIENE, J. et al. Peripheral Blood Leukocytes Interleukin-1 Beta (IL-1beta) Cytokine Hyper-Reactivity in Chronic Periodontitis. **Med Sci Monit**, v. 22, p. 4323-4329, 2016.

SAWADA, S. et al. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1beta and IL-6. **Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 31-40, 2013.

SFAKIANAKIS, A.; BARR, C. E.; KREUTZER, D. L. Localization of the chemokine interleukin-8 and interleukin-8 receptors in human gingiva and cultured gingival keratinocytes. **J Periodontal Res**, v. 37, n. 2, p. 154-60, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES SEM DOENÇA PERIODONTAL QUE CONSTITUÍRAM O GRUPO CONTROLE.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP**

Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia CEP:
38025-100 – Uberaba(MG) Telefone: (0**34) 3700-6776 - E-mail:
cep@pesqpg.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto: “Análise da natureza e intensidade do processo
inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”**

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA GRUPO CONTROLE

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo **“Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”**. O objetivo deste estudo é avaliar a saúde da sua boca e verificar a resposta do seu sistema de defesa nas inflamações na gengiva. Caso participe, será necessário comparecer ao Serviço de Odontologia da UFTM em Uberaba-MG para uma consulta odontológica onde responderá um questionário e sua boca será examinada. Se sua gengiva se apresentar saudável coletar-se-á sulco gengival, que é feita com cones de papel. Em caso de indicação de extração de terceiro molar incluso, sem nenhuma patologia, será realizada a coleta de fragmentos de osso e gengiva. Não será feito nenhum procedimento que traga qualquer risco à sua vida. Poderá apenas ter algum desconforto decorrente do procedimento cirúrgico, mas será orientado pelos profissionais habilitados. Você receberá orientações específicas sobre saúde bucal e prevenção de doenças como cárie dental e periodontite (doença na gengiva). Além disso, receberá

tratamento da gengiva (raspagem sub e supra gengival e profilaxia) e procedimentos odontológicos básicos como restaurações dentárias e exodontias.

Você poderá obter 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 números e letras aleatórios.

Este estudo vai permitir entender melhor como ocorrem as inflamações na boca, especialmente junto á gengiva do dente, que são causas de muita dor e ás vezes leva á perda do dente. Entender melhor a doença irá permitir que novos tratamentos sejam utilizados para a recuperação mais rápida da doença. Assim, sua participação é de suma importância.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto: “Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a qual procedimento 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, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo. Recebo neste ato uma via deste Termo.

Uberaba,//.....

Documento de

Identidade:

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior –

Orientador do projeto: (34) 3318-5289

Lorena Teodoro de Castro Cassanta - aluna de mestrado: (34) 98427-7339

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone 3700-6776.

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL QUE CONSTITUÍRAM O GRUPO EXPERIMENTAL.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia CEP:

38025-100 – Uberaba (MG) Telefone: (0**34) 3700-6776 - E-mail:

cep@pesqpg.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **“Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”**

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA GRUPO DE ESTUDO

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo **“Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”**. O objetivo deste estudo é avaliar a saúde da sua boca e, caso seja encontrada alguma doença periodontal (doença na gengiva), verificar a resposta do seu sistema de defesa a essas inflamações. Caso participe, será necessário comparecer ao Serviço de Odontologia da UFTM em Uberaba-MG para uma consulta odontológica onde responderá um questionário e sua boca será examinada. Caso você apresente alguma doença gengival coletar-se-á sulco gengival, que é feita com cones de papel; e caso haja indicação clínica de extração do elemento dental com doença periodontal, serão coletados fragmentos de osso e gengiva. Não será feito nenhum procedimento que traga qualquer risco à sua vida. Poderá apenas ter algum desconforto decorrente do procedimento cirúrgico, mas será orientado pelos profissionais habilitados. Você receberá orientações específicas sobre saúde bucal e prevenção de doenças como cárie dental e periodontite (doença na gengiva). Além disso, receberá tratamento da gengiva

(raspagem sub e supra gengival e profilaxia) e procedimentos odontológicos básicos como restaurações dentárias e exodontias.

Você poderá obter 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 números e letras aleatórios.

Este estudo vai permitir entender melhor como ocorrem as inflamações na boca, especialmente junto á gengiva do dente, que são causas de muita dor e ás vezes leva à perda do dente. Entender melhor a doença irá permitir que novos tratamentos sejam utilizados para a recuperação mais rápida da doença. Assim, sua participação é de suma importância.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto: “Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas Doenças Periodontais humanas”

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a qual procedimento 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, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo. Recebo neste ato uma via deste Termo.

Uberaba ,.....//.....

_____ Documento de
Identidade:

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior –
orientador do projeto: (34) 3318-5289

Lorena Teodoro de Castro Cassanta - aluna de mestrado: (34) 98427-7339

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone 3700-6776.

ANEXO C

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: APROVAÇÃO DO PROJETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da natureza e intensidade do processo inflamatório nas doenças periodontais humanas.

Pesquisador: Virmondes Rodrigues Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57940216.0.0000.5154

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.754.646

Continuação do Parecer: 1.754.646

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_731034.pdf	14/09/2016 15:21:53		Aceito
Outros	Termo_anuencia_Uniube.pdf	14/09/2016 15:21:19	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Grupo_de_Estudo_corrigido.doc	14/09/2016 15:18:42	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Grupo_Contrôle_corrigido.doc	14/09/2016 15:17:59	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_CEP_corrigido.doc	14/09/2016 15:17:40	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/09/2016 12:11:12	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	TermoanuenciaUniube.pdf	30/08/2016 19:44:30	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado