



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



SÂMIA CRUZ TFAILE CORBI

AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E DA
RESPOSTA AO TRATAMENTO PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICO EM INDIVÍDUOS COM E
SEM HAPLÓTIPOS DE SUSCETIBILIDADE
GENÉTICA À PERIODONTITE CRÔNICA NO
GENE *INTERLEUCINA 8*

ARARAQUARA
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

SÂMIA CRUZ TFAILE CORBI

AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E DA
RESPOSTA AO TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO-
CIRÚRGICO EM INDIVÍDUOS COM E SEM
HAPLÓTIPOS DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À
PERIODONTITE CRÔNICA NO GENE
INTERLEUCINA 8

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, - Área de
Periodontia, da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista,
para o título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

ARARAQUARA
2010

SÂMIA CRUZ TFAILE CORBI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E DA
RESPOSTA AO TRATAMENTO PERIODONTAL
NÃO-CIRÚRGICO EM INDIVÍDUOS COM E SEM
HAPLÓTIPOS DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À
PERIODONTITE CRÔNICA NO GENE
*INTERLEUCINA 8***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

3º Examinador: Profa. Dra. Andrea Marcia Marcaccini

Araraquara, 25 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES

Sâmia Cruz Tfaile Corbi

NASCIMENTO	18 de Janeiro de 1984 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Jeferson Luís Corbi Sálua Cruz Tfaile
2004/2007	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2008/2010	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

À Deus,

Por estar sempre presente em minha vida, iluminando, protegendo e guiando-me, oferecendo, constantemente, forças para eu conseguir vencer os obstáculos e dificuldades do dia-a-dia com muita serenidade, perseverança e coragem.

Aos meus pais Jeferson e Sálua,

Pelo amor incondicional e que por meio de muita renúncia, compreensão e enorme incentivo, possibilitaram a realização desta conquista! Minha eterna gratidão. Tenho muito orgulho de vocês serem os meus pais!

À minha irmã Sâmara,

Por estar sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando, com muita paciência e dedicação. Muito obrigada pelo seu carinho e assistência em todas as etapas da minha vida! Adoro ter você como minha irmã!

Ao meu namorado Deiwes,

Por seu incentivo e amor, que impulsionam e completam minha vida. Muito obrigada pelo seu respeito e dedicação em todos os momentos, tornando os dias mais fáceis e alegres!

Agradecimentos Especiais

Aos meus **Familiares**,

Que são parte da minha história, torcendo sempre pelas minhas conquistas e vibrando com as minhas vitórias. Muito obrigada pelo carinho, apoio e incentivo!

À minha orientadora

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga,

Pela confiança em mim depositada, conduzindo meu trabalho de maneira generosa e paciente, oferecendo-me novos desafios e ajudando-me a vencê-los. Minha admiração e gratidão à você, que soube ser professora, mestre e amiga, fornecendo-me a base para a minha formação científica, acadêmica e pessoal!

À **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio,**

Por ter me apresentado à Periodontia, contribuindo para que eu chegasse até o curso de Mestrado. Agradeço pelo início de tudo e pela amizade tão especial!

À Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach e

à Pós-Doutoranda Andrea Marcia Marcaccini,

da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio imensurável oferecido neste trabalho. Muito obrigada por toda ajuda e paciência na parte experimental. Agradeço pela atenção, confiança e disponibilidade!

À Profa. Dra. Marisa Veiga Capela,

do Instituto de Química – UNESP, por toda atenção, paciência e enorme dedicação com os cálculos estatísticos. Agradeço infinitamente sua colaboração e apoio.

Às amigas e mestrandas

Giovana Anovazzi , Lívia Finoti e Márcia Tanaka,

Pela amizade e colaboração em todas as etapas deste trabalho. Agradeço infinitamente os esforços por vocês depositados na realização desta pesquisa, impossível sem a participação de vocês! Muito obrigada pela dedicação e apoio!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. **José Cláudio Martins Segalla**, e da Vice-Diretora, Profa. Dra. **Andreia Affonso Barretto Montandon**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação do Programa de Periodontia, pela excelente formação, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. **Benedicto Egbert Corrêa de Toledo**, Prof. Dr. **Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Prof. Dr. **Elcio Marcantonio Junior**, Prof. Dr. **José Eduardo Cezar Sampaio**, Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior**, que colaboraram coma minha formação em especial aos Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** e Profa.

Dra. **Silvana Regina Perez Orrico**, pela co-orientação durante a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos de turma de Mestrado: **Alliny, André, Andressa, Chaine, Guilherme, João, Leila, Lívia, Lucas, Mariana, Michele e Telma**, pela amizade sincera e pelos bons momentos de convivência.

Aos colegas da Pós-Graduação: **Ana Lúcia, Andrés, Dani Spirandelli, Humberto, Marina, Nicole, Nicolau, Roberta, Rodrigo, Sabrina, Shelon, Wagner e Yeon**, pela convivência harmoniosa e companheirismo.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Claudinha, D. Maria do Rosário, D. Teresa, Maria José (Zezé), Ester, Regina Lúcia, Thelma, Sueli, Toninho**, cujo trabalho e dedicação possibilitou a realização desse trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente **Margarete**, pela atenção e disponibilidade que sempre me atendeu e aos demais funcionários e colegas do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia**, pela gentileza com que sempre me receberam, paciência, competência e por resolverem tantas dúvidas!

Aos funcionários da Biblioteca, **Maria Helena, Marley, Eliane, Odete, Adriano, Maria Inês, Silvia Helena e Ceres**, pela atenção e excelente revisão bibliográfica.

Aos funcionários da **Triagem** e da **Esterilização**, pela disponibilidade, atenção e compreensão que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos **Pacientes**, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas e que com amabilidade compreenderam meu desafio e dividiram esta responsabilidade comigo!
Muito obrigada!

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas	13
Resumo	15
Abstract	18
1 Introdução	21
2 Revisão de Literatura	25
2.1 Doença periodontal e seu caráter multifatorial.....	26
2.2.1 Fatores microbiológicos envolvidos na DP.....	27
2.2.2 Fatores imunológicos envolvidos na DP	28
2.2.3 Fatores genéticos envolvidos na DP	30
2.2 Tratamento periodontal não-cirúrgico	33
2.3 Investigação da característica multifatorial da DP	33
3 Proposição	36
4 Material e Métodos	38
4.1 Cálculo da Amostra	39
4.2 Seleção da Amostra	39
4.3 Calibração do Examinador	42
4.4 Delineamento Clínico do estudo	42
4.4.1 Cronograma de Execução da Metodologia	42
4.4.2 Análise Clínica	44
4.4.3 Coleta do Fluido Sulcular	47
4.4.4 Tratamento Periodontal Não-Cirurgico	49
4.5 Delineamento Laboratorial do estudo	50
4.5.1 Análise Imunológica	50
Preparo das Amostras e Teste de ELISA	50

4.6 Planejamento Estatístico	52
5 Resultado	55
5.1 Análise da população estudada	56
5.2 Análise clínica – Boca Toda	57
5.3 Análise clínica – Sítios periodontais selecionados	68
5.4 Análise imunológica	73
5.5 Análise de correlação	78
6 Discussão	82
7 Conclusão.....	95
8 Referências.....	97
9 Anexos.....	112
9.1 Aprovação do Comitê de Ética do estudo anterior	113
9.2 Aprovação do Comitê de Ética do presente estudo.....	114
9.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	115
9.4 Modelo de ficha clínica específica	116

Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas

IL – Interleucina

MMP – Metaloproteinase

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VDR – Receptor de vitamina D

TLR4 – Receptor semelhante à *toll-4*

LPS – Lipopolissacarídeos

RNAm – RNA mensageiro

CXCR-1 – Receptor 1 da Interleucina-8

CAL – *Clinical Attachment Loss*

PS – Profundidade de Sondagem

NIC – Nível de Inserção Clínica

IPV – Índice de Placa Visível

ISM – Índice de Sangramento Marginal

SS – Sangramento à Sondagem

RAR – Raspagem e alisamento radicular

FS – Fluido sulcular

ScDP – Suscetível geneticamente com DP

SsDP – Suscetível geneticamente sem DP

NScDP – Não-Suscetível geneticamente com DP

NSsDP – Não-Suscetível geneticamente sem DP

mm - Milímetro

nm – Nanômetro

pg/ml – Picograma por mililitro

ng/ml – Nanograma por mililitro

µl – Microlitro

g – Gravidade

°C – Grau Celsius

pH – Potencial hidrogeniônico

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

LEE – Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Instituto Dante

Pazzanese de Cardiologia, Faculdade de Medicina da USP)

RESUMO

Corbi SCT. Avaliação clínica, imunológica e da resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico em indivíduos com e sem haplótipos de suscetibilidade genética à periodontite crônica no gene *Interleucina 8* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

RESUMO

A Doença Periodontal (DP) tem caráter multifatorial, com a influência de fatores como a presença de microrganismos periodontopatogênicos, suscetibilidade genética do hospedeiro, reação do sistema imune, hábito de fumar e presença de doenças sistêmicas. O tecido periodontal inflamado produz várias citocinas, dentre elas a interleucina 8 (IL-8). Estudos recentes realizados por este grupo investigaram polimorfismos no gene *IL8* em indivíduos com e sem periodontite crônica, onde foram observados indivíduos com 2 vezes mais predisposição genética à DP. O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que a maior suscetibilidade genética à periodontite crônica dada pelo haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* seria acompanhada por diferenças nos índices clínicos periodontais, nos níveis da citocina IL-8 no fluido sulcular (FS) e na resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico. Foram selecionados 79 indivíduos divididos quanto à presença ou não do referido haplótipo no gene *IL8*, de forma que os indivíduos “suscetíveis” e “não suscetíveis” foram subdivididos quanto à presença ou ausência da

periodontite crônica. Os indivíduos selecionados foram submetidos a exame clínico periodontal e coletas de FS antes e após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. A citocina IL-8 foi quantificada por meio de teste imunoenzimático (ELISA). Como resultado verificou-se que, comparando indivíduos suscetíveis e não-suscetíveis à DP, não houve diferença estatisticamente significativa tanto nos índices clínicos periodontais quanto na resposta ao tratamento periodontal realizado, sendo que apenas o volume do FS, no período *baseline*, apresentou diferença significativa. Assim, a suscetibilidade genética à DP previamente observada nesses indivíduos não influenciou os índices clínicos periodontais avaliados, nem os níveis de IL-8 no FS e nem na forma como os mesmos responderam ao tratamento periodontal. Mais estudos investigando um número maior de genes são necessários para a melhor compreensão do envolvimento do fator genético na DP e sua interação com outros fatores, como o imunológico, dado o caráter multifatorial da DP.

Palavras-chave: Interleucina-8; Periodontite; Polimorfismo genético; Suscetibilidade à doença.

ABSTRACT

Corbi SCT. Clinical and immunological evaluation and the response to non-surgical periodontal therapy in the individuals with and without haplotypes of genetic susceptibility to chronic periodontitis in the *Interleukin 8* gene [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

ABSTRACT

Periodontal disease is a multifactorial disease which is influenced by factors such as the presence of periodontopathogenic microorganisms, the reaction of the immune system, smoking, genetic susceptibility and the occurrence of systemic diseases. The inflamed periodontal tissue produces several cytokines like Interleukin 8 (IL-8). Recent studies carried out by our research group investigated polymorphisms in the *IL8* gene in patients with and without periodontitis, where it was found individuals with a genetic predisposition to periodontitis. The purpose of this study was to test the hypothesis that the genetic susceptibility to chronic periodontitis given by ATC/TTC haplotype in *IL8* gene would be linked to differences in the clinical periodontal parameters, IL-8 cytokine levels in the gingival crevicular fluid (GCF) and the response to non-surgical periodontal therapy. Seventy-nine individuals were selected and grouped according to the presence or not of the haplotype given in the *IL8* gene, so that the “susceptible” and “non-susceptible” individuals were subdivided by the presence or absence of chronic periodontitis. The selected individuals were submitted to

periodontal clinical exam and the collection of GCF was done before and 45 days after the non-surgical periodontal therapy. The IL-8 cytokine was quantified through an immunoenzymatic assay (ELISA). As a result, it was verified that, comparing susceptible and non-susceptible individuals to chronic periodontitis, there wasn't any statistically significant difference as in clinical periodontal parameters as in response to non-surgical periodontal therapy. However, the volume of GCF, at *baseline*, presented a significant difference. Thus, the genetic susceptibility to chronic periodontitis previously observed in these individuals influenced neither in the clinical periodontal parameters, nor in IL-8 cytokine levels in the GCF. The way these individuals responded to non-surgical periodontal therapy was not also influenced by the genetic susceptibility previously observed. Therefore, further studies investigating a greater number of genes are needed to understand the involvement of the genetic factor in the periodontal disease and its interaction with other factors, such as the reaction of the immune system, given the multifactorial character of periodontal disease.

Keywords: Interleukin-8; Periodontitis; Polymorphism, Genetic; Disease susceptibility.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma doença infecciosa levando a um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte do dente¹⁹. Nos últimos anos a DP tem sido considerada uma patologia de caráter multifatorial⁴⁶, sendo que fatores genéticos foram identificados como responsáveis por cerca de 50% da expressão da DP⁵².

Fatores microbiológicos influenciam diretamente a DP, pois bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação podendo causar destruição do periodonto pela ação direta dos subprodutos do metabolismo e enzimas bacterianas e estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células do hospedeiro⁷⁵.

A resposta imune do indivíduo afetado pela DP tem sido muito investigada enfocando-se: a) a produção de citocinas, mostrando aumento de sua concentração em sítios com periodonto lesado^{37,47}; b) os níveis de expressão de citocinas em relação à presença de periodontite agressiva e/ou crônica^{17,78}. Também tem sido bastante investigado a suscetibilidade genética do indivíduo à DP, principalmente estudando-se genes que codificam proteínas do sistema imune, como *IL2*⁶⁶, *IL6*⁷⁶ e *MMP1*⁷¹.

A IL-8 é uma quimiocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares do sangue^{5,7,46} com forte função pró-inflamatória, pois media a ativação e migração principalmente de neutrófilos do sangue periférico ao tecido injuriado^{7,43}. Os neutrófilos atraídos do sangue

periférico para o sítio afetado liberam as enzimas de seus grânulos citoplasmáticos e também atrai outros neutrófilos. No caso da DP, tais neutrófilos são atraídos da lâmina própria e do epitélio gengival. Apesar da ação de neutrófilos ser uma barreira inicial contra bactérias periodontopatogênicas, a contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para a destruição local dos tecidos periodontais^{58,68,81}.

Como a DP é uma doença inflamatória, possivelmente ocorre uma falta de equilíbrio na produção de citocinas pró e antiinflamatórias^{24,58}. Diferenças individuais nos níveis de interleucinas podem ser atribuídas a polimorfismos em seus genes, principalmente se estes polimorfismos encontram-se dentro de regiões chamadas exons ou do promotor. Estudos recentes realizados pelo presente grupo de pesquisa investigaram polimorfismos no gene *IL8* em indivíduos com e sem DP, e demonstraram que determinado haplótipo (combinação de polimorfismos genéticos), formado pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8*, está duas vezes mais associado com suscetibilidade à DP. No entanto, nem todos os polimorfismos no gene *IL8* investigados pelo nosso grupo foram associados com a suscetibilidade à DP³⁸, como reportado recentemente.

Poucos estudos investigaram, nos mesmos indivíduos com DP, a combinação de mais de um fator, por exemplo, polimorfismo genético e produção de citocina^{53,69}, ou análise da microbiota subgengival e de polimorfismos genéticos^{77,83}. A inter-relação de diferentes fatores como,

por exemplo, suscetibilidade genética, produção de citocinas e participação de microrganismos na DP necessita ser melhor compreendida.

REVISÃO

DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Periodontal e seu caráter multifatorial

De acordo com Flemming¹⁹ (1999), a DP é uma doença infecciosa caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte e proteção do dente. Pode ocorrer formação de bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar, e eventual perda do dente.

Histologicamente a DP é caracterizada por acúmulo de células inflamatórias na porção extravascular do tecido conjuntivo gengival (Flemming¹⁹, 1999). Numerosas espécies bacterianas têm sido isoladas da placa subgengival, sendo algumas estreitamente relacionadas ao início e progressão da doença (Socransky et al.⁷⁰, 1998). Devido à maioria das bactérias periodontopatogênicas residirem nas bolsas periodontais, o sistema imune apresenta dificuldade em eliminar os microrganismos. Essa situação particular leva a uma inflamação crônica e a uma contínua resposta exacerbada do hospedeiro, resultando em destruição do tecido. A resposta local do hospedeiro contra essas bactérias é o recrutamento de leucócitos e subsequente liberação de mediadores inflamatórios (Okada, Murakami⁵⁸, 1998).

Nos últimos anos tem-se considerado a DP como uma patologia de caráter multifatorial (Loss et al.⁴⁶, 2005), onde além de fatores microbiológicos e imunológicos, o fumo (Johnson, Slach³³, 2001),

stress psicossocial (Linden et al.⁴⁴, 1996) e doenças sistêmicas como diabetes (Mealey⁵⁰, 2000), já tiveram sua influência comprovada na DP.

2.1.1 Fatores Microbiológicos envolvidos na Doença Periodontal

Os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição tecidual características da DP têm sido área de investigação nos últimos anos (Salvi et al.⁶⁵, 2005; Socransky et al.⁷⁰, 1998). As bactérias associadas à doença podem causar destruição no periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta dos subprodutos de metabolismo e enzimas bacterianas; 2) estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células hospedeiras, promovendo a autodestruição tecidual (Trevilatto et al.⁷⁶, 2003). No entanto, embora a infecção por periodontopatógenos seja essencial para o início da DP, sua mera presença na cavidade bucal não é suficiente para explicar diferenças interindividuais na severidade da doença (Kornman et al.⁴⁰, 1997). Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da DP (Kinane et al.³⁹, 2003; Salvi et al.⁶⁵, 2005; Socransky et al.⁷⁰, 1998).

2.1.2 Fatores Imunológicos envolvidos na Doença Periodontal

Dentre os vários mediadores inflamatórios presentes na DP destacam-se o grupo das citocinas, as quais constituem um grupo diverso de pequenas proteínas e glicoproteínas que apresentam um vasto patamar de funções biológicas potentes (Wilson et al.⁸², 1996). As citocinas têm sido agrupadas em seis categorias de acordo com a função a elas atribuída: interleucinas, citocinas citotóxicas, fatores estimulantes de colônia, interferons, fatores de crescimento e quimiocinas (Wilson et al.⁸², 1996). Algumas citocinas têm sido caracterizadas como pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α), sendo que outras citocinas atuam como antiinflamatórias (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13). Doenças inflamatórias podem ser induzidas e perpetuadas por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias ou possivelmente por uma falha na produção apropriada de citocinas antiinflamatórias, e esse parece ser o caso da DP (Gemmell, Seymour²⁴, 1994; Okada, Murakami⁵⁸, 1998).

As quimiocinas regulam o trânsito de leucócitos, de forma que desempenham papéis importantes no desenvolvimento, homeostase e funções do sistema imune, além de terem efeito sobre células do sistema nervoso central e angiogênese. A IL-8 é uma quimiocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares do sangue, mas também por células endoteliais, epiteliais, sinoviais, fibroblastos, condrócitos e células tumorais (Baggiolini et al.⁵, 1989; Bickel⁷, 1993; Loss et al.⁴⁶, 2005). A IL-

8 é uma quimiocina com forte função pró-inflamatória, pois media a ativação e migração de neutrófilos do sangue periférico ao tecido, além de atuar em monócitos, basófilos e linfócitos T, contudo com menor efeito do que em neutrófilos (Bickel⁷, 1993; Leonard et al.⁴³, 1990). A resposta dos neutrófilos à IL-8 é caracterizada por migração de células, liberação de enzimas contidas em seus grânulos citoplasmáticos e outras alterações intra e extracelulares (Baggiolini et al.⁵, 1989; Bickel⁷, 1993; Shapira et al.⁶⁸, 1991).

Devido às propriedades quimioatrativas para neutrófilos, a IL-8 tem sido associada à patogênese da DP (Bickel⁷, 1993; Fitzgerald et al.¹⁸, 1995; Gainet et al.²¹, 1998; Wang et al.⁸¹, 2006). A IL-8 secretada localmente induz o extravasamento de neutrófilos do sangue periférico para o sítio afetado e também atrai numerosos outros neutrófilos presentes na lâmina própria e no epitélio gengival. Assim, apesar da ação de neutrófilos ser uma barreira inicial contra bactérias periodontopatogênicas, a contínua e excessiva presença de IL-8 pode contribuir para o acúmulo de neutrófilos com subsequente destruição local dos tecidos periodontais (Okada, Murakami⁵⁸, 1998; Shapira et al.⁶⁸, 1991; Wang et al.⁸¹, 2006). Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* induziram a expressão de RNA mensageiro (RNAm) da IL-8 em fibroblastos de gengiva humana em cultura (Tamura et al.⁷³, 1992), além de estimularem maior secreção da proteína pelas células do epitélio gengival (Kusumoto et al.⁴², 2004) e

pelos leucócitos (Bodet et al.⁸, 2006). Em indivíduos com periodontite crônica e agressiva foram detectadas maior tendência de expressão de IL-8 e do seu receptor *CXCR1* quando comparados a indivíduos sem doença periodontal (Garlet et al.²³, 2003). Em adição, Gainet et al.²¹ (1998) encontraram níveis elevados de IL-8 no plasma de indivíduos com várias formas de DP, e demonstraram a presença de RNAm para IL-8 nos neutrófilos gengivais.

Foram encontradas concentrações gengivais elevadas de IL-8 em indivíduos com DP e esta citocina manteve-se elevada naqueles que não responderam ao tratamento periodontal não-cirúrgico (Chung et al.¹⁴, 1997). De forma semelhante, foi demonstrado que indivíduos com DP possuem maior nível de IL-8 nos tecidos periodontais do que indivíduos sem DP, bem como a concentração de IL-8 é maior nos sítios com doença ativa do que nos sítios inativos (Gamonal et al.²², 2000; Mathur et al.⁴⁹, 1996; Tsai et al.⁷⁹, 1995). Mcgee et al.⁵¹ (1998) reportaram elevada concentração de IL-8 no tecido gengival está correlacionado com a profundidade de sondagem do sulco gengival.

2.1.3 Fatores Genéticos envolvidos na Doença Periodontal

Um estudo em gêmeos revelou que fatores genéticos são responsáveis por cerca de 50% da expressão da DP (Michalowicz et al.⁵², 2000). Estudos de associação do tipo caso-controle (Kornman et al.⁴⁰, 1997; Pociot et al.⁶², 1992; Takashiba et al.⁷⁴, 2006), de análise de

agregação familiar (Marazita et al.⁴⁸, 1994), e outros envolvendo gêmeos (Corey et al.¹², 1993; Michalowicz et al.⁵², 2000) também têm investigado a influência genética na DP. Acredita-se que fatores genéticos podem influenciar a suscetibilidade, progressão e/ou a resposta ao tratamento da DP, hipóteses que têm sido bastante investigadas e discutidas (Kinane et al.³⁹, 2003; Loss et al.⁴⁶, 2005; Salvi et al.⁶⁵, 2005).

Vários estudos (Gore et al.²⁷, 1998; Hodge et al.³⁰, 2001; Kornman et al.⁴⁰, 1997; Moreira et al.⁵⁵, 2005; Mukaida et al.⁵⁷, 1989; Scarel-Caminaga et al.⁶⁶, 2002) têm tentado identificar genes que possam desempenhar o papel de marcadores genéticos de suscetibilidade à DP. Nesta, assim como em outras doenças inflamatórias crônicas, há fatores modificadores que não causam a doença, mas amplificam mecanismos que a tornam mais severa. Desses mediadores, o grupo das citocinas merece especial atenção.

Diferenças individuais nos níveis de interleucina relacionados aos diferentes graus de suscetibilidade à DP podem ser atribuídas, entre outros fatores, a polimorfismos em seus respectivos genes. Como exemplo, a frequência do alelo 2 do polimorfismo *IL1B* (+3953) está aumentada em pacientes com doença periodontal avançada (Gore et al.²⁷, 1998). Indivíduos homocigotos para o alelo 2 desse locus polimórfico, presente no exon 5, produzem a proteína IL1- β em um nível quatro vezes mais elevado (Pociot et al.⁶², 1992).

O envolvimento de citocinas, bem como de seus polimorfismos genéticos em alguns genes como *IL1A*, *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *VDR* (receptor de vitamina D), *TLR4* (receptor semelhante à *Toll* - 4), *MMP1* (metaloproteinase de matriz – 1) e *TNFA* (fator de necrose tumoral - alfa), têm sido cada vez mais investigados nas doenças inflamatórias (Bellamy et al.⁶, 1998; Rasouli et al.⁶⁴, 2007), inclusive foram associados à severidade e/ou suscetibilidade à periodontite crônica e periodontite agressiva (Astolfi et al.³, 2006; Brito Júnior et al.⁹, 2004; Fukusaki et al.²⁰, 2007; Gore et al.²⁷, 1998; Kornman et al.⁴⁰, 1997; Scarel-Caminaga et al.⁶⁶, 2002; Scarel-Caminaga et al.⁶⁷, 2004; Stern⁷², 2000; Van Dyke et al.⁸⁰, 1994; Wilson et al.⁸², 1996).

Estudos recentes realizados pelo presente grupo de pesquisa investigaram polimorfismos no gene *IL8* em 500 indivíduos com e sem DP, e demonstraram que o haplótipo ATC/TTC formado pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T), no gene *IL8*, está duas vezes mais associado com suscetibilidade à DP (*Odds Ratio* = 2,24 [95% Intervalo Confiança = 1,10-4,55]) (dados submetidos à publicação). No entanto, nem todos os polimorfismos investigados no gene *IL8* foram associados com a suscetibilidade à DP (Kim et al.³⁸, 2009), como reportado recentemente; o qual foi o primeiro estudo na literatura a investigar o gene *IL8* como candidato à suscetibilidade à DP.

2.2 Tratamento Periodontal não-cirúrgico

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é provavelmente a forma mais comum de terapia mecânica empregada, não somente no tratamento da DP, mas também na manutenção de um periodonto saudável, bem como para evitar a recorrência da doença após o tratamento (Haffajee et al.²⁹, 1997). Estes procedimentos utilizando instrumentação manual ou ultra-sônica meticulosa são responsáveis pela remoção dos depósitos moles e duros da superfície dental, coronária ao epitélio juncional, fazendo com que se obtenha uma superfície radicular biologicamente aceitável com a remoção da microbiota, toxinas bacterianas, cálculo, cemento e dentina que estejam contaminados (Genco et al.²⁵, 1996). De uma maneira geral, estes procedimentos levam a uma melhora nos parâmetros clínicos que denotam inflamação, assim como a redução da profundidade de sondagem clínica e a diminuição da perda de inserção, especialmente em sítios mais profundos (Baderstein et al.⁴, 1981; Kaldahl et al.³⁵, 1993; Morrison et al.⁵⁶, 1980; Pihlstrom et al.⁶⁰, 1983; Ramfjord et al.⁶³, 1987).

2.3 Investigação da Característica Multifatorial da Doença Periodontal

Poucos são os estudos que investigaram mais de um fator etiológico da DP no mesmo grupo amostral, por exemplo, polimorfismo genético e produção de citocina (Michel et al.⁵³, 2001; Shirodaria et al.⁶⁹,

2000), ou análise da microbiota subgengival e de polimorfismos genéticos (Trevilatto et al.⁷⁷, 2002; Wolf et al.⁸³, 2006).

No entanto, a literatura científica parece indicar uma tendência de investigações desse tipo. Pirhan et al.⁶¹ (2009) procuraram estabelecer associação entre polimorfismos genéticos no promotor do gene *MMP13* com níveis de MMP-13 no fluido sulcular (FS) e com a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico em indivíduos com e sem DP. Como resultados, não encontraram associação significativa entre os polimorfismos genéticos e os níveis de MMP-13 no FS e nem mesmo com a resposta ao tratamento realizado. Desse modo, concluíram que estes polimorfismos no gene *MMP13* não estariam influenciando a suscetibilidade à DP.

Trombone et al.⁷⁸ (2009) investigaram associação entre o polimorfismo genético na posição -308G/A no gene *TNFA* com periodontopatógenos do complexo vermelho e níveis de RNAm de TNF- α em fragmentos de tecido gengival em indivíduos com e sem DP. Concluíram que o polimorfismo estudado e os periodontopatógenos do complexo vermelho foram independentemente associados ao aumento nos níveis de TNF- α nos tecidos gengivais doentes.

Semelhantemente, Ferreira et al.¹⁷ (2008) também procuraram demonstrar associação entre o polimorfismo genético na posição -3954 no gene *IL1B* com periodontopatógenos do complexo vermelho e níveis de RNAm de IL-1 β em fragmentos de tecido gengival em indivíduos com

e sem DP. Os autores concluíram que o polimorfismo estudado e os periodontopatógenos do complexo vermelho foram independentemente associados ao aumento nos níveis de IL-1 β nos tecidos gengivais doentes e que tanto o polimorfismo quanto os periodontopatógenos, analisados individualmente ou em associação, modularam os níveis de IL-1 β encontrado nos tecidos gengivais doentes.

Considerando os resultados dos estudos citados e os resultados prévios do presente grupo de pesquisa que demonstraram relação da DP com o haplótipo ATC/TTC formado pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8*, surgiu a hipótese da possível influência do referido haplótipo nos níveis da citocina IL-8 e dos índices clínicos periodontais entre indivíduos suscetíveis e não suscetíveis à DP. Além disso, questionou-se se o caráter genético individual (suscetibilidade) influenciaria na resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico.

Com essa investigação pretende-se contribuir com a melhor compreensão da possível inter-relação de diferentes fatores na etiopatogenia da DP.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1) Investigar possíveis diferenças nos índices clínicos periodontais e nos níveis da citocina IL-8 entre indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP, considerando os haplótipos formados pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8*.

2) Avaliar a influência do caráter genético individual (suscetibilidade) e os níveis de citocina IL-8 após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico.

MATERIAL
E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cálculo da Amostra

Para obterem-se p -valores estatisticamente significantes, foi realizado um cálculo amostral a partir do *site* <http://www.lee.dante.br>, do LEE (Laboratório de Epidemiologia e Estatística) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia da Faculdade de Medicina da USP, com os dados clínicos dos primeiros 14 indivíduos dentre os 198 pré-classificados geneticamente para este estudo. Considerando a diferença a ser detectada de 1,0 mm na sondagem periodontal, os cálculos mostraram que a um valor de $\alpha = 0,05$ e poder de 95%, o tamanho da casuística necessária para comprovar associação clínica e imunológica com a DP, seria de 6 indivíduos em cada subgrupo (pacientes Com Periodontite e Sem Periodontite) dentro de cada grupo (Com Suscetibilidade Genética para desenvolver DP e Sem Suscetibilidade Genética para desenvolver DP) totalizando 24 indivíduos. Portanto, a casuística total investigada neste estudo deveria ser maior ou igual a 24 indivíduos para detectar associação com um nível aceitável de confiança.

4.2 Seleção da Amostra

De um estudo prévio que incluiu 500 indivíduos (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr – protocolo 57/04 – Anexo 1) foi investigado se os polimorfismos -251(T/A),

+396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8*, teriam relação com a suscetibilidade genética do indivíduo à DP. Foi verificado que:

- (A) Pacientes com o haplótipo ATC/TTC apresentavam 2 vezes mais chance de desenvolver a DP (n = 45 grupo com Periodontite; e n = 22 grupo Controle), *Odds Ratio* = 2,24 (95% Intervalo Confiança = 1,10-4,55);
- (B) Pacientes com o haplótipo AGT/TTC não tiveram tal carga genética relacionada com suscetibilidade à DP (n = 63 grupo com Periodontite; e n = 68 grupo Controle).

Mediante tais resultados, surgiu o questionamento que talvez a maior suscetibilidade genética à periodontite crônica seria acompanhada por diferenças nos níveis da citocina IL-8 no fluido sulcular e nos índices clínicos periodontais antes e após tratamento periodontal não-cirúrgico.

Os pacientes incluídos nos grupos A e B foram contatados para informar o resultado genético obtido na primeira pesquisa e foram convidados a participar do presente estudo. Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr - UNESP (Protocolo 52/08 - Anexo 2) para desenvolvimento desta pesquisa, todos os participantes foram esclarecidos sobre os propósitos do estudo e confirmaram sua aceitação mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3). Assim, para o presente

estudo, foi realizada para todos os participantes uma nova anamnese com a finalidade de avaliar o histórico médico e odontológico, seguida do exame clínico periodontal (Anexo 4).

Dentre os 198 indivíduos pré-classificados geneticamente foram considerados os seguintes critérios de inclusão para selecionar os participantes deste estudo:

- Idade entre 30 e 60 anos, ambos os gêneros e cor de pele branca;
- Mínimo de 16 dentes;
- Boas condições de saúde geral;
- Aceitar comparecer às visitas agendadas pelo examinador.

Foram excluídos pacientes que se enquadrassem nos seguintes critérios:

- Presença de condição sistêmica que interferisse no processo saúde/doença periodontal;
- História médica de qualquer condição sistêmica que determinasse necessidade da utilização de antibioticoterapia profilática;
- Antibioticoterapia nos últimos seis meses antecedentes ao estudo;
- Uso de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos últimos três meses antecedentes ao estudo ou durante o mesmo;
- Pacientes gestantes ou lactantes;
- Pacientes fumantes e ex-fumantes há menos de seis anos;
- Pacientes que receberam tratamento periodontal nos últimos 12 meses;

- Pacientes que faziam uso de aparelho ortodôntico fixo.

4.3 Calibração do Examinador

Para calibrar o examinador do estudo, 180 sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios por pacientes em dentes multi e unirradiculares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, dentro de um intervalo de 48 horas. Os dados foram submetidos à análise de concordância Kappa. Um único examinador (SCTC), calibrado (Kappa ponderado = 0,80) e cego para os diferentes grupos examinou todos os parâmetros clínicos periodontais e realizou todas as coletas imunológicas.

4.4 Delineamento Clínico do estudo

4.4.1 Cronograma de Execução da Metodologia

O cronograma de execução da metodologia do presente estudo está ilustrado na Figura 1.

Um mês antes do início do estudo, os indivíduos dos diferentes grupos foram contatados para informar o resultado genético obtido na primeira pesquisa e foram convidados a participar do presente estudo. Quinze dias antes do início da coleta do fluido sulcular (FSI), os indivíduos foram avaliados e selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Uma semana antes da coleta do FSI,

foram realizados os exames clínicos iniciais, moldagem das arcadas dentárias e instrução de higiene bucal, de acordo com a metodologia descrita no item 4.4.2 a seguir.

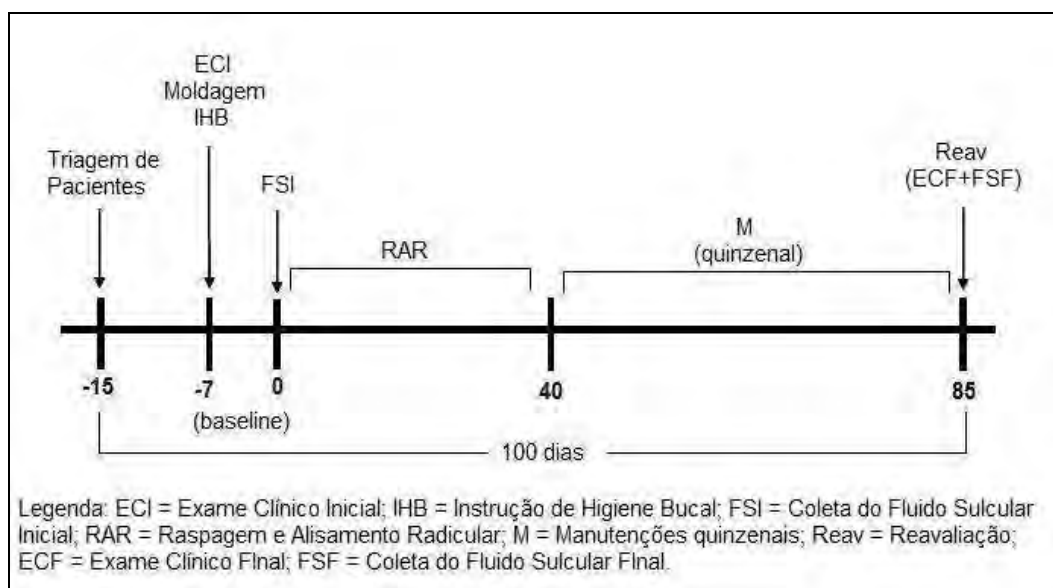


FIGURA 1 - Cronograma da metodologia aplicada, em dias.

Vale ressaltar que o período *baseline* para o exame clínico periodontal correspondeu ao -7 dias e para as coletas do FS correspondeu ao tempo 0 (zero) representados no cronograma acima.

No tempo zero do cronograma, foram realizadas as coletas do FSI (coleta do fluido sulcular inicial) e logo em seguida, os indivíduos com DP começaram a receber o tratamento periodontal não-cirúrgico. Após a realização do tratamento (para aqueles que necessitaram) e também para os demais indivíduos sem DP, foram agendadas visitas de manutenção quinzenalmente, onde os indivíduos de todos os grupos receberam

profilaxia (com pasta profilática e taça de borracha) e reforço de instrução de higiene bucal.

Depois de três visitas de manutenção (totalizando 45 dias), foi realizada a reavaliação dos índices clínicos periodontais (exame clínico final - ECF) e nova coleta de FS (coleta do fluido sulcular final - FSF).

O período experimental clínico do presente estudo totalizou, em média, 100 dias.

4.4.2 Análise Clínica

Os pacientes selecionados para este estudo foram submetidos a novos exames clínicos periodontais por um único examinador (SCTC) previamente treinado e calibrado, com luz direta, utilizando-se de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams e espelho bucal esterilizado. Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos de diagnóstico periodontal na ordem a seguir:

- Índice de Placa Visível – IPV – (presente ou ausente)¹;
- Índice de Sangramento Marginal – ISM – (presente ou ausente)¹;
- Sangramento à Sondagem – SS – (presença ou ausência de sangramento observado, durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal);
- Profundidade de Sondagem – PS – (distância do fundo do sulco até a margem gengival);

- Nível de Inserção Clínico – NIC – (distância do fundo do sulco até a junção amelocementária).

As análises foram realizadas em seis pontos (sítios) por dente – méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, méso-lingual, lingual e disto-lingual – em todos os dentes, excluindo-se os terceiros molares. Os dentes selecionados para a escolha dos sítios periodontais para a coleta do fluido sulcular deveriam ser naturais, íntegros, sem uso de prótese, de preferência dentes anteriores (unirradiculares) e não poderiam apresentar qualquer disfunção em relação à oclusão.

Para que os indivíduos fossem incluídos nos grupos DP (periodontite crônica) esses deveriam apresentar os seguintes parâmetros clínicos periodontais: presença de dois ou mais sítios em dentes não-adjacentes com PS \geq 5mm, NIC \geq 3mm e sangramento à sondagem². Os indivíduos incluídos nos grupos sem DP deveriam apresentar os seguintes parâmetros clínicos: presença de PS \leq 3mm e ausência de perda clínica de inserção.

Dessa forma, obedecendo aos critérios de inclusão, exclusão e os parâmetros clínicos periodontais, foram selecionados 79 indivíduos para serem incluídos no presente estudo, de modo que foram subdivididos em quatro grupos, de acordo com a presença ou ausência tanto de suscetibilidade genética quanto de DP:

- Suscetível Geneticamente com DP (ScDP), n = 21;

- Suscetível Geneticamente sem DP (SsDP), n = 14;
- Não-Suscetível Geneticamente com DP (NScDP), n = 20;
- Não-Suscetível Geneticamente sem DP (NSsDP), n = 24.

Cada paciente foi submetido à moldagem das arcadas dentais em alginato. Essas moldagens foram vazadas em gesso-pedra e, sobre esses modelos, foram confeccionados guias de acetato (Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo – SP – Brasil), utilizando placas de prolipropileno de 1,0mm de espessura, prensadas em aparelho a vácuo (Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo – SP – Brasil). O uso desses guias teve como finalidade padronizar o posicionamento da sonda periodontal durante a realização do exame de profundidade de sondagem e nível de inserção clínico, assim como facilitar a padronização da inserção da tira de papel absorvente para coleta do fluido sulcular. Para tanto, nesses guias, o local indicado como ponto (sítio) escolhido de profundidade de sondagem e nível de inserção clínico e de coleta do fluido sulcular foi desgastado com brocas tronco-cônicas de haste longa para uso em baixa rotação, formando, assim, uma canaleta que permitiu a inserção tanto da sonda periodontal quanto da tira de papel absorvente sempre no mesmo local.



FIGURA 2 – Tira de papel e placa guia.



FIGURA 3 – Sonda periodontal e placa guia.

4.4.3 Coleta do Fluido Sulcular

Um examinador (cego quanto ao grupo a que pertencia o paciente) coletou as amostras de fluido sulcular (FS) para análise imunológica, uma semana após os exames clínicos, para evitar interferências devido à sondagem. As coletas de FS de cada paciente foram realizadas antes e após 45 dias do término do tratamento periodontal não-cirúrgico (Figura 1). Os sítios periodontais selecionados para a coleta do fluido sulcular tiveram como critério de escolha ser provenientes de dentes naturais, íntegros, sem uso de prótese, de preferência anteriores (unirradiculares), não podendo apresentar qualquer disfunção em relação à oclusão e corresponderam às características a seguir:

- Pacientes com DP - dois sítios em dentes não-adjacentes com PS \geq 5mm, NIC \geq 3mm e apresentando sangramento à sondagem;

- Pacientes sem DP - dois sítios sadios em dentes não-adjacentes com PS \leq 3mm e ausência tanto de perda de inserção clínica quanto de sangramento à sondagem.

Para a coleta do fluido sulcular, a placa supragengival foi removida com gaze estéril e os sítios selecionados foram isolados com roletes de algodão e gentilmente secos com jato de ar, sendo que após 30 segundos tiveram o fluido sulcular coletado com uma tira de papel absorvente (filtro) especial (Periopaper®). A tira de papel foi introduzida no sulco gengival até que uma pequena resistência fosse sentida e permaneceu nesse local durante 30 segundos. As tiras de papel que se mostraram visualmente contaminadas com saliva e/ou sangue foram descartadas. O volume de fluido sulcular coletado foi mensurado imediatamente após a coleta por meio de aparelho específico (Periotron 8000 - Oraflow Inc.). O valor determinado foi transformado em unidade de volume (μ L) com o auxílio de um programa específico para esse fim (Periotron Professional - Oraflow Inc.). As tiras de papel contendo o fluido sulcular foram colocadas dentro de microtubos estéreis e secos^{26,41}, mantidos em gelo durante o transporte da clínica ao laboratório, onde eram congelados a -80 °C para posterior análise.

4.4.4 Tratamento Periodontal Não-Cirúrgico

Os pacientes que necessitaram de cirurgia periodontal foram encaminhados para clínicas de especialização. Todo o tratamento periodontal não-cirúrgico, bem como a profilaxia, motivação e instrução de higiene bucal foram realizados por três profissionais devidamente treinados e supervisionados por um único cirurgião-dentista especialista em Periodontia. Este especialista realizou a conferência da profilaxia e dispensa de todos os pacientes sem DP, assim como também realizou a finalização da raspagem e alisamento radicular subgingival de cada paciente com DP. Desse modo, buscou-se atingir um acabamento uniforme e uma padronização da qualidade do tratamento periodontal não-cirúrgico.

Os pacientes que demandaram tratamento periodontal foram submetidos aos procedimentos de raspagem supra e subgingival de toda a arcada dentária. Tais procedimentos foram realizados em um quadrante por semana, sob anestesia local e instrumentação manual com curetas, com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. Os pacientes também foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal e correta utilização do fio dental. O tratamento periodontal realizado foi completado entre 4 e 8 semanas.

Os pacientes que não apresentaram DP receberam profilaxia com taça de borracha e pasta profilática. Todos os grupos receberam, para motivação, instrução de higiene bucal de forma individualizada,

sendo que para os pacientes em tratamento periodontal esta foi reforçada a cada visita do paciente. Após o término do tratamento periodontal ou profilaxia para aqueles que não demandaram tratamento, a instrução de higiene bucal e o controle de biofilme supragengival foram realizados nas consultas de retorno agendadas a cada 15 dias, até totalizar 45 dias. Após esse período um novo exame clínico periodontal e uma nova coleta de fluido sulcular foram realizados em cada paciente.

4.5 Delineamento Laboratorial do estudo

4.5.1 Análise Imunológica

Preparo das Amostras e Teste de ELISA para quantificação da IL-8

As amostras do fluido coletado foram retiradas do freezer a -80 °C e adicionou-se em cada uma destas 50µl de PBS + 1% Tween 20²², sendo deixadas em gelo, sob agitação no agitador horizontal por 1 hora. A seguir, foram colocadas em centrífuga refrigerada a 4 °C, 10.000 g por 15 minutos.

Um kit enzimático para imunoenensaio específico (R&D Systems - Minneapolis, MN, USA) foi utilizado para medir a quantidade de IL-8 presente nas amostras de fluido sulcular de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, um anticorpo monoclonal de captura foi diluído em solução salina de tampão fosfato (PBS pH 7,2-7,4) e pipetado na quantidade de 100 µl em todos os poços da placa e incubado por uma

noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS) e bloqueadas com soro de albumina bovina (1% BSA diluído em PBS) por uma hora, em temperatura ambiente. Após três lavagens, a curva padrão (IL-8 em concentrações seriadas partindo de 2000 pg/ml) e as amostras diluídas 4 vezes foram adicionados nos respectivos poços das placas (todos com volume final de 100µl). As placas foram cobertas e incubadas por duas horas, em temperatura ambiente e então lavadas novamente por três vezes conforme descrito acima. O anticorpo de detecção, um anticorpo conjugado à biotina, foi adicionado, seguido de nova incubação à temperatura ambiente por duas horas. Após lavagem como descrito, um conjugado de estreptoavidina e peroxidase foi diluído 200 vezes em reagente diluente (PBS + 0,05% Tween 20 + 0,1% de BSA) e adicionado às placas para incubação (totalizando 100 µl para cada poço). As placas foram novamente lavadas e uma solução substrato (água oxigenada e tetrametilbenzidina em proporções iguais) foi adicionada na quantidade de 100 µl para cada poço. A reação foi finalizada, após 20 minutos, com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N à solução substrato presente em cada poço. Para a determinação da densidade óptica para a citocina IL-8 deste ensaio, a absorbância foi lida a 450nm em um espectrofotômetro (Multiskar Ascent – Labsystems Uniscience, Vantaa/Finlândia). A absorbância foi convertida na concentração de IL-8 por amostra, de acordo com a curva padrão. Os resultados finais foram expressos em

nanogramas por mililitro (ng/ml) de concentração de IL-8 presente no fluido sulcular. Posteriormente, a concentração foi ajustada pelo volume de fluido sulcular presente em cada amostra, através da equação, onde a quantidade total foi dividida pelo volume do fluido sulcular coletado e expressa em ng/ μ l.

4.6 Planejamento Estatístico

A análise estatística das variáveis em estudo foi realizada para verificar a diferença estatisticamente significativa entre os períodos de avaliação clínica e imunológica (*baseline* e 45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico) para todos os grupos (ScDP, SsDP, NScDP e NSsDP).

Para se tomar a decisão de quais métodos estatísticos seriam apropriados à análise dos dados obtidos, foi verificado, aplicando-se o Teste de Levene, se os dados das variáveis se mostravam homogêneos e aplicando-se o Teste de Shapiro-Wilk, se os dados das variáveis se ajustavam à distribuição normal de probabilidades.

Os dados das variáveis que satisfizeram essa condição foram submetidos a testes estatísticos paramétricos e os demais foram analisados utilizando-se testes estatísticos não-paramétricos análogos aos paramétricos.

Os dados das variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisados aplicando-se o teste de Análise de Variância de Medidas Repetidas e os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados aplicando-se o Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Quando encontrados resultados estatisticamente significantes em qualquer um desses testes (Análise de Variância de Medidas Repetidas ou teste de Kruskal-Wallis), os dados foram submetidos a teste de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer – se dados paramétricos ou Teste de Dunn – se dados não-paramétrico) que fazem a comparação das amostras duas a duas, para verificar quais delas diferem entre si.

Para determinar diferenças entre os períodos do estudo (comparação intra-grupos), aos dados que se mostrassem paramétricos seria realizado o Teste de t-Student, ou se os dados fossem não-paramétricos seria realizado o Teste de Wilcoxon.

Para verificar a correlação entre os parâmetros clínicos e imunológicos (dados de IL-8), nos diferentes períodos, utilizou-se o coeficiente de correlação paramétrico de Pearson ou coeficiente de correlação não-paramétrico de Spearman, dependendo da distribuição dos dados.

Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5%, portanto, foram considerados estatisticamente significantes todos os resultados que apresentaram valor de $p < 0,05$.

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o software (Statistica 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) adequado e específico para os diferentes testes.

RESULTADO

5 RESULTADO

5.1 Análise da população estudada

Este estudo clínico foi composto por 79 indivíduos, sendo 48 (60,7%) do gênero feminino e 31 (39,2%) do masculino, com idade média de 44,24 ($\pm 9,27$) anos e com média do total de dentes de 24,26 ($\pm 3,55$) (Tabela 1), estando os indivíduos de acordo com todos os critérios de inclusão e exclusão do estudo.

Pelo teste estatístico Qui-Quadrado, não foi encontrada diferença significativa em relação à variável gênero entre os grupos investigados ($p = 0,38$), assim como também não foi significativa a diferença obtida da variável idade ($p = 0,12$) e do total de dentes ($p = 0,064$), pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (Tabela 1).

Tabela 1 - Características da população estudada

Características	ScDP	SsDP	NScDP	NSsDP	Total
N	21	14	20	24	79
Idade (anos)					
Média	46,57	41,93	46,55	41,63	44,24
(\pm DP)	($\pm 10,24$)	($\pm 9,08$)	($\pm 8,26$)	($\pm 8,80$)	($\pm 9,27$)
Gênero	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)
Feminino	11 (22,9)	7 (14,5)	15 (31,2)	15 (31,2)	48 (60,7)
Masculino	10 (32,2)	7 (22,5)	5 (16,1)	9 (29,0)	31 (39,2)
Total de Dentes					
Média	24,09	24,85	22,4	25,62	24,26
(\pm DP)	($\pm 2,42$)	($\pm 4,20$)	($\pm 3,74$)	($\pm 3,29$)	($\pm 3,55$)

n = número de indivíduos; % = porcentagem de indivíduos

5.2 Análise clínica - Boca Toda

Todos os indivíduos completaram o período experimental do estudo e não houve desistências. Neste período também não foi verificado, em nenhum deles, situações de abscessos e infecções durante ou após o tratamento periodontal não-cirúrgico.

Os dados clínicos de todos os grupos avaliados não se mostraram homogêneos (teste de Levene) e não se ajustaram à distribuição normal de probabilidades (teste de Shapiro-Wilk), portanto foram considerados não-paramétricos, sendo os parâmetros clínicos apresentados como mediana, valores mínimo e máximo.

Avaliando o Índice de Placa Visível (IPV), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. No mesmo período observou-se que o grupo ScDP (73,6%) apresentou uma maior porcentagem de sítios com placa bacteriana em relação ao grupo SsDP (31,6%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0003$) (Tabela 2). Na comparação entre períodos todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem (ScDP, $p = 0,0001$; SsDP, $p = 0,003$; NscDP, $p = 0,0001$; NSsDP, $p = 0,0001$), indicando desse modo, uma melhora na escovação dental e remoção mais eficiente do biofilme bacteriano pelo indivíduo (Tabela 2).

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, contrastando com o que havia sido verificado no *baseline* (diferença significativa entre os grupos ScDP e SsDP).

Tabela 2 - Distribuição IPV (%) entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos **
IPV (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	73,6 (40,2-97,1) ^a	25 (7,6-50) ^b	0,0001
SsDP	31,6 (9,3-77,6) ^{a¶}	15,2 (4,4-53,9) ^b	0,003
NScDP	65,4 (11,9-100) ^a	16,25 (2,7-39,1) ^b	0,0001
NSsDP	40,0 (0-92,3) ^a	20,6 (2,8-73) ^b	0,0001
Diferença entre grupos *	0,0003 [¶]	NS	

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Avaliando o Índice de Sangramento Marginal (ISM) também foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. No mesmo período foi observado que o grupo ScDP (27,7%) apresentou uma maior porcentagem de sítios com sangramento gengival em relação ao grupo SsDP (12,9%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$)

(Tabela 3). Na comparação entre períodos, todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem (ScDP, $p = 0,001$; SsDP, $p = 0,002$; NscDP, $p = 0,0001$; NSsDP, $p = 0,004$), indicando assim, uma melhora na inflamação gengival com a concomitante remoção do biofilme bacteriano, como demonstrado na Tabela 2 (Tabela 3). Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, como havia sido verificado no *baseline* (diferença significativa entre os grupos ScDP e SsDP).

Tabela 3 - Distribuição ISM (%) entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos**
ISM (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	27,7 (5,6-51,1) ^a	11,7 (2,3-52,8) ^b	0,001
SsDP	12,9 (0,8-36,8) ^{a¶}	9 (1,3-34,2) ^b	0,002
NscDP	27,8 (5,7-81) ^a	7,6 (0,8-20,6) ^b	0,0001
NSsDP	14,7 (0,8-48,8) ^a	9,2 (0,85-33,6) ^b	0,004
Diferença entre grupos*	0,03 [¶]	NS	

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação do Sangramento à Sondagem (SS) foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. No mesmo período foi observado que o grupo ScDP (29,5%) apresentou uma maior porcentagem de sítios com sangramento à sondagem em relação ao grupo SsDP (8,3%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$) (Tabela 4). Ainda no *baseline*, observou-se que o grupo NScDP (32,8%) apresentou uma maior porcentagem de sítios com sangramento à sondagem em relação ao grupo NSsDP (10,7%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0004$) (Tabela 4). Na comparação entre períodos, todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem (ScDP, $p = 0,0001$; SsDP, $p = 0,002$; NscDP, $p = 0,0001$; NSsDP, $p = 0,002$), constatando uma melhora da inflamação nos tecidos periodontais, concordando com a diminuição tanto da quantidade de biofilme bacteriano (Tabela 2) quanto da diminuição do índice gengival (Tabela 3).

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, como havia sido verificado no *baseline* (diferença significativa entre os grupos ScDP e SsDP e entre NScDP e NSsDP).

Tabela 4 - Distribuição SS (%) entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos **
SS (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	29,5 (10,4-54,6) ^a	6,7 (3,7-36,5) ^b	0,0001
SsDP	8,3 (2,6-39,4) ^{a¶}	5 (1,1-24,5) ^b	0,002
NScDP	32,8 (6,4-71,9) ^a	7,4 (1,7-17,5) ^b	0,0001
NSsDP	10,7 (1,1-41,0) ^{a#}	5,7 (0,6-14,6) ^b	0,002
Diferença entre grupos*	0,001 [¶] 0,0004 [#]	NS	

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Avaliando-se a mediana da Profundidade de Sondagem (PS), em milímetros (Tabela 5), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significante e observou-se que esses grupos apresentaram uma DP de intensidade leve. Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo ScDP (2,3 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo SsDP (1,7 mm), proporcionando uma diferença estatisticamente significante ($p = 0,00004$).

De modo semelhante, neste mesmo período, o grupo NScDP (2,5 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo NSsDP (1,8 mm), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000002$). Na comparação entre períodos, os grupos ScDP e NScDP apresentaram uma diminuição significativa na PS, enquanto os outros dois grupos não apresentaram diminuição nesse parâmetro. Isso deve ao fato dos indivíduos nos grupos ScDP e NScDP serem portadores de DP e terem recebido tratamento periodontal não-cirúrgico, e os indivíduos dos outros dois grupos (SsDP e NSsDP) serem considerados controles do estudo (em relação à DP) e apenas terem recebido instruções de higiene e profilaxia oral.

Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da PS entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,0002$) e entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,01$), como havia sido verificado de forma semelhante no *baseline* (Tabela 5).

Tabela 5 - Profundidade de Sondagem (mm): mediana das medidas (min-max) dos diferentes grupos e períodos

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos**
PS (mm)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	2,3 (1,7-3,7) ^a	2,2 (1,5-3,3) ^b	0,01
SsDP	1,7 (1,3-1,9) ^{a¶}	1,7 (1,2-2) ^{a¶}	NS
NScDP	2,5 (1,8-3,7) ^a	2,0 (1,4-3,6) ^b	0,0001
NSsDP	1,8 (1,4-2,4) ^{a#}	1,7 (1,4-2) ^{a#}	NS
Diferença entre grupos*	0,00004 [¶] 0,000002 [#]	0,0002 [¶] 0,01 [#]	

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Avaliando-se o percentual de sítios com Profundidade de Sondagem (PS) \geq 4mm (Tabela 6), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significante. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram uma diminuição significativa na PS \geq 4mm (ScDP, $p = 0,0002$; NScDP, $p = 0,0004$). Isso indica que os indivíduos nos grupos ScDP e NScDP responderam de maneira similar ao tratamento periodontal não-cirúrgico recebido.

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa da PS \geq 4mm entre os grupos ScDP e NScDP, como reportado da mesma forma para o período *baseline* (Tabela 6).

Tabela 6 - Profundidade de Sondagem \geq 4mm (%): mediana das medidas (min-max) dos diferentes grupos e períodos

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos**
PS \geq 4 mm (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	5,5 (1,3-43,0) ^a	3,3 (0-32,6) ^b	0,0002
NScDP	6,6 (1,2-48,2) ^a	1,3 (0-48,2) ^b	0,0004
Diferença entre os grupos*	NS	NS	

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação da mediana do Nível de Inserção Clínico (NIC), em milímetros (Tabela 7), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram uma diminuição significativa no NIC (ScDP, $p = 0,01$; NScDP, $p = 0,0001$), descrevendo, juntamente com a redução da PS, uma recuperação dos tecidos periodontais doentes que receberam o tratamento periodontal não-cirúrgico.

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do NIC, entre os grupos ScDP e NScDP, como havia ocorrido, do mesmo modo, para o período *baseline* (Tabela 7).

Tabela 7 - Nível de Inserção Clínico (mm): mediana das medidas (min-max) dos diferentes grupos e períodos

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos**
NIC (mm)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	2,5 (2,0-4,1) ^a	2,3 (1,7-3,7) ^b	0,01
NScDP	2,6 (2,0-4,3) ^a	2,2 (1,7-4) ^b	0,0001
Diferença entre grupos*	NS	NS	

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Em uma avaliação adicional para verificar o quanto a DP regrediu com o tratamento periodontal não-cirúrgico, foi analisado o número de sítios periodontais que no *baseline* apresentava PS \geq 4 mm e que reduziram \geq 2 mm após o tratamento periodontal não-cirúrgico, assim como a porcentagem desses mesmos sítios que conseguiram essa redução (Tabela 8). Avaliando o *baseline*, verificou-se que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios com PS \geq 4 mm. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram diferença estatisticamente

significante no número de sítios que reduziram ≥ 2 mm após o tratamento periodontal (ScDP, $p = 0,0001$; NScDP, $p = 0,0003$).

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do número de sítios que reduziram ≥ 2 mm entre os grupos ScDP e NScDP, assim como também não apresentaram diferença estatisticamente significativa na porcentagem de redução desses mesmos sítios (Tabela 8). Isso indica que independentemente da suscetibilidade genética, indivíduos de ambos os grupos responderam de forma análoga e efetiva ao tratamento periodontal realizado.

Tabela 8 - Número de sítios periodontais que após tratamento reduziram ≥ 2 mm nos sítios com $PS \geq 4$ mm no baseline: mediana (min-max)

Grupos	Baseline n sítios ($PS \geq 4$ mm)	45 dias n sítios (redução ≥ 2 mm)	% sítios que Reduziram	Diferença entre períodos**
ScDP	7,0 (2-62) ^a	5,5 (0-16) ^b	38,5 (0-100)	0,0001
NScDP	8,5 (2-55) ^a	3,0 (0-16) ^b	50,0 (0-100)	0,0003
Diferença entre grupos*	NS	NS	NS	

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Também em uma avaliação adicional para verificar como os grupos ScDP e NScDP responderam ao tratamento periodontal realizado, foi analisado o número de sítios periodontais que no *baseline* apresentava NIC ≥ 4 mm e que ganharam ≥ 2 mm após o tratamento periodontal não-cirúrgico, assim como a porcentagem desses mesmos sítios que conseguiram essa melhora (Tabela 9). Avaliando o *baseline*, verificou-se que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios com NIC ≥ 4 mm. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios que ganharam ≥ 2 mm após o tratamento periodontal (ScDP, $p = 0,0001$; NScDP, $p = 0,0001$).

Ao final de 45 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do número de sítios que ganharam ≥ 2 mm entre os grupos ScDP e NScDP, assim como também não apresentaram diferença estatisticamente significativa na porcentagem de ganho desses mesmos sítios (Tabela 9). Este achado, mais uma vez, indica que ambos os grupos responderam de forma parecida e efetiva ao tratamento periodontal realizado, não havendo diferenças entre os indivíduos suscetíveis e não-suscetíveis geneticamente à DP.

Tabela 9 - Número de sítios periodontais que após tratamento ganharam 2mm nos sítios com NIC \geq 4mm no baseline: mediana (min-max)

Grupos	Baseline n sítios (NIC \geq 4mm)	45 dias N sítios (ganharam \geq 2mm)	% sítios que Ganharam	Diferença entre períodos**
ScDP	18,0 (2-66) ^a	5,5 (0-17) ^b	24,7 (0-88,2)	0,0001
NScDP	21,0 (4-64) ^a	5,0 (1-17) ^b	27,7 (7,6-80,9)	0,0001
Diferença entre grupos*	NS	NS	NS	

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

5.3 Análise clínica - Sítios Periodontais selecionados

Foram selecionados 158 sítios periodontais, sendo 126 (79,74%) sítios provenientes de dentes monorradiculares, 10 (6,32%) de dentes com duas raízes e 22 (13,92%) de dentes multirradiculares. Desses sítios, 75 (47,46%) originaram de sítios interproximais e 83 (52,53%) de sítios vestibulares ou linguais. Em cada grupo de indivíduos avaliados, os sítios periodontais foram distribuídos da seguinte forma: ScDP (n=42), NScDP (n=40), SsDP (n=28) e NSsDP (n=48).

Na avaliação do IPV, ISM e SS mensurados nos sítios periodontais selecionados (Tabela 10), observou-se que no *baseline*, os

grupos ScDP e NScDP apresentaram maior presença de biofilme bacteriano (dada pelo IPV) e sangramento à sondagem (SS) em relação aos grupos SsDP e NSsDP. Na comparação entre períodos, as porcentagens desses índices diminuíram consideravelmente, indicando uma melhora da higiene bucal realizada pelos indivíduos dos diferentes grupos avaliados e consequente diminuição da inflamação dos tecidos periodontais (Tabela 10).

Tabela 10 - Condições clínicas dos sítios periodontais selecionados nos diferentes períodos

Grupo/ Sítios Periodontais (n=158)	IPV		ISM		SS	
	Baseline	45 dias	Baseline	45 dias	Baseline	45 dias
ScDP (n=42)						
Presente	39 (92,8%)	9 (21,4%)	11 (26,1%)	4 (9,5%)	41 (97,6%)	10 (23,8%)
Ausente	3 (7,1%)	33 (78,5%)	31 (73,8%)	38 (90,4%)	1 (2,3%)	32 (76,1%)
NScDP (n=40)						
Presente	34 (85%)	10 (25%)	13 (32,5%)	4 (10%)	39 (97,5%)	10 (25%)
Ausente	6 (15%)	30 (75%)	27 (67,5%)	36 (90%)	1 (2,5%)	30 (75%)
SsDP (n=28)						
Presente	1 (3,5%)	1 (3,5%)	1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ausente	27 (96,4%)	27 (96,4%)	27 (96,4%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)
NSsDP (n=48)						
Presente	4 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4,1%)
Ausente	44 (91,6%)	48 (100%)	48 (100%)	48 (100%)	48 (100%)	46 (95,8%)

Avaliando-se a mediana da Profundidade de Sondagem (PS), em milímetros, dos sítios periodontais selecionados (Tabela 11), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Ainda no *baseline*, verificou-se

que o grupo ScDP (5,0 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo SsDP (1,0 mm), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00001$). De modo semelhante, neste mesmo período, o grupo NScDP (5,0 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo NSsDP (1,0 mm), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00001$). Na comparação entre períodos, os grupos ScDP e NScDP apresentaram uma diminuição significativa na PS, enquanto os outros dois grupos não apresentaram diminuição nesse parâmetro. Isso deve ao fato dos indivíduos nos grupos ScDP e NScDP serem portadores de DP e terem recebido tratamento periodontal não-cirúrgico, e os indivíduos dos outros dois grupos (SsDP e NSsDP) serem considerados controles do estudo (em relação à DP) e apenas terem recebido instruções de higiene e profilaxia oral.

Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da PS entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,00003$) e entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,000002$), como havia sido verificado de forma semelhante no *baseline* (Tabela 11).

Tabela 11 - Profundidade de Sondagem (mm) dos sítios selecionados entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos**
PS (mm)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	5,0 (5,0-6,5) ^a	4,0 (2,0-5,0) ^b	0,0001
SsDP	1,0 (1,0-2,0) ^{a¶}	1,0 (1,0-2,0) ^{a¶}	NS
NScDP	5,0 (5,0-6,0) ^a	3,5 (2,5-5,5) ^b	0,0002
NSsDP	1,0 (1,0-2,0) ^{a#}	1,0 (1,0-2,0) ^{a#}	NS
Diferença entre grupos*	0,00001 [¶] 0,00001 [#]	0,00003 [¶] 0,000002 [#]	

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação da mediana do Nível de Inserção Clínico (NIC), em milímetros, dos sítios periodontais selecionados (Tabela 12), foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significante. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram uma diminuição significativa no NIC (ScDP, $p = 0,0001$; NScDP, $p = 0,0002$), descrevendo, juntamente com a redução da PS, uma recuperação dos tecidos periodontais doentes que receberam o tratamento periodontal não-cirúrgico.

Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa do NIC entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,00003$) e entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,000002$), como havia sido verificado de forma semelhante no *baseline* (Tabela 12).

Tabela 12 - Nível de Inserção Clínica (mm) dos sítios selecionados entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	Diferença entre períodos **
NIC (mm)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	5,0 (5,0-7,5) ^a	4,0 (2,5-5,0) ^b	0,0001
SsDP	1,0 (1,0-2,0) ^{a¶}	1,0 (1,0-2,0) ^{a¶}	NS
NScDP	5,2 (5,0-8,5) ^a	4,0 (2,5-7,0) ^b	0,0002
NSsDP	1,0 (1,0-2,0) ^{a#}	1,0 (1,0-2,0) ^{a#}	NS
Diferença entre grupos *	0,000003 [¶] 0,0000001 [#]	0,00003 [¶] 0,000002 [#]	

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Letras diferentes minúsculas: diferenças significantes quando comparados em diferentes períodos.

NS: sem significância.

(*) Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

(**) Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Portanto, comparando-se indivíduos geneticamente suscetíveis e não-suscetíveis, no *baseline* e ao final de 45 dias, verificou-se que não houve diferença estatística significativa dos índices clínicos periodontais avaliados (IPV, IG, SS, PS, PS ≥ 4 mm, NIC, número de sítios com PS ≥ 4 mm no *baseline* que reduziram ≥ 2 mm após 45 dias, número de sítios

com NIC ≥ 4 mm no baseline que ganharam ≥ 2 mm após 45 dias). Assim, a suscetibilidade genética à DP previamente observada nesses indivíduos não influenciou diferenças nos índices clínicos periodontais avaliados.

5.4 Análise imunológica

Os dados imunológicos de todos os grupos avaliados também não se mostraram homogêneos (teste de Levene) e não se ajustaram à distribuição normal de probabilidades (teste de Shapiro-Wilk), portanto foram considerados não-paramétricos, sendo os parâmetros imunológicos apresentados como mediana, valores mínimo e máximo.

Na comparação do volume do Fluido Sulcular (FS) entre os grupos foi verificado no *baseline* que o grupo ScDP (0,4 μ l) e NScDP (1,14 μ l) apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002$) (Figura 4). Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo ScDP apresentou maior volume de FS (0,4 μ l) em relação ao grupo SsDP (0,05 μ l), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00002$). De modo similar, neste mesmo período, o grupo NScDP apresentou maior volume de FS (1,14 μ l) em relação ao grupo NSsDP (0,08 μ l), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0000001$) (Figura 4). Esses resultados indicam que tanto entre indivíduos suscetíveis quanto entre não-suscetíveis geneticamente à DP, houve maior volume de FS naqueles que apresentaram DP. Na

comparação entre períodos, somente o grupo NScDP apresentou uma diminuição significativa no volume do FS ($p = 0,005$), enquanto os demais grupos não apresentaram diminuição desse parâmetro. Este achado sugere que essa diminuição significativa foi devido ao maior volume do FS já apresentado no *baseline* pelo grupo NScDP em relação aos demais grupos.

Ao final de 45 dias, entre os grupos ScDP e SsDP houve diferença estatisticamente significante do volume do FS ($p = 0,0001$) e entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,000004$).

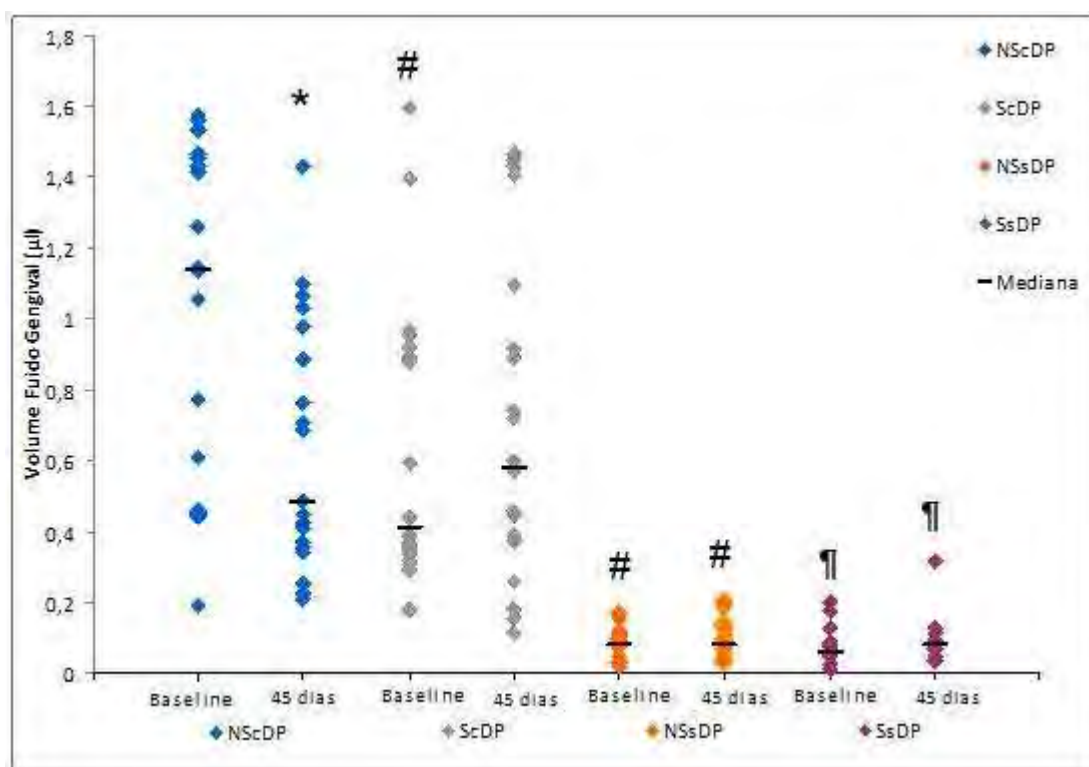


FIGURA 4 - Comparação do FS (µl) entre os grupos nos diferentes períodos.

(*) Diferenças significantes quando comparado com o baseline no mesmo grupo.

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação da quantidade total de IL-8 (ng/ml) entre os grupos foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 5). Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo ScDP apresentou maior quantidade total de IL-8 (0,4 ng/ml) em relação ao grupo SsDP (0,1 ng/ml), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,005$). Na comparação entre períodos, nenhum dos grupos avaliados apresentou diminuição significativa da quantidade total de IL-8 (ng/ml) comparando-se ao respectivo *baseline*.

Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da quantidade total de IL-8 (ng/ml) somente entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,01$) (Figura 5).

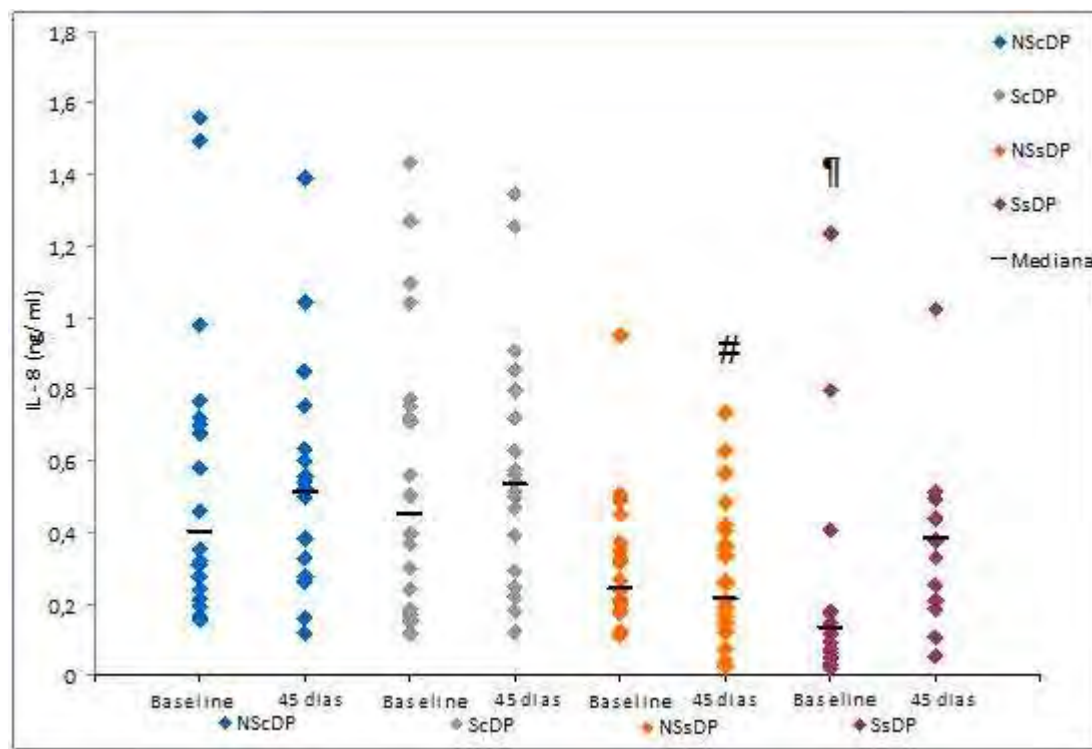


FIGURA 5 - Comparação da quantidade total de IL-8 (ng/ml) entre os grupos nos diferentes períodos.

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação da concentração de IL-8 (ng/ μ l) entre os grupos foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e NScDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 6). Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo ScDP apresentou maior concentração de IL-8 (22,7 ng/ μ l) em relação ao grupo SsDP (6,4 ng/ μ l), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,003$). Na comparação entre períodos, nenhum dos grupos avaliados

apresentou diminuição significativa da concentração de IL-8 (ng/ μ l) comparando-se ao respectivo *baseline*.

Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da concentração de IL-8 (ng/ml) somente entre os grupos NScDP e NSsDP ($p = 0,01$) (Figura 6).

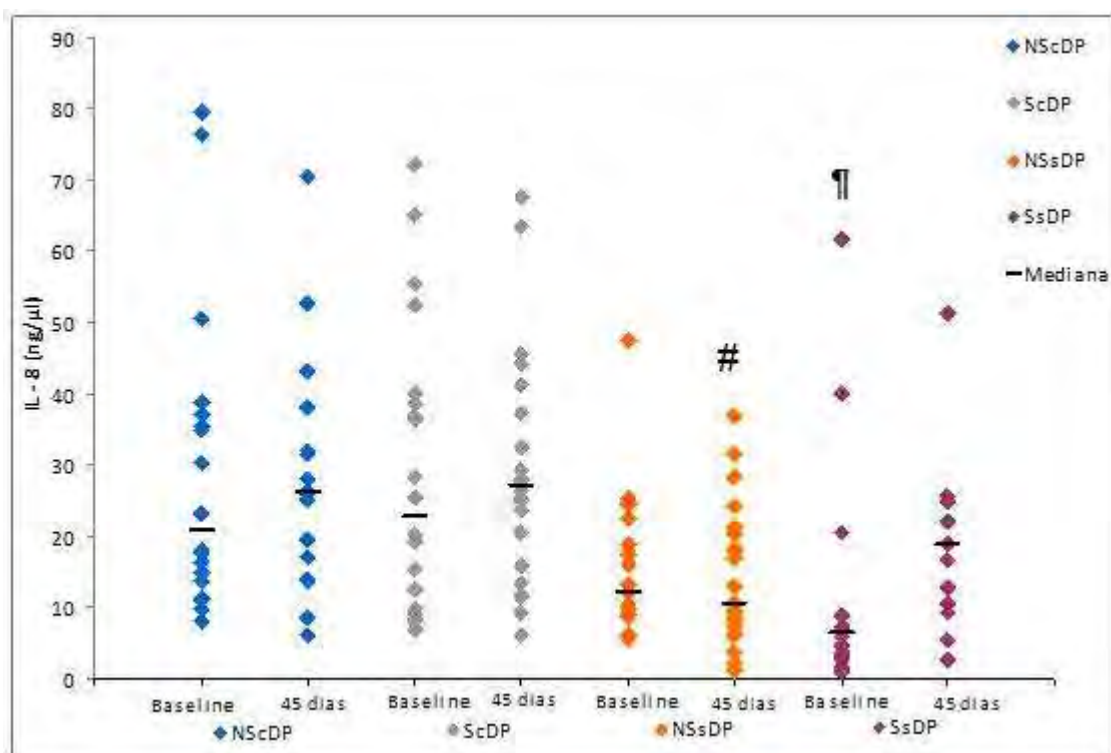


FIGURA 6. Comparação da concentração de IL-8 (ng/ μ l) entre os grupos nos diferentes períodos.

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo NScDP no mesmo período.

(¶) Diferenças significantes quando comparado com o grupo ScDP no mesmo período.

Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn para as avaliações entre os grupos no mesmo período.

Teste de Wilcoxon para as avaliações entre os diferentes períodos.

Portanto, comparando-se indivíduos geneticamente suscetíveis e não-suscetíveis, no baseline e ao final de 45 dias, verificou-se que houve diferença estatística significativa apenas no volume do FS

(*baseline*). Nos outros parâmetros imunológicos avaliados (quantidade total de IL-8 (ng/ml), concentração de IL-8 (ng/μl)) não foi encontrada diferença estatística significativa. Assim, a suscetibilidade genética à DP dada por diferentes haplótipos do gene *IL8* influenciou somente o volume do FS, mas não a presença da proteína IL-8 detectada no fluido sulcular dos indivíduos avaliados.

5.5 Análise de Correlação (dados clínicos e imunológicos)

Como os dados clínicos e imunológicos de todos os grupos avaliados se mostraram não-paramétricos, foram realizadas análises de correlação pelo Teste de Spearman.

Não houve correlação significativa, no *baseline*, nos grupos NScDP, ScDP e SsDP, considerando a associação entre os níveis de IL-8 e os parâmetros clínicos de boca toda IPV, ISM, SS e mediana da PS (Tabela 13). Ainda no *baseline*, foi observada correlação positiva ($r_s = 0,52$) entre o volume do FS e o IPV no grupo NSsDP (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre os Níveis de IL-8 e Parâmetros Clínicos de boca toda (Baseline)

Grupo/ Parâmetro	Quantidade total de IL-8	Concentração de IL-8	Volume Do FS
NScDP			
IPV	-0,19	-0,19	-0,05
ISM	-0,16	-0,16	-0,04
SS	0,04	0,04	0,22
PS	-0,10	-0,10	0,21
ScDP			
IPV	-0,10	-0,15	0,05
ISM	-0,21	-0,20	0,23
SS	-0,16	-0,20	-0,14
PS	-0,29	-0,20	0,19
NSsDP			
IPV	0,21	0,21	0,52*
ISM	0,29	0,29	0,22
SS	0,11	0,11	0,31
PS	0,15	0,15	0,20
SsDP			
IPV	-0,1	-0,80	-0,27
ISM	0,30	0,30	0,10
SS	0,10	0,10	-0,10
PS	-0,11	-0,11	0,30

*Correlação significativa
Coeficiente de Correlação de Spearman

Após 45 dias do tratamento periodontal realizado, foi observada uma correlação positiva ($r_s = 0,71$) entre o volume do FS e o ISM no grupo NScDP. Também neste mesmo período, observou-se no grupo ScDP, correlações positivas entre o ISM e os parâmetros imunológicos, quantidade total de IL-8 ($r_s = 0,45$); concentração de IL-8 ($r_s = 0,45$) e volume do FS ($r_s = 0,56$) (Tabela 14). Não houve correlação entre os níveis de IL-8 e os parâmetros clínicos de boca toda IPV, ISM,

SS e mediana da PS no grupo NSsDP. Também observou-se, no grupo SsDP, correlações negativas entre a PS e os parâmetros imunológicos, quantidade total de IL-8 ($r_s = -0,70$) e concentração de IL-8 ($r_s = -0,70$) e correlação negativa entre SS e concentração de IL-8 ($r_s = -0,55$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Correlação entre os Níveis de IL-8 e Parâmetros Clínicos de boca toda (após 45 dias do tratamento)

Grupo/ Parâmetro	Quantidade total de IL-8	Concentração de IL-8	Volume Do FS
NScDP			
IPV	0,04	0,07	-0,39
ISM	0,001	-0,01	0,71*
SS	-0,01	-0,001	-0,25
PS	-0,09	-0,10	0,16
ScDP			
IPV	0,12	0,13	0,20
ISM	0,45*	0,45*	0,56*
SS	0,01	0,01	0,36
PS	-0,1	-0,10	0,34
NSsDP			
IPV	0,07	0,06	0,01
ISM	-0,32	-0,32	0,11
SS	-0,02	-0,01	0,22
PS	0,03	0,03	0,001
SsDP			
IPV	-0,42	-0,4	-0,13
ISM	-0,12	-0,1	0,10
SS	-0,5	-0,55*	-0,30
PS	-0,70*	-0,70*	-0,30

*Correlação significativa
Coeficiente de Correlação de Spearman

Pode-se notar que as análises de correlação indicaram maior número de correlações significativas para os grupos suscetíveis (ScDP e

SsDP) em comparação aos grupos não-suscetíveis (NScDP e NSsDP). Isso sugere que a presença do haplótipo que confere suscetibilidade genética à DP influencia a produção de IL-8 e de FS em função de determinados parâmetros clínicos periodontais. Apesar disso, tal haplótipo de suscetibilidade genética à DP não teve influência suficiente para promover a produção de IL-8 em níveis diferentes entre indivíduos suscetíveis e não-suscetíveis à DP, como apresentado nas Figuras 5 e 6.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Considerando dados da literatura científica, até o presente momento não há nenhum estudo de associação investigando simultaneamente os índices clínicos periodontais, níveis da citocina IL-8 (no fluido sulcular) e a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico em indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP, conferida por meio dos haplótipos formados pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8*.

Neste estudo, como um cuidado metodológico, foi realizado um cálculo amostral para obterem-se *p*-valores estatisticamente significantes na possível associação entre os presentes fatores investigados, e desse modo conseguir resultados com nível aceitável de confiança.

Nos dados demográficos deste estudo, verificou-se que os indivíduos dos grupos sem DP (SsDP e NSsDP) apresentaram médias de idade semelhantes, assim como os indivíduos dos grupos com DP (ScDP e NScDP). Este resultado apresentou-se relevante, principalmente pela amostra selecionada caracterizar-se homogênea quanto à média de idade e desse modo os indivíduos dos diferentes grupos serem passíveis de comparações mais seguras. Como é possível observar na Tabela 1, a média de idade dos indivíduos sem DP apresentaram-se menor do que a dos indivíduos com DP. Este resultado concorda com os apresentados em outros estudos clínicos^{22,61,78} os quais relatam maior média de idade para os indivíduos com DP do que os sem DP.

Além disso, é importante salientar que, durante a seleção dos indivíduos participantes deste estudo, buscou-se alcançar a maior similaridade possível entre as médias de idades, gênero e número total de dentes dos indivíduos nos diferentes grupos, para que desse modo, fossem minimizados os fatores de confundimento tanto das características da DP quanto da suscetibilidade genética previamente encontrada.

Na análise clínica do presente estudo, no período *baseline*, os resultados dos parâmetros clínicos avaliados (IPV, ISM, SS, PS, NIC) não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP, contrariando a hipótese que talvez aqueles indivíduos com suscetibilidade genética apresentassem piores índices clínicos periodontais que aqueles sem suscetibilidade genética. Verificou-se também que independentemente da suscetibilidade genética, os indivíduos com DP apresentaram piores índices clínicos periodontais quando comparados aos sem DP, resultado esse, já esperado.

Ainda no período *baseline*, avaliando a mediana da PS de boca toda dos indivíduos dos grupos com DP (Tabela 5), observou-se que estes apresentaram uma DP de intensidade leve, na qual essa medida variou entre 2,3 mm (ScDP) e 2,5 mm (NScDP). Na avaliação da mediana do NIC de boca toda (Tabela 7), esses mesmos indivíduos apresentaram mensuração de perda de inserção clínica, indicando presença de

recessões gengivais^{34,45}, sendo possivelmente originadas por meio do envelhecimento do indivíduo, traumas advindos de escovação inadequada, alimentação, forças oclusais e/ou tratamento periodontal realizado há pelo menos um ano.

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, nova análise dos parâmetros clínicos periodontais foi realizada levando-se em consideração que a avaliação da resposta do periodonto à RAR (raspagem e alisamento radicular) não deve ser realizada antes de 4 semanas após o tratamento^{10,16,34}, pois mensurações tomadas prematuramente não irão representar a completa cicatrização dos tecidos e podem ser erroneamente interpretadas como resposta insatisfatória ao mesmo. De acordo com Cobb¹¹ (2002) as maiores reduções da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica ocorrem entre 1 e 3 meses após RAR, embora a cicatrização e maturação final possam ocorrer até 9 e 12 meses após o tratamento.

Como resultado do tratamento periodontal não-cirúrgico, verificou-se melhora em todos os índices clínicos periodontais, comparando-se com o período *baseline*, para todos os grupos avaliados, mas não houve diferenças estatisticamente significantes na resposta ao tratamento periodontal realizado entre os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP. Este resultado indica que a presença do haplótipo no gene *IL8* não foi capaz de influenciar a resposta ao tratamento e que a terapia periodontal realizada foi igualmente eficiente

para todos os grupos estudados. Em concordância com este achado, Pirhan et al.⁶¹ (2009) procuraram estabelecer associação entre polimorfismos genéticos no promotor do gene *MMP13* com níveis de MMP-13 no FS e com a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico em indivíduos com e sem DP. Como resultados, não encontraram associação significativa entre os polimorfismos genéticos e os níveis de MMP-13 no FS e nem mesmo com a resposta ao tratamento realizado. Desse modo, os autores concluíram que estes polimorfismos no gene *MMP13* não estariam influenciando a suscetibilidade à DP.

Acredita-se que o rigoroso controle de biofilme supragengival realizado quinzenalmente durante o presente estudo foi o responsável pelas reduções significantes dos IPV, ISM e SS no decorrer dos períodos^{15,28} em todos os grupos de indivíduos analisados (ScDP, SsDP, NScDP e NSsDP). Acredita-se que o SS pode ter diminuído devido ao tratamento periodontal, mas somente o controle de biofilme supragengival pode explicar a redução do SS para os grupos SsDP e NSsDP (que não foram tratados) após 45 dias³⁶.

As mudanças clínicas obtidas nos grupos ScDP e NScDP, mostram-se de acordo com estudos clínicos que descrevem a efetividade do tratamento não-cirúrgico na terapia periodontal. Estes estudos demonstram que o tratamento de RAR subgengival melhora significativamente as condições clínicas periodontais, por meio da diminuição da PS, ganho no NIC e diminuição na prevalência do SS^{4,34,45}.

A redução da PS após o tratamento periodontal para os grupos ScDP e NScDP pode estar associada com o ganho do NIC ou com o aumento da recessão gengival. Estudos clínicos^{4,35,45} têm demonstrado que diminuição de PS e ganho de NIC após tratamento periodontal não-cirúrgico depende da PS inicial e que existe uma grande probabilidade de sucesso da redução de PS em bolsas periodontais mais profundas independente do tipo de tratamento.

Outro fato de interesse é que em um defeito periodontal existente, mudanças reais em PS e NIC dificilmente podem ser diferenciadas de um erro de sondagem a menos que exceda 2 mm⁵⁴. Para minimizar este tipo de erro, foram realizadas sondagens por um examinador devidamente treinado e calibrado e foram confeccionadas placas de acrílico para padronizar a posição de inserção da sonda periodontal. Este método tem sido utilizado com boas perspectivas, entretanto é viável apenas em pesquisa acadêmica⁵⁴.

Na análise da quantificação do volume do FS, no período *baseline*, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP, como pode ser observado na Figura 4. No entanto, a maior quantidade de FS foi observada no grupo NScDP comparando-se ao grupo ScDP. Uma possível explicação para esse resultado é que talvez não seja o haplótipo no gene *IL8* que esteja influenciando a produção de FS nos indivíduos do grupo NScDP. Sabe-se que a DP é uma doença complexa e poligênica⁴⁶,

onde vários outros genes do sistema imune e da resposta inflamatória podem atuar de forma sinérgica levando à maior produção de FS. Acredita-se que para conhecer de forma mais ampla a carga genética dos indivíduos presentes nos diferentes grupos para relacioná-la à suscetibilidade à DP, seja mais apropriado utilizar a técnica de microarranjos do DNA, que investiga milhares de polimorfismos simultaneamente. No entanto, tal metodologia ainda é pouco acessível no Brasil, dado seu elevado custo.

Ainda no período *baseline*, independentemente da suscetibilidade genética verificou-se que os indivíduos com DP apresentaram maior volume do FS do que os sem DP (Figura 4). Este resultado concorda com os apresentados por Tsai et al.⁷⁹ (1995), Mathur et al.⁴⁹ (1996), Gamonal et al.²² (2000) e Jin et al.³² (2002), os quais detectaram maior volume de FS em indivíduos com periodontite crônica em comparação aos indivíduos considerados controles (sem DP).

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, nova quantificação de volume do FS foi realizada. Verificou-se que os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Os indivíduos dos grupos ScDP, SsDP e NSsDP apresentaram um leve aumento do volume do FS, mas estes foram estatisticamente insignificantes quando comparados com o *baseline*. Após 45 dias do tratamento periodontal, somente o grupo NScDP (Figura 4) apresentou menor volume de FS em

comparação com o período *baseline*. Este achado sugere que tal diminuição significativa foi devido ao maior volume do FS já apresentado no *baseline* pelo grupo NScDP em relação aos demais grupos. Este último achado está em concordância com outros estudos^{22,32}, os quais também encontraram menor volume de FS após a terapia periodontal em indivíduos com DP.

Na avaliação da quantidade total (ng/ml) e da concentração (ng/ μ l) da citocina IL-8 detectada no FS, no período *baseline*, verificou-se que os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Como pode ser observado nas Figuras 5 e 6, os indivíduos com DP apresentaram maiores níveis de quantidade total e concentração de IL-8 do que os sem DP. Este resultado concorda com os estudos de Gamonal et al.²² (2000), Tsai et al.⁷⁹ (1995) e Mathur et al.⁴⁹ (1996), os quais descreveram níveis mais elevados de IL-8 em indivíduos com DP em comparação aos sem DP. Entretanto, outros estudos^{14,31,59} encontraram concentração de IL-8 aumentada em indivíduos sem DP em comparação aos com DP. Uma possível explicação para essa discrepância poderia ser atribuída ao método de coleta da amostra imunológica empregado em cada estudo. O aumento de IL-8 poderia ser devido ao volume de FS encontrado em sítios periodontalmente doentes. Esta diferença no volume do FS dependeria da duração da coleta da amostra; no estudo de Özmeriç et al.⁵⁹ (1998) o FS foi coletado com tira de papel absorvente (filtro) por um

período de 3 minutos, enquanto no estudo de Mathur et al.⁴⁹ (1996), o FS foi coletado por um período de 20 segundos. Neste estudo, assim como o de Gamonal et al.²² (2000), o FS foi coletado com tira de papel absorvente (filtro) por um período de 30 segundos, com a intenção de evitar a secreção de citocina induzida por irritação mecânica provocada por um período longo de coleta de fluido. Além disso, também houve mensuração padronizada da quantidade de FS por meio do aparelho Periotron®.

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, os grupos ScDP, SsDP e NScDP não apresentaram redução na quantidade total (ng/ml) (Figura 5) e na concentração de IL-8 (ng/μl) (Figura 6) comparando-se ao respectivo *baseline*. Apenas o grupo NSsDP apresentou uma pequena redução na concentração de IL-8 (ng/μl), mas esta foi insignificante. Este resultado concorda com os achados de Chung et al.¹⁴ (1992) e Tsai et al.⁷⁹ (1995), os quais não encontraram reduções significantes na concentração de IL-8 em indivíduos com DP, após respectivamente, 15 e 30 dias de realizado a terapia periodontal. Entretanto, nossos resultados se mostraram diferentes dos resultados apresentados por Jin et al.³² (2002) e Gamonal et al.²² (2000), os quais observaram reduções significantes na concentração de IL-8 em indivíduos com DP após, respectivamente, 30 e 60 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. Possíveis explicações para essas diferenças de quantidade e concentração de IL-8

encontradas nos estudos acima citados poderiam ser atribuídas a vários fatores, como por exemplo, 1) os critérios estabelecidos para a seleção tanto de pacientes quanto de sítios periodontais para a realização da coleta do FS, e o método empregado para esta coleta; 2) o tempo percorrido após o tratamento periodontal para a realização da reavaliação clínica e imunológica; 3) possíveis variações no protocolo da terapia periodontal e nos resultados alcançados com o tratamento periodontal realizado³².

Verificando os resultados da análise imunológica deste estudo, sugere-se que a suscetibilidade genética à DP dada por diferentes haplótipos no gene *IL8* influenciou somente o volume do FS, mas não a presença da proteína IL-8 detectada no FS dos indivíduos avaliados. Este resultado parece indicar que esse haplótipo não é funcional, pois não foi capaz de influenciar a produção da citocina IL-8 pelos tecidos periodontais avaliados no FS. No entanto, estudos *in vitro*, apropriados à investigação da funcionalidade de haplótipos poderão contribuir para confirmar ou não se tais haplótipos no gene *IL8* são funcionais. Contudo, o presente estudo, por investigar *in vivo* a produção de IL-8 em pacientes com e sem DP, mediante diferentes haplótipos no gene *IL8*, fornece resultados mais relevantes do que se fossem obtidos *in vitro*, já que neste estudo são apresentados dados de indivíduos sob a influência real das peculiaridades da DP.

Neste estudo, correlacionando-se os dados clínicos periodontais com os dados imunológicos, observou-se que após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, o grupo NScDP mostrou correlação positiva entre ISM e volume do FS, pois à medida que o ISM diminuiu com o tratamento periodontal, o volume do FS também diminuiu. Observou-se também, neste mesmo período, que o grupo ScDP mostrou correlação positiva entre ISM e todos os parâmetros imunológicos avaliados. Este fato também indica que à medida que o ISM diminuiu com o tratamento periodontal, a quantidade total de IL-8, a concentração de IL-8 e o volume do FS também diminuíram. Isso possivelmente sugere que, na presença do haplótipo suscetível à DP determinados parâmetros clínicos periodontais estão mais diretamente relacionados à produção de IL-8 e FS do que o observado para os indivíduos carregando o haplótipo não suscetível à DP.

Em conjunto, diante dos resultados apresentados nas análises comparativas, observa-se que os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP dada pelo haplótipo no gene *IL8*, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes tanto nos índices clínicos periodontais quanto nos parâmetros imunológicos avaliados. Uma possível hipótese para explicar tais resultados, seria o valor obtido de *Odds Ratio* de 2,24 para os indivíduos suscetíveis, conferindo a chance 2 vezes maior desses indivíduos que carregam o haplótipo ATC/TTC no gene *IL8* de desenvolver a DP. Apesar de tal suscetibilidade genética ser

significativa, talvez se o *Odds Ratio* encontrado fosse mais alto, poderia ter-se encontrado associação do haplótipo com dados clínicos e imunológicos. Um estudo anterior com uma população brasileira semelhante, mostrou que mulheres carregando o haplótipo GCC/ACC no gene *IL10* tinham quase 9 vezes mais chance de desenvolver DP (*Odds Ratio* = 8,83; 95% de Intervalo de Confiança = 1,69-46,03) que mulheres carregando outros haplótipos⁶⁷. Outra possível explicação para não ter encontrado associação significativa do haplótipo de suscetibilidade à DP no gene *IL8* com dados clínicos e imunológicos, poderia ser o fato dos indivíduos com DP aqui investigados apresentarem uma periodontite de intensidade leve, que apresentaria menor quantidade de células e mediadores inflamatórios como neutrófilos e IL-8 no FS do que se fosse uma DP de intensidade moderada a severa. Como observado por Trombone et al.⁷⁸ (2009) e Ferreira et al.¹⁷ (2008) que investigando indivíduos com e sem DP de intensidade moderada a severa, encontraram associação de um polimorfismo no gene *TNFA* e no gene *IL1B*, respectivamente, com periodontopatógenos do complexo vermelho e aumento nos níveis de TNF- α e IL-1 β .

Pode-se depreender com os presentes resultados das análises comparativas, que este estudo demonstrou que a suscetibilidade genética à DP previamente encontrada, conferida por meio dos haplótipos formados pelos polimorfismos -251(T/A), +396(T/G) e +781(C/T) no gene *IL8* não está associada a piores índices clínicos periodontais, a níveis

aumentados na quantidade e concentração de IL-8 presentes no FS e nem na forma da resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico, em indivíduos com e sem DP. No entanto, na análise de correlação foi possível observar que no haplótipo que confere suscetibilidade genética à DP houve maior relação dos parâmetros clínicos periodontais em função da produção de IL-8 e FS, do que no haplótipo que não confere suscetibilidade.

É importante lembrar que o fator genético presentemente investigado é apenas um dos milhares de genes que atuam no sistema imune e que se relacionam à DP, de modo que a não comprovação clínica e imunológica de tal suscetibilidade genética à DP dada pelo haplótipo no gene *IL8*, não significa que o fator genético não influencia no desenvolvimento da DP. A principal evidência que mostra o envolvimento do fator genético na DP é dada por estudos em gêmeos, a qual foi estimada em aproximadamente 50%, mesmo após ajustes comportamentais⁵². Assim, mais estudos são necessários, e idealmente utilizando ferramentas mais sofisticadas de investigação genética, para melhor compreender o envolvimento do fator genético na DP e sua interação com dados clínicos e resposta imune, uma vez que a DP é uma doença complexa, mas tal interação dos diferentes fatores ainda foi pouco investigada.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Dentre os resultados clínicos e imunológicos obtidos deste estudo, concluiu-se que:

1) Não houve diferença nos índices clínicos periodontais e nos níveis da citocina IL-8 entre indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP, considerando-se o período *baseline*.

2) O tratamento periodontal não cirúrgico foi efetivo em melhorar a condição clínica periodontal, porém após 45 dias de finalizado o tratamento não houve redução da quantidade total da citocina IL-8 no FS tanto de indivíduos suscetíveis quanto de não-suscetíveis geneticamente à DP.

3) Indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP responderam de forma semelhante ao tratamento periodontal não-cirúrgico.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS*

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dentistry J.* 1975; 25: 229-35.
2. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
3. Astolfi CM, Shinohara AL, da Silva RA, Santos MC, Line SR, de Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 699-703.
4. Baderstein A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of non-surgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1981; 8: 57-72.
5. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1045-49.
6. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med.* 1998; 338: 640-44.

*De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* 1993; 64: 456-60.
8. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143: 50-7.
9. Brito Júnior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2004; 75: 1090-95.
10. Caton JG, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after single episode of root planning. *J Periodontol.* 1982; 53: 420-24.
11. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (Suppl 2): 6-16.
12. Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993; 64: 1205-08.
13. Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25 (OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun.* 1987; 55: 2945-50.

14. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 146-52.
15. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effects of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12 month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 30-6.
16. Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival flora in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 802-09.
17. Ferreira Jr SB, Trombone AP, Repeke CP, Cardoso CR, Martins Jr W, Santos CF, et al. IL1B +3954 SNP and red-complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1 β in diseased periodontal tissues. *Infect Immun.* 2008; 76: 3725-34.
18. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 297-303.
19. Flemmig T. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 32-7.

20. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J Periodontal Res.* 2007; 42 :541-45.
21. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest.* 1998; 78: 755-62.
22. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000; 71: 1535-45.
23. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 210-17.
24. Gemmell, E. & Seymour, G.J. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 28-38.

25. Genco RJ, Cohen DW, Goldman HM. Periodontia contemporânea. 1. ed. São Paulo: Santos, 1996. 727 p.
26. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol. 2003; 30: 145-53.
27. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Pallesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 β +3954 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. J Clin Periodontol. 1998; 35: 781-85.
28. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol. 2000 1994; 5: 78-111.
29. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters os periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1997; 24: 324-34.
30. Hodge, P. J., Riggio, M. P. & Kinane, D. F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. J Clin Periodontol. 2001; 28: 430-34
31. Jin LJ, Söder B, Corbet EF. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. J Periodontol. 2000; 71: 929-39.

32. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Söder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 604-14.
33. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001; 65: 313-21.
34. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. *J Periodontol.* 1988; 59: 783-93.
35. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J. Periodontol.* 1993; 64: 243-53.
36. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol.* 1996; 67: 93-102.
37. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 894-902.

38. Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA Cell Biol.* 2009; 28: 185-90.
39. Kinane DF, Hart TC. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14: 430-49.
40. Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, Di Giovine FS, Newnan MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 72-7.
41. Kurdouska AK, Noble JM, Adcock JE. Interleukin-8 and anti-interleukin-8 auto-antibodies in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Periodont Res.* 2003; 38: 73-8.
42. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedashi M, Nozaki T, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with porphyromonas gingivalis via toll-like receptor 2. *J Periodontol.* 2004; 75: 370-79.
43. Leonard EJ, Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1(NAP-1(interleukin - 8). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 2: 479-86.

44. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 675-80.
45. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L. Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1992; 9: 115-28.
46. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 159-79.
47. Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, et al. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65: 807-13.
48. Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race specific heterogeneity in early - onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65: 623-30.
49. Mathur A, Michalowicz B, Castilho M, Aeppli D. Interleukin-1 α , interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontol Res.* 1996; 31: 489-95.
50. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 21: 943-46.

51. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingival and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol.* 1998; 69: 865-71.
52. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 7: 1699-707.
53. Michel J, Gonzáles JR, Wunderlich D, Diète A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 483-88.
54. Mombelli A. Clinical parameter: biological validity and clinical utility. *Periodontology 2000.* 2005; 39: 30-9.
55. Moreira PR, de Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, et al. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 306-11.
56. Morrison EC, Ramfjord SP, Hill RW. Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J. Clin. Periodontol.* 1980; 7: 199-211.
57. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol.* 1989; 143: 1366-71.

58. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 248-66.
59. Özmeriç N, Ball B, Balos K, Berker E, Bulut S. The correlation of gingival crevicular fluid interleukin-8 levels and periodontal status in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69: 1299-1304.
60. Pihlstrom BL, McHugh RB, Oliphant TH, Ortiz-Campos C. Comparison of surgical and non-surgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 ½ years. *J. Clin. Periodontol.* 1983; 10: 524-41.
61. Pirhan D, Atilla G, Emingil G, Tervahartiala T, Sorsa T, Berdeli A. MMP-13 promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis: effects on GCF MMP-13 levels and outcome of periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 474-81.
62. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism in the human Interleukin-1 beta (IL-1 β) gene correlates with secretions in vitro. *Eur J Clin Inves.* 1992; 22: 396-402.
63. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrisom EC, Hill RW, Kerry GJ, Appeberry EA, et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J. Clin. Periodontol.* 1987; 14: 445-52.

64. Rasouli M, Kiany S. Association of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iranian patients. *Cytokine*. 2007; 38: 49-53.
65. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 (Suppl 6): 108-29.
66. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr RB, Line S RP. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 587-91.
67. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr RB, Camargo LEA, Line SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphism are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 443-48.
68. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 44-8.
69. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res*. 2000; 79: 1864-69.

70. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-44.
71. Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr. RB, Line SRP. MMP-1 promoter polymorphism: a risk factor for chronic periodontitis severity. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 154-58.
72. Stern DL. The problem of variation. *Nature.* 2000; 408: 529-31.
73. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun.* 1992; 60: 4932-37.
74. Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 94-106.
75. Tonetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard. 1997. p. 227-57.
76. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr RB, Souza AP, Line SRP. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 438-42.

77. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 233-39.
78. Trombone APF, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira Jr SB, Martins Jr W, Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor- α -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor- α in diseased periodontal tissues. *J Periodontol Res.* 2009; 44: 598-608.
79. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995; 66: 852-59.
80. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 23: 19-27.
81. Wang D, Sadée W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.* 2006; 188: 515-20.
82. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 393-407.

83. Wolf DL, Neiderud AM, Hinckley K, Dahlén G, van de Winkel JG, Papapanou PN. Fcγ receptor polymorphisms and periodontal status: a prospective follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 691-98.

ANEXOS

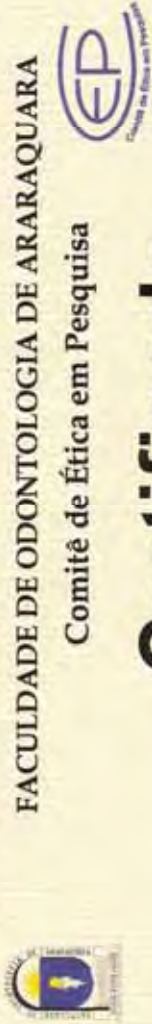
9 ANEXOS

9.1 Cópia do certificado de aprovação do Projeto anterior a este estudo pelo CEP.



9.2 Cópia do certificado de aprovação do presente Projeto pelo CEP.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
 Comitê de Ética em Pesquisa



Certificado


Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "*ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS COM SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À DOENÇA PERIODONTAL*", sob o protocolo nº 52/08, de responsabilidade do Pesquisador (a) *RAQUEL MANTUANEI SCAREL CAMINAGA*, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 04 (quatro) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "*MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ANALYSES IN INDIVIDUALS WITH GENETIC SUSCEPTIBILITY TO PERIODONTAL DISEASE*", protocol number 52/08, under Dr. *RAQUEL MANTUANEI SCAREL CAMINAGA*, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 04 (four) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 12 de dezembro de 2008.

Prof.ª Dr.ª Mirian Aparecida Onofre
 Coordenadora

9.3 Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do presente Projeto.

UNESP  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, (nome) _____ (nacionalidade) _____ portador do RG nº _____ residente à _____ na cidade de _____ Estado de _____ concordo voluntariamente em participar da pesquisa "Análise Microbiológica e Imunológica em Indivíduos com Suscetibilidade Genética à Doença Periodontal" e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:


1. Foi esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo estudar se a carga genética da pessoa (que foi herdada dos pais) influencia na defesa do corpo contra a inflamação, sangramento e dor na gengiva (Doença Periodontal) e na presença de bactérias entre o dente e a gengiva. Para isso, passarei por um exame clínico odontológico de rotina e o líquido entre o dente e a gengiva será coletado para o estudo (sem nenhum risco para mim). Isso será feito uma vez antes do tratamento periodontal e uma outra vez depois do tratamento periodontal.
2. Foi esclarecido que a realização da pesquisa não trará riscos para mim, pois: a) serão utilizados materiais descartáveis e instrumentais estéreis; b) para realização do tratamento periodontal há necessidade do uso de anestésicos locais, para tanto, foram feitas perguntas para mim para verificar se possuo alguma sensibilidade a algum anestésico; c) Também me perguntaram se tenho alguma doença como: do coração, diabetes, artrite. A intenção disso é evitar algum risco para mim, já que vou receber tratamento periodontal.
3. Foi esclarecido que, se for necessário fazer alguma cirurgia para tratar meu problema de gengiva ou dos dentes, serei encaminhado pelos pesquisadores responsáveis para Clínica especializada nesse tratamento.
4. Foi esclarecido que as amostras obtidas das coletas serão congeladas e posteriormente estudadas em laboratório. Com relação aos benefícios, além de eu ser informado da minha chance natural (genética) de ter Doença Periodontal, receberei tratamento periodontal e orientação de correta escovação dental. Além disso, estarei contribuindo espontaneamente para a comunidade científica conhecer melhor a relação entre a chance natural de ter Doença Periodontal, o sistema de defesa natural (sistema imune) da pessoa e a presença de bactérias no líquido que fica entre o dente e a gengiva.
5. Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retraindo o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
6. Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo de minha identidade, assegurando minha privacidade.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 200_

Telefone do Pesquisador Responsável
(16) 3301-6504

Assinatura do Paciente



Pesquisador Responsável
Profa Dra Raquel M. Scariel Caminaga

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa - FOAr
(16) 3301-6432/6434

Protocolo CEP nº 52/08
Aprovado em Reunião de
05/12/08
Recebido no CEP - FOAr

9.4 Modelo da ficha clínica utilizada no presente Projeto de pesquisa.

Laboratório de Genética e Biologia Molecular

No:

Seleção de pacientes para pesquisa: “Análise Microbiológica e Imunológica em Indivíduos com Suscetibilidade Genética à Doença Periodontal”

QUESTIONÁRIO

Nome: _____
 Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____
 Residência: _____ No: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ Telefone: _____
 Profissão: _____ Telefone Comercial: _____

- Grupo Controle
 Grupo Doença Periodontal – Experimental

HISTÓRICO GERAL

1. Está em tratamento médico? Sim Não
 Porque? _____
2. Doenças anteriores? _____
3. Doenças recentes? _____
4. Usa medicamentos? Sim Não
 Quais? _____
5. É alérgico à algum medicamento? (anestesia, merthiolate, penicilina, iodo, sulfa...)
 Sim Não
6. Quando se fere, as feridas demoram a cicatrizar? Sim Não
7. Já teve hemorragia após extração dentária ou outra cirurgia? Sim Não
8. É diabético ou tem algum diabético na família? Sim Não
 Quem? _____
9. Fumante? Sim Não
 Quanto tempo? _____ Frequência: _____
10. Ex-fumante? Sim Não
 Período em que fumou? _____ Frequência: _____
11. Tem osteoporose? Sim Não
12. Tem problema respiratório? (asma, bronquite...) Sim Não
13. Tem algum problema cardíaco? Sim Não
 Qual? _____

14. Sabe sua pressão arterial? () Sim () Não
Quanto? _____
15. Tem artrite? () Sim () Não
16. Toma anticoncepcional? () Sim () Não
Qual? _____
17. Faz reposição hormonal? () Sim () Não
18. Está na menopausa? () Sim () Não
19. Está grávida? () Sim () Não

HISTÓRICO BUCAL

1. Sua gengiva sangra com facilidade? () Sim () Não
2. Alguma alteração gengival aguda? () Sim () Não
Que tipo? _____
3. Sente seus dentes inseguros? () Sim () Não
4. Doem? () Sim () Não Região: _____
5. Halitose? () Sim () Não Mau gosto? () Sim () Não
6. Usa fio dental? () Sim () Não
Frequência: _____
7. Como escova os dentes? _____
Frequência: _____
8. Usa outros meios de higiene oral? () Sim () Não
Qual? _____
9. Já fez tratamento periodontal? () Sim () Não
Há quanto tempo? _____
10. Bruxismo? () Sim () Não
11. Respiração Bucal? () Sim () Não
12. Dor nos músculos mastigatórios? () Sim () Não
Especificar: _____
13. Dor ou ruído na ATM? () Sim () Não
Especificar: _____

Autorização para Reprodução

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 25 de março de 2010.

SÂMIA CRUZ TFAILE CORBI