



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

Giovana Anovazzi

**COMPARAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS
ENTRE INDIVÍDUOS GENETICAMENTE SUSCETÍVEIS À
PERIODONTITE PELA PRESENÇA DE UM HAPLÓTIPO
NO GENE *INTERLEUCINA 4* E INDIVÍDUOS
GENETICAMENTE PROTEGIDOS CONTRA A
PERIODONTITE**

**ARARAQUARA
2012**

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

GIOVANA ANOVAZZI

**COMPARAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ENTRE
INDIVÍDUOS GENETICAMENTE SUSCETÍVEIS À PERIODONTITE PELA
PRESENÇA DE UM HAPLÓTIPO NO GENE *INTERLEUCINA 4* E
INDIVÍDUOS GENETICAMENTE PROTEGIDOS CONTRA A PERIODONTITE**

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
2012**

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

GIOVANA ANOAZZI

**COMPARAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS ENTRE
INDIVÍDUOS GENETICAMENTE SUSCETÍVEIS À PERIODONTITE PELA
PRESENÇA DE UM HAPLÓTIPO NO GENE DA IL-4 E INDIVÍDUOS
GENETICAMENTE PROTEGIDOS CONTRA A PERIODONTITE**

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, 09 de março de 2012.

Dados Curriculares

Giovana Anovazzi

- Nascimento:** 25 de novembro de 1986
- Filiação:** Allan Anovazzi
Margarete Maretti Anovazzi
- 2005-2008:** Curso de Graduação em Odontologia pela
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2009/2010:** Curso de Especialização em Periodontia pela
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2010/2012:** Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Periodontia, Nível Mestrado da Faculdade
De Odontologia de Araraquara- Unesp.

Dedicatória

A Deus

Por estar presente em minha vida. E por me acompanhar em todos os momentos. Por sempre me confortar nos momentos difíceis, me levantando a cada queda! Pela Fé absoluta e pela certeza que sinto que está sempre ao meu lado me amparando.

Aos meus pais, **Allan e Margarete**

Que me ensinaram que com muito trabalho, garra, ética persistência e amor

Podemos Conseguir Tudo Aquilo Que Desejamos!!

Obrigada por sempre me mostrarem o melhor caminho a ser seguido!!

Por sempre estarem ao meu lado!

Por todo amor, compreensão e incentivo, pelas palavras de carinho e por confiarem sempre em mim!

Tenho muito orgulho de vocês serem os meus PAIS!

E agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida!

“É preciso amar direito, Um amor de qualquer jeito...

Ser amor a qualquer hora, Ser amor de corpo inteiro

Amor de dentro prá fora...Um AMOR maior que eu...”

Ao meu irmão, **Allan Anovazzi Filho**

Por fazer parte da minha vida, me apoiar e sempre torcer pelo meu sucesso.

A minha tia, **Marinete Maretti**

Por estar sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando!

Obrigada pelo seu carinho e assistência em todas as etapas da minha vida!

Sempre acreditando e me fazendo acreditar que poderia ser mais, e ir além!

Agradecimentos Especiais

Aos meus **Familiares**,

Que são parte da minha vida, me apoiando sempre em cada passo a ser tomado, torcendo sempre pelas minhas conquistas e comemorando minhas vitórias. Muito obrigada pelo carinho, amor, apoio, compreensão e incentivo!

Ao **Fernando**,

Por sempre torcer pelo meu sucesso. Muito obrigada pela assistência e ajuda com os gráficos, tabelas, estatística da dissertação. Com certeza sua ajuda foi fundamental para finalizar este trabalho.

À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**,

Por ter me apresentado à Pesquisa, contribuindo para que eu chegasse até o curso de Mestrado. Pela confiança em mim depositada. Por ter se tornado além de um exemplo a ser seguido, uma grande amiga!

Um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão e competência!

Admiro muito você!!

À **Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio oferecido neste trabalho.

À **Pós-Doutoranda Andrea Marcia Marcaccini**, Muito obrigada por toda ajuda e paciência na parte experimental que foi fundamental para concluir essa pesquisa. Agradeço pela atenção, confiança e disponibilidade!

À Profa. Dra. Marisa Veiga Capela,

do Instituto de Química – UNESP, obrigada por toda atenção e ajuda com os cálculos estatísticos.

As amigas: **Lívia Finoti, Sâmia Corbi, Suzane Pigossi e Luana Pires,**

Pela amizade, dedicação e apoio que sempre me deram! Por sempre estarem ao meu lado, por me ajudarem na realização desta pesquisa. Pelas horas de conversa, choros e desabafos. Muito obrigada por fazerem parte da minha vida, por serem minhas Amigas de Verdade, minha Família em Araraquara, por tornarem esta jornada mais leve e meus dias mais felizes!

“Amigos para sempre é o que nós iremos ser

Na primavera ou em qualquer das estações

Nas horas tristes, nos momentos de prazer

Amigos para sempre...”

As minhas amigas: **Ana Lígia P. Micelli, Maria Emília C. Pontes, Maria**

Eugênia L. Lunardi,

Pela amizade, dedicação e compreensão de sempre. Que mesmo não estando presentes no meu dia-a-dia, sempre soube que poderia contar com vocês!

Vocês não imaginam a falta que vocês me fazem em Araraquara!

Obrigada por vocês existirem na minha vida, Amo vocês infinitamente!

“Amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito, dentro do coração... Pois seja o que vier, venha o que vier ...Qualquer dia, amigo, eu volto...A te encontrar..... Qualquer dia, amigo, a gente vai se encontrar”

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. **Carlos Rossa Junior**, 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: **Fabiana, Fausto, Felipe, Fernanda, Livia, Luiz, Marcell, Pablo, Rafael, Sabrina**, pela amizade sincera e pelos bons momentos de convivência, por todo apoio e dedicação nesses dois anos, acredito que construímos amizades verdadeiras e quero levá-los comigo sempre!!

Aos colegas da Pós-Graduação: **Alliny, Andressa, Ana Lúcia, Chaine, Guilherme, João, João Paulo, Jonatas, Leila, Luana, Livia, Lucas, Mário, Michele, Nicole, Nicolau, Rodrigo, Rubinho, Sâmia, Shelon, Telma**, pela convivência harmoniosa e companheirismo.

À todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, **Claudinha, D. Maria do Rosário, D. Teresa, Maria José (Zezé), Ester, Priscila, 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

“Decolar, mesmo que com medo de avião.
Navegar, mesmo que a rota tenha que ser traçada no meio da viagem.
Arriscar, mesmo que a única coisa a apostar seja a sua própria coragem.
Liberdade é saber que o céu não é o limite.
Liberdade é saber que não existem garantias.
Você vai ser mais feliz se arriscar mais,
Se entender que errar nada mais é do que estar a um passo do acerto,
Mesmo que a dois do próximo erro. Não importa.
O caminho se faz na caminhada.
Na verdade na vida, o que realmente importa é ser Feliz!”
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Nomenclaturas	14
Resumo	16
Abstract	20
1 Introdução	23
2 Revisão de Literatura	27
2.1 Doença Periodontal.....	28
2.2 Fatores Imunológicos envolvidos na doença periodontal.....	29
2.2.1 Interleucina 4.....	29
2.2.2 Metaloproteínases de Matriz.....	31
2.3 Fatores Microbiológicos envolvidos na doença periodontal.....	33
2.4 Fatores Genéticos envolvidos na doença periodontal.....	34
2.5 Tratamento periodontal não- cirúrgico.....	36
2.6 Investigação da característica multifatorial da doença periodontal.....	37
3 Proposição	40
4 Material e Método	42
4.1 Cálculo da amostra.....	43
4.2 Seleção da amostra.....	43
4.3 Calibração do examinador.....	46
4.4 Delineamento do estudo.....	46
4.4.1 Cronograma de execução da metodologia.....	46
4.4.2 Análise clínica periodontal.....	48
4.4.2.1 Confirmação da atividade da doença.....	50
4.4.3 Coleta de fluido sulcular.....	51
4.4.4 Tratamento Periodontal.....	53
4.5 delinearmento do estudo.....	54
4.5.1 Análise imunológica.....	54
4.5.1.1 Construção da curva padrão para Periotron.....	54
4.5.1.2 Preparo das Amostras e teste Elisa para quantificação da IL-4.....	55
4.5.1.3 Preparo das Amostras e teste Elisa para quantificação da MMP-8....	57
4.6 Planejamento Estatístico.....	58
5 Resultado	60
5.1 Característica da População estudada.....	61
5.2 Análise Clínica- boca toda.....	63

5.3 Análise Clínica- sítios periodontais selecionados.....	74
5.4 Análise Imunológica.....	79
5.5 Análise de Correlação.....	87
6 Discussão	92
7 Conclusão.....	104
8 Referências.....	106
9 Anexos.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

°C – Grau Celsius

CAL – *Clinical Attachment Loss*

CXCR-1 – Receptor 1 da Interleucina-8

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FS – Fluido sulcular

g – Gravidade

IL – Interleucina

IPV – Índice de Placa Visível

ISM – Índice de Sangramento Marginal

LEE – Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Faculdade de Medicina da USP)

LPS – Lipopolissacarídeos

MMP – Metaloproteinase de matriz

mm – Milímetro

μl – Microlitro

NIC – Nível de Inserção Clínica

nm – Nanômetro

ng/ml – Nanograma por mililitro

pg/ml – Picograma por mililitro

pH – Potencial hidrogeniônico

PS – Profundidade de Sondagem

PcDP – Protegidos geneticamente com DP

PsDP – Protegidos geneticamente sem DP

RAR – rs – Coeficiente de Correlação de Spearman

Raspagem e alisamento radicular

RNA_m – RNA mensageiro

SS – Sangramento à Sondagem

ScDP – Suscetível geneticamente com DP

SsDP – Suscetível geneticamente sem DP

Th1- Linfócito T Helper 1

Th2 – Linfócito T Helper 2

TLR4 – Receptor semelhante à *toll-4*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VDR – Receptor de vitamina D

Resumo

Anovazzi G. Comparação de dados clínicos e imunológicos entre indivíduos geneticamente suscetíveis à periodontite pela presença de um haplótipo no gene *Interleucina 4* e indivíduos geneticamente protegidos contra a periodontite [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

A Doença Periodontal (DP), desencadeada pela infecção de microrganismos periodontopatogênicos tem sua progressão e morbidade grandemente influenciada pela suscetibilidade genética do hospedeiro. Dentre as várias citocinas produzidas pelo periodonto inflamado está a Interleucina 4 (IL-4). Estudos recentes realizados por este grupo demonstraram que os polimorfismos -590(T/A), +33(T/G) e VNTR (Inserção/Deleção) no gene *IL4*, bem como haplótipos formados por eles, estavam associados à periodontite crônica, mesmo após ajustes para idade, gênero, cor da pele e hábito de fumar. O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que há diferença nos índices clínicos periodontais e nos níveis de IL-4 no fluido sulcular gengival de pacientes suscetíveis e protegidos, e como segundo objetivo foi avaliar a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico, em função da referida carga genética. Foram selecionados 62 pacientes que carregavam um haplótipo no gene *IL4* que confere suscetibilidade genética à periodontite crônica ou que confere proteção contra o desenvolvimento desta, tendo sido subdivididos quanto à presença ou ausência da periodontite crônica. Cada paciente foi submetido a exame clínico periodontal e coleta de fluido sulcular (FS) antes

(*baseline*), 45 e 90 dias após finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. A citocina IL-4 foi quantificada por meio de teste imunoenzimático (ELISA). Como resultado verificou-se que, comparando indivíduos geneticamente suscetíveis à DP com os geneticamente protegidos, no período *baseline*, houve diferença estatisticamente significativa dos índices de placa visível, sangramento marginal e sangramento à sondagem considerando tais parâmetros clínicos de boca toda. Não houve diferença significativa quanto à resposta ao tratamento periodontal, avaliando os índices clínicos periodontais. A quantidade total e a concentração de IL-4 foi significativamente diferentes entre os indivíduos geneticamente suscetíveis à DP e os geneticamente protegidos, nos períodos de 45 e 90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico. A presença do haplótipo que confere suscetibilidade genética à DP ou proteção contra o desenvolvimento desta correlacionou-se com determinados parâmetros clínicos periodontais em função da produção de IL-4 ou do volume de FS. Concluiu-se que a suscetibilidade genética à DP conferida pela presença de haplótipos no gene *IL4* influenciou no período *baseline* alguns dos índices clínicos periodontais avaliados, bem como a produção da citocina IL-4 após 45 e 90 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. Além disso, a correlação de parâmetros clínicos periodontais com a produção de IL-4 ou com o volume de FS foi significativa em grupos com diferentes cargas genéticas. Futuros estudos *in vitro* poderão contribuir para compreender como os diferentes haplótipos influenciam a taxa de transcrição e tradução da proteína IL-4, bem como isso poderia ser influenciado pela ação de microrganismos, tal como ocorre na doença periodontal.

Palavras-chave: Interleucina-4; Polimorfismo genético; Suscetibilidade à doença; Periodontite.

Abstract

Anovazzi G. Comparison of clinical and immunologic data between individuals genetically susceptible to periodontitis and genetically protected against periodontitis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

Periodontal disease (PD) is an encompasses multifactorial disease. Genes belonging to the immune response have been investigated as a potential factor influencing the susceptibility to PD. Among the various cytokines produced by the inflamed periodontium is interleukin 4 (IL-4), which is a potent downregulator of macrophage function that inhibits the secretion of proinflammatory cytokines. Previously, we identified a haplotype formed by -590(T/A), +33(T/G) and VNTR (variable number of tandem repeats; I/D) polymorphisms in the *IL4* gene that conferred susceptibility to or protection against PD. The aim of this study was to investigate whether subjects with genetic susceptibility [S] to PD compared to genetically protected [P] individuals would present both differences in the clinical parameters and levels of IL-4 in sulcular fluid, and if these were different 45 and 90 days after non-surgical periodontal treatment. Those patients were subdivided in: genetically susceptible without PD (healthy) (SH, n=16), genetically susceptible with PD (SPD, n=16), genetically protected without PD (PH, n=20), and genetically protected with PD (PPD, n=10). Periodontal clinical examination and collection of periodontal sulcular fluid were performed for each patient at baseline, 45 and 90 days after finishing the non-surgical periodontal treatment. The cytokine IL-4 was measured by the use of Enzyme Immunoassay (ELISA). The results

showed that comparing the genetically susceptible with the genetically protected individuals to PD, there were significant differences in clinical parameters: plaque index ($p=0.013$), bleeding index ($p=0.005$), bleeding on probing ($p=0.015$) at baseline. There were no significant differences in clinical parameters 45 and 90 days after completion of the periodontal treatment. The total amount and concentration of IL-4 was different between individuals after non-surgical treatment. The presence of haplotype that conferred susceptibility to or protection against PD was correlated with clinical periodontal parameters based on sulcular fluid production of IL-4. It was concluded that genetic susceptibility to PD conferred by the presence of haplotypes in the gene IL4 influenced at baseline some of the clinical periodontal parameters evaluated, well as the production of the cytokine IL-4 after 45 and 90 days of the non-surgical finalized periodontal treatment. Furthermore, the correlation of clinical periodontal parameters with the production of IL-4 or with the volume of FS was significant in groups with different genetic load. Future in vitro studies could contribute to understand how different haplotypes could influence the rate of transcription and protein translation of IL-4, as well as how this could be influenced by the action of microorganisms, such as it occurs in the periodontal disease.

Keywords: Interleukin-4; Polymorphism, Genetic; Disease susceptibility; Periodontitis.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é caracterizada por um processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de suporte do dente, a qual tem origem infecciosa^{38, 127}. Em outras palavras, o acúmulo de bactérias no sulco gengival pode desencadear um processo inflamatório que, se não tratada, destrói o periodonto, e eventualmente resulta em perda dos dentes⁵⁴. A resposta do hospedeiro é determinada como fator chave na expressão da periodontite²⁹. Cerca de 20% das doenças periodontais é atribuída à variação bacteriana, 50% têm sido atribuídas à variância genética e mais de 20% ao uso de tabaco^{70, 87}. Dessa forma a doença periodontal tem sido considerada uma patologia de caráter multifatorial⁷⁰.

Nos últimos anos têm sido investigados os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição do tecido periodontal^{100, 110}. 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 tecidual¹¹⁰. Apesar disso, 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 doença⁶⁵. Portanto, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da DP^{64, 100, 110}.

A resposta imune subjacente à patogênese da doença periodontal tem sido muito estudada. Observando-se a literatura, os estudos tem mostrado grande interesse em 1) verificar a produção de citocinas por meio de testes imunoenzimáticos ^{17, 32, 47, 61, 134}; 2) verificar a suscetibilidade genética do indivíduo à DP, investigando-se genes que codificam proteínas do sistema imune, como a interleucina 1⁸⁵, *IL 2*¹⁰⁴, *IL6*^{105, 120}, *IL4*^{5, 103} e metaloproteinases *MMP1*³⁰, *MMP8*²² e *MMP13*⁹⁰.

A IL-4 é uma importante citocina, derivada de células Th2, que desempenha várias funções importantes no sistema imune como: a) diminui potentemente a função de macrófagos; b) atua como mitógeno de células B e induz sua diferenciação após estímulo com LPS de bactérias; c) estimula a mudança do isotipo da célula B de IgM para IgE; d) diferencia linfócitos T virgens em subpopulações Th2². A IL-4 estimula células Th2 e inibe as funções de células Th1 ^{17, 123}. Por esses motivos o envolvimento da IL-4 na DP tem sido investigado, mostrando, contudo, resultados contraditórios ^{71, 79, 99, 103}.

Polimorfismos nos genes que codificam interleucinas podem explicar as diferenças individuais dos seus níveis proteicos, principalmente se dentro de regiões chamadas exons ou do promotor. Um estudo recente realizado pelo presente grupo de pesquisa investigou três polimorfismos no gene *IL4* (-590 C/T, +33 C/T e 70 pb Del/Ins) em 250 indivíduos com e sem DP, sendo que foi observada significativa associação com a periodontite crônica de cada polimorfismo individualmente. Também, indivíduos com o haplótipo TCI/CCI mostraram-se 5 vezes mais suscetíveis à DP. Todos os resultados mantiveram-

se significativos após ajustes das variáveis: idade, gênero, cor da pele e hábito de fumar ⁵.

Na literatura há poucos estudos que investigaram a combinação de mais de um fator simultaneamente nos mesmos indivíduos com doença periodontal. Alguns estudos analisaram polimorfismo genético e produção de citocinas ^{49, 79, 108}, e outros a análise da microbiota subgengival e de polimorfismos genéticos ^{36, 121, 122, 130}. É necessária a realização de novos estudos que investiguem a inter-relação de fatores como a, suscetibilidade genética, produção de citocinas e participação de microorganismos na DP, para que haja um melhor entendimento da etiopatogenia da doença.

Revisão de

Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Periodontal

A doença periodontal tem como fator etiológico primário a presença de bactérias periodontopatogênicas, e devido essas bactérias residirem nas margens gengivais, o sistema imune apresenta dificuldade em eliminar os microrganismos¹⁰⁹. A resposta local do hospedeiro contra as bactérias periodontopatogênicas é o recrutamento de leucócitos e subsequente liberação de mediadores inflamatórios⁸⁶. Essa situação particular leva a uma inflamação crônica e a uma contínua resposta exacerbada do hospedeiro, resultando em destruição do tecido periodontal de proteção e sustentação dos dentes. Isso proporciona a formação de bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar, e eventual perda do dente⁸.

Na Odontologia, a DP pode ser considerada a doença crônica mais comum em adultos e é iniciada pelo desequilíbrio entre a placa bacteriana e a resposta do hospedeiro²⁹. Este desequilíbrio pode ser causado devido a vários fatores como a modificação de fatores ambientais ou pela diminuição da eficácia do sistema imune do hospedeiro⁴⁶.

Dessa forma, pode-se entender a DP como uma doença infecto-inflamatória que resulta da interação entre o biofilme e os mecanismos de defesa do hospedeiro, e é sustentada por uma rede de mediadores pró e anti-inflamatórias que podem desempenhar atividades biológicas antagonistas e/ou sinérgicas¹¹⁸.

Os principais eventos histopatológicos que ocorrem na DP são mudanças inflamatórias agudas em resposta a colonização microbiana; influxo de neutrófilos; deslocamento apical do epitélio juncional adjacente a bolsa periodontal; destruição inflamatória do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio da bolsa; acúmulo de células inflamatórias crônicas; reabsorção osteoclástica do osso alveolar^{9, 83}.

2.2 Fatores Imunológicos envolvidos na Doença Periodontal

Os mediadores químicos da inflamação desempenham um papel fundamental na perda de tecido conjuntivo e osso alveolar^{44, 92}. Dentre eles destacam-se numerosas citocinas que são produzidas em resposta aos microrganismos e outros antígenos desempenhando um papel central na patogênese da DP⁴².

2.2.1 Interleucina 4

Citocinas são moléculas protéicas pequenas que apresentam um vasto patamar de funções biológicas potentes^{6, 19, 129}, enviando diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. São produzidas por uma variedade de células incluindo os linfócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos, bem como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos teciduais^{6, 19}. Algumas citocinas têm sido caracterizadas como pró-inflamatórias e estão envolvidas na resposta Th1 (IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral - TNF- α , IL-8, IL-12), sendo que outras citocinas atuam como anti-inflamatórias e estão envolvidas em resposta imune

Th2 (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13)^{13, 126}. Doenças inflamatórias podem ser induzidas e perpetuadas por produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias ou possivelmente por uma falha na produção apropriada de citocinas anti-inflamatórias, e esse parece ser o caso da doença periodontal^{43, 86}.

Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) que produzem IL-2 e interferon gama (IFN- γ) parecem estar envolvidas na destruição dos tecidos periodontais, enquanto linfócitos Th2 parecem protegê-los³⁴. Uma importante citocina, a IL-4, derivada de células Th2, desempenha várias funções importantes no sistema imune como: a) diminui potentemente a função de macrófagos; b) atua como mitógeno de células B e induz sua diferenciação após estímulo com LPS de bactérias; c) estimula a mudança do isotipo da célula B de IgM para IgE; d) diferencia linfócitos T virgens em subpopulações Th2². A IL-4 estimula células Th2 e inibe as funções de células Th1^{17, 123}. Por esses motivos o envolvimento da IL-4 na DP tem sido investigado, mostrando, contudo, resultados contraditórios na literatura.^{71, 79, 99, 103}

Alguns estudos investigaram a presença da IL-4 no fluido de pacientes periodontais. Shapira et al.¹⁰⁶ sugerem que a ausência de IL-4 pode ter sido a causa do acúmulo de macrófagos no periodonto inflamado. Outro estudo demonstrou que a adição de IL-4 exógena induz apoptose em macrófagos isolados de tecidos gengivais inflamados¹³³. Em concordância, Giannopoulou et al.⁴⁷ encontraram maiores níveis da IL-4 no fluido gengival de pacientes saudáveis em comparação aos pacientes com periodontite.

Aumento significativo na concentração da IL-4 no fluido gengival também foi observado após a melhoria dos parâmetros clínicos periodontais¹²³. Bastos

et al.¹¹ não encontraram diferença significativa na quantidade total de IL-4, entretanto a concentração de IL-4 também foi maior em sítios saudáveis do que em sítios doentes. Em adição notou uma correlação inversa na concentração de IL-4 com os dados clínicos periodontais: PS, SS, NI¹¹. Esses resultados em conjunto sugerem que a IL-4 está associada com a remissão da condição inflamatória da periodontite e com a melhora dos índices clínicos periodontais. Entretanto, a literatura apresenta resultados conflitantes sobre a presença da IL-4 (RNAm e/ou proteína) em fluido ou tecido gengival de indivíduos com doença periodontal, sendo que alguns pesquisadores foram capazes de detectá-la^{17, 75, 132}, e outros não^{11, 39, 106, 123, 131, 133}. Tais resultados discrepantes podem ser atribuídos devido à variação no grau de inflamação da amostra investigada, a variação do material biológico coletado e também a utilização de técnicas diferentes com níveis de sensibilidade diferentes.

2.2.2 Metaloproteinases de Matriz

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são secretadas ou liberadas por uma variedade de células como leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, fibroblastos, células ósseas, células epiteliais e endoteliais. As MMPs formam uma importante família de endopeptidases dependentes de íons zinco e cálcio que exercem suas funções em pH neutro e utilizam os diferentes constituintes da matriz extracelular como seus substratos⁹⁸. Semelhante a todas as proteinases secretadas, a atividade catalítica das MMPs é regulamentada de quatro maneiras: expressão gênica, compartimentalização, ativação de pró-enzimas (zimógenos) e inativação enzimática, e ainda pode ser

controlada pela disponibilidade e afinidade do substrato. Normalmente as MMPs não são expressas em tecidos normais e saudáveis⁸⁸.

Vinte e quatro diferentes tipos de MMPs foram identificados nos vertebrados, e a maior parte delas é encontrada nos seres humanos¹²⁸. Essa família de MMPs é subdividida em seis grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinases de membrana e outras MMPs.

Dentre as MMPs, a MMP-8 está presente nos grânulos dos neutrófilos polimorfunucleares⁵³, mas também são expressas por uma variedade de outras células presentes no periodonto normal e no doente¹¹⁴. A MMP-8 também é expressa por fibroblastos gengivais em resposta a mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e interleucina 1 β que estão associados com a patogênese da doença periodontal¹¹².

A MMP-8 tem demonstrado ser o predominante tipo de colagenase encontrada nos tecidos periodontais doentes, fluido crevicular gengival e na saliva de pacientes que apresentam periodontite crônica^{112, 113, 124}. Golub, et al.⁴⁸ verificaram que a MMP-8 representa 80% do total de colagenases encontradas no fluido crevicular gengival. Soder et al.¹¹¹ demonstraram por meio de ensaios imuno-específicos de MMP-8 que a taxa desta colagenase reflete a severidade da periodontite.

Outros estudos demonstraram que há um aumento dos níveis de MMP-8 no fluido crevicular gengival associado à severidade da periodontite crônica e que depois do sucesso do tratamento periodontal ocorre uma diminuição desses níveis^{21, 66, 124}.

2.3 Fatores Microbiológicos envolvidos na Doença Periodontal

Como mencionado, a DP é causada principalmente por bactérias que levam a destruição dos tecidos de suporte dos dentes¹²⁷. Mais recentemente tornou-se claro que um amplo perfil de bactérias Gram-negativas é encontrado em sítios afetados pela DP (sítios doentes). Os patógenos predominantemente encontrados nos sítios doentes são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Campylobacter rectus*, e *Treponema denticola* (Td)^{1, 27, 101}.

Salvi et al.¹⁰⁰ e Socransky et al.¹¹⁰ investigaram nos últimos anos, os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição tecidual características da DP. As bactérias associadas à doença podem causar destruição no periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta das próprias bactérias que liberam seus subprodutos do metabolismo e enzimas; 2) pela ação indireta: estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células hospedeiras, promovendo a autodestruição tecidual.

Embora os microrganismos patogênicos possuam um papel importante na etiologia da DP, o início e a progressão da doença são devidos uma combinação de fatores ambientais e do hospedeiro³¹, então sua mera presença na cavidade bucal não é suficiente para explicar diferenças interindividuais na severidade da doença⁶⁵. Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da DP^{31, 64, 100, 110}.

2.4 Fatores Genéticos envolvidos na Doença Periodontal

Uma quantidade considerável de evidências apóia a participação de fatores genéticos na patogênese da doença periodontal (suscetibilidade, progressão e/ou a resposta ao tratamento da DP ^{64, 69, 100}. Vários estudos têm investigado a influência genética na DP, por exemplo, estudos de análise de agregação familiar ^{16, 72}, estudos de associação do tipo caso-controle ^{65, 91, 117}, e outros envolvendo gêmeos ^{25, 78}. Michalowicz et al. ⁷⁸ revelaram em um estudo em gêmeos que fatores genéticos são responsáveis por cerca de 50% da hereditariedade da DP.

Na DP, 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, sendo as interleucinas um dos principais tipos de citocinas. Os envolvimento de polimorfismos em genes de citocinas têm sido cada vez mais investigados nas doenças inflamatórias ^{14, 54, 94}. Diferenças individuais nos níveis de interleucinas relacionados aos diferentes graus de suscetibilidade à DP podem ser atribuídas, entre outros fatores, a polimorfismos em seus respectivos genes. Um polimorfismo genético é caracterizado pela ocorrência de, pelo menos, dois alelos em um locus, quando o alelo mais raro deve ter a frequência superior a 1% na população ¹⁵. Como exemplo, a frequência do alelo 2 do polimorfismo *IL1B* (+3953) está aumentada em pacientes com doença periodontal avançada ⁵⁰. Pociot et al. ⁹¹ verificaram que 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. Nieri et

al.⁸⁴ demonstraram que a extensão da perda óssea no exame inicial juntamente com o polimorfismo no gene *IL1* pode ser um indicador prognóstico de perda óssea futura para o paciente. Mc Guire & Nunn⁷⁶ observaram 2,7 vezes mais risco de perda óssea em pacientes com o genótipo positivo para *IL1*.

Enquanto polimorfismos no gene *IL1* são os principais investigados em relação à periodontite, também têm sido investigados na DP polimorfismos em genes como *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *VDR* (receptor de vitamina D), *TLR4* (receptor semelhante à *Toll - 4*), *MMP1*, *TNFA* (fator de necrose tumoral - alfa) e polimorfismos funcionais de imunoglobulina G (IgG)^{31, 69, 85, 107}. Polimorfismos em genes de citocinas foram associados à severidade e/ou suscetibilidade à periodontite crônica e periodontite agressiva^{5, 10, 40, 50, 65, 102, 104, 116, 129}.

Foi possível verificar que a periodontite, assim como a artrite reumatóide são doenças inflamatórias que se mostram associadas à haplótipos no gene *IL4*¹⁸. A literatura também relata a associação de polimorfismos nesse gene com o acometimento de doenças autoimunes como a esclerose múltipla e o lúpus eritematoso sistêmico¹²⁵.

Estudos recentes realizados pelo presente grupo de pesquisa investigaram polimorfismos no gene *IL4* em 250 indivíduos com e sem DP, e demonstraram que o haplótipo **TCI/CCI** formado pelos polimorfismos -590 (T/C), +33(T/C) e VNTR (I/D), no gene *IL4* está 5 vezes mais suscetível à DP (*Odds Ratio*_{ajustado} = 5,3; 95% Intervalo Confiança = 2,2 - 12,9)⁵.

2.5 Tratamento Periodontal não-cirúrgico

A terapia periodontal não-cirúrgica tem como objetivos diminuir o grau de inflamação, diminuição da profundidade de sondagem, ganho de inserção, bem como a manutenção da saúde periodontal e dos níveis de inserção ao longo do tempo. Em outras palavras, o tratamento periodontal não-cirúrgico é importante para cessar a progressão da DP⁹. Vários estudos demonstram que esses objetivos são alcançados quando o tratamento periodontal é eficaz em reduzir espécies bacterianas e em permitir a recolonização dos sítios tratados por bactérias compatíveis com o estado de saúde periodontal ^{26, 35, 119}. 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 ^{28, 52}.

A RAR é responsável pela remoção dos depósitos moles (placa dental) e duros (cálculo dental) da superfície dos dentes, assim com a remoção da microbiota, toxinas bacterianas, cálculo, cemento e dentina que estejam contaminados. Assim, com a RAR se obtêm uma superfície radicular biologicamente aceitável e compatível com nova inserção⁴⁵. Os procedimentos clínicos não-cirúrgicos levam a uma melhora nos parâmetros clínicos que denotam inflamação, como a redução da profundidade de sondagem clínica e a diminuição da perda de inserção, especialmente em sítios mais profundos ^{59, 82, 89, 93}. O sucesso em longo prazo do tratamento periodontal não-cirúrgico depende de um rigoroso programa de manutenção projetado para controlar o crescimento de patógenos periodontais ⁸.

2.6 Investigação da Característica Multifatorial da Doença Periodontal

Conforme o exposto nos itens anteriores desta revisão de literatura, a DP tem sido considerada como uma patologia de carácter multifatorial⁶⁹, e além de fatores microbiológicos e imunológicos, estão envolvidos fatores como o fumo⁵⁶, *stress* psicossocial^{67, 96} e doenças sistêmicas como diabetes¹¹⁵.

Na literatura poucos são os estudos que investigaram mais de um fator etiológico da DP simultaneamente no mesmo grupo amostral, por exemplo, polimorfismo genético e produção de citocina^{49, 79, 108}, ou análise da microbiota subgengival e de polimorfismos genéticos^{36, 121, 122, 130}.

Contudo, a literatura científica parece indicar uma tendência para esse tipo de investigação. Michel et al.⁷⁹ observaram que 27,8% (n = 5) dos pacientes alemães com periodontite agressiva possuíam para o gene *IL4* o genótipo composto -590T/ 70pb (Del) (denominados pelos autores: PP+/ IP+) e que a concentração de IL-4 estava abaixo dos níveis de detecção, quando comparados aos 21 pacientes controle, onde nenhum deles apresentou tal genótipo. Pirhan et al.⁹⁰ 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.

Gonzales et al.⁴⁹ investigaram se o genótipo -590 (T/T) e + 33 (T/T) no gene *IL4* estaria influenciando a produção de Interleucina 13 em pacientes com periodontite agressiva. Os autores concluíram que há um aumento na produção de IL-13 por células T de pacientes com periodontite agressiva com genótipo IL-4.

Ferreira et al.³⁶ 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. Foi concluído que o polimorfismo estudado e os periodontopatógenos do complexo vermelho estavam 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.

Associação entre o polimorfismo genético na posição -308G/A no gene *TNFA* com periodontopatógenos do complexo vermelho e níveis de RNAm de TNF- α foi investigada em fragmentos de tecido gengival em indivíduos com e sem DP¹²². Concluiu-se que o polimorfismo estudado e os periodontopatógenos do complexo vermelho foram independentemente associados ao aumento nos níveis de TNF- α 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 TCI/CCI formado pelos polimorfismos -590(T/C), +33(T/C) e VNTR (I/D) no gene *IL4*, surgiu a hipótese da possível influência do referido haplótipo

nos níveis da citocina IL-4 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.

Pretende-se com esse estudo, contribuir para uma melhor compreensão da possível inter-relação de diferentes fatores na etiopatogenia da DP.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

- 1- Comparar indivíduos geneticamente suscetíveis à DP e geneticamente protegidos contra o desenvolvimento da DP, considerando os polimorfismos -590 (T/G), +33(C/T) e VNTR (I/D) no gene *IL4* quanto às características clínicas periodontais e os níveis da citocina IL-4 no FS.
- 2- Avaliar a influência do caráter genético individual (suscetibilidade ou proteção) sobre a resposta ao 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 15 indivíduos dentre os 115 pré-classificados geneticamente para este estudo. Considerando a diferença a ser detectada de 0,8 mm na sondagem periodontal, os cálculos mostraram que a um valor de $\alpha = 0,1\%$ e poder de 95%, o tamanho da casuística necessária para comprovar associação clínica e imunológica com a DP, seria de 7 indivíduos em cada subgrupo (pacientes Com Periodontite e Sem Periodontite) dentro de cada grupo (Com Suscetibilidade Genética para desenvolver DP e Protegidos Geneticamente ao desenvolvimento da DP) totalizando 28 indivíduos (Anexo 1). Portanto, a casuística total investigada neste estudo deveria ser maior ou igual a 28 indivíduos para detectar associação com um nível aceitável de confiança.

4.2 Seleção da amostra

Um estudo prévio realizado pelo presente grupo de pesquisa⁴ que incluiu 250 indivíduos (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr – Protocolo n° 57/04 [Anexo 2]), investigou se os polimorfismos -590(T/C), +33(T/C) e VNTR(I/D) no gene *IL4* teriam relação com a suscetibilidade genética do indivíduo à periodontite crônica. Foi verificado que:

- (A) Pacientes que apresentam o haplótipo **TCI/CCI** têm 5 vezes mais suscetibilidade à DP (n=51 grupo com DP; e n=16 grupo Controle), *Odds Ratio*_{ajustado}= 5,3 (95% Intervalo Confiança = 2,2 - 12,9);
- (B) Pacientes que apresentam o haplótipo **TTD/CTI** têm significativa probabilidade de não desenvolver DP; em outras palavras esse haplótipo confere proteção contra a DP, *Odds Ratio*_{ajustado}= 0,18 (95% Intervalo Confiança = 0,04 - 0,88). Total: n=17 grupo com DP; e n=31 grupo Controle.

Mediante tais resultados, surgiu o questionamento que talvez a maior suscetibilidade genética à periodontite crônica associados aos haplótipos do gene da *IL4* seriam acompanhadas por diferenças nos níveis da citocina IL-4 e nos índices clínicos periodontais antes e após tratamento periodontal básico.

Os pacientes incluídos nos grupos 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 3) 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 4). Assim, para o presente estudo, realizou-se para todos os participantes uma nova anamnese com a finalidade de avaliar o histórico médico e odontológico, seguida de novo exame clínico periodontal (Anexo 5).

Dentre os 115 indivíduos pré-classificados geneticamente (mencionados nos citados grupos) os seguintes critérios de inclusão foram respeitados quando da seleção dos participantes para este novo 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 considerados como critérios de exclusão:

- Presença de condição sistêmica com reconhecida interferência no processo saúde/doença periodontal (ex: Diabetes mellitus);
- 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 três meses antecedentes ao estudo ou durante o mesmo;
- Pacientes gestantes ou lactantes;
- Pacientes que fizessem o uso de anticoncepcional;
- Pacientes fumantes e ex-fumantes por um período inferior à 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 calibração do examinador (G.A.), 180 sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios/paciente 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 (G.A), calibrado (Kappa ponderado = 0,82) e cego para os diferentes grupos avaliou 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.

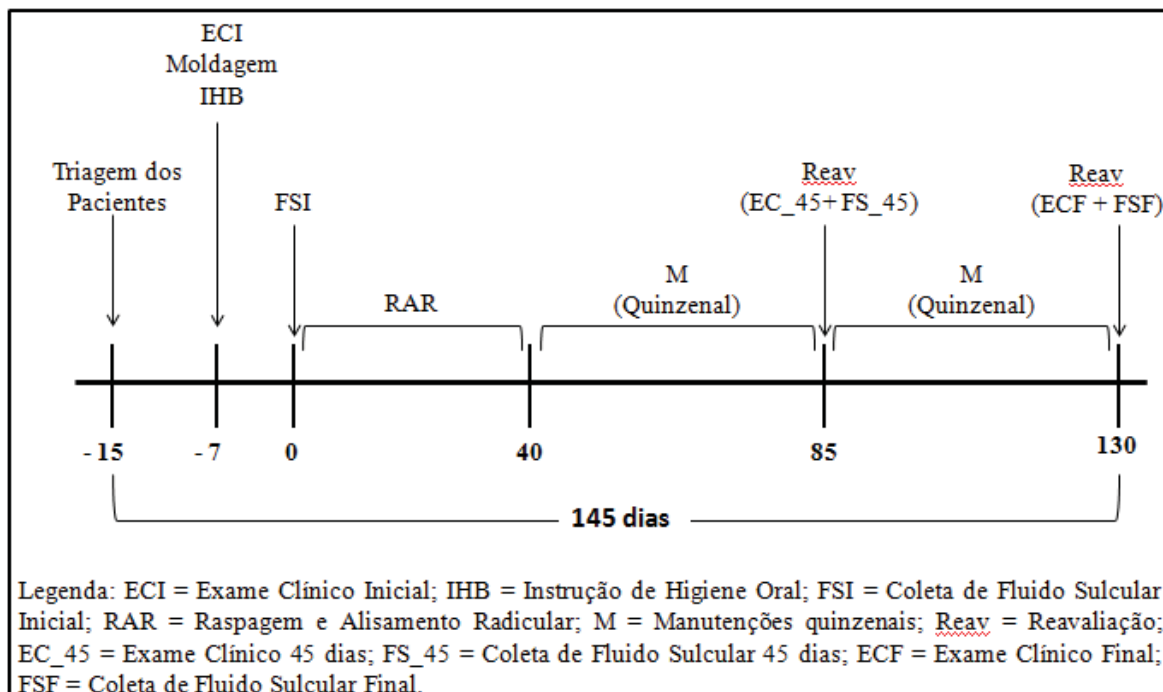


FIGURA 1 - Cronograma da metodologia aplicada, em dias.

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 em seguida, para os indivíduos com DP foi iniciado o tratamento periodontal não-cirúrgico. Após a realização do tratamento, foram realizadas sessões de manutenção quinzenais, nas quais todos os indivíduos dos diferentes grupos receberam profilaxia (com pasta profilática e taça de borracha) e reforço de instrução de higiene bucal.

Após três sessões de manutenção, totalizando 45 dias do término do tratamento, foi realizada a reavaliação dos índices clínicos periodontais (exame clínico 45 dias após RAR – EC_45) e nova coleta de FS (coleta do fluido sulcular 45 dias após RAR – FS_45). Consultas de manutenção foram

mantidas quinzenalmente até completar 90 dias do término do tratamento. Nesse período 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, 145 dias.

4.4.2 Análise Clínica Periodontal

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

- Índice de Placa Visível – IPV – (presente ou ausente)³
- Índice de Sangramento Marginal – ISM – (presente ou ausente)⁸¹
- Profundidade de Sondagem – PS – (distância do fundo do sulco/bolsa até a margem gengival)⁸¹
- Sangramento à Sondagem – SS – (presença ou ausência de sangramento observado, por um intervalo de 30 segundos, após a primeira inserção da sonda na bolsa periodontal)
- Nível de Inserção Clínica – NIC – (distância do fundo do sulco até a junção amelocementária)⁸¹

As análises foram realizadas em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) em todos os dentes, excluindo-se os terceiros molares.

Os indivíduos selecionados foram subdivididos em quatro grupos, de acordo com a presença ou ausência tanto de suscetibilidade genética em relação ao gene *IL-4* quanto de DP:

- Suscetível Geneticamente com DP (ScDP)
- Suscetível Geneticamente sem DP (SsDP)
- Protegido Geneticamente contra periodontite, apresentando DP (PcDP)
- Protegido Geneticamente contra a periodontite, sem apresentar DP (PsDP)

Para que os indivíduos fossem considerados como portadores de DP (periodontite crônica) esses deveriam apresentar os seguintes parâmetros clínicos periodontais: presença de pelo menos 2 dentes não adjacentes com 1 ou mais sítios com PS \geq 5mm, NIC \geq 3mm e sangramento à sondagem em dentes não adjacentes⁷. Os indivíduos incluídos nos grupos sem DP deveriam apresentar os seguintes parâmetros clínicos: presença de PS \leq 3mm com ausência de perda clínica de inserção e sangramento à sondagem .

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 prolipileno de

1,0mm de espessura, prensadas em aparelho a vácuo (Bio-Art® Equipamentos Odontológicos, São Paulo – SP – Brasil) (Figura 2). O uso desses guias teve como finalidade padronizar o posicionamento da sonda periodontal durante a realização do exame de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim como facilitar a padronização da inserção da tira de papel absorvente para coleta do fluido sulcular gengival (Figura 3). Para tanto, nesses guias, o local indicado como ponto (sítio) escolhido de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção e de coleta do fluido sulcular gengival 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- Placa Guia



FIGURA 3- Placa Guia e sonda

4.4.2.1 Confirmação da atividade da doença

Para confirmar a atividade da doença nos pacientes classificados como afetados pela periodontite crônica foi realizada a quantificação da MMP-8. Tem sido demonstrado que a MMP-8 é a collagenase predominante nos tecidos periodontais doentes, fluido sulcular e saliva de pacientes com periodontite

crônica^{112, 113, 124}. Estudos demonstraram também que há um aumento dos níveis de MMP-8 no fluido sulcular associado à severidade da periodontite crônica e que após a finalização do tratamento periodontal ocorre diminuição desses níveis^{21, 66, 124}.

4.4.3 Coleta de Fluido Sulcular

Um examinador cego, quanto ao grupo a que o paciente pertencia, coletou as amostras de fluido sulcular (FS) para análise imunológica. As coletas de fluido sulcular de cada paciente foram realizadas pelo mesmo pesquisador em três diferentes períodos: inicialmente (*baseline*), 45 e 90 dias após o término do tratamento periodontal não-cirúrgico. Foram coletadas amostras de fluido gengival para análise imunológica, uma semana após os exames clínicos, para evitar interferências devido à sondagem. Os sítios periodontais selecionados para a coleta do fluido gengival 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 gengival, 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®) (Figura 4). A tira de papel foi introduzida no sulco gengival e permaneceu durante 30 segundos. As tiras de papel que se mostraram visualmente contaminadas com saliva e/ou sangue foram descartadas. O volume de fluido gengival 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 (μL) com o auxílio de um programa específico para esse fim (Periotron Professional - Oraflow Inc.). As tiras foram armazenadas individualmente dentro de microtubos estéreis e secos ⁴⁷, mantidos em gelo até o transporte da clínica ao laboratório, onde eram congelados a -80°C para posterior análise.



FIGURA 4- Coleta de fluido com Periopaper®

4.4.4 Tratamento Periodontal

Todo o tratamento periodontal não-cirúrgico, bem como a profilaxia, motivação e orientação de higiene bucal foram realizado por um único profissional especialista em Periodontia. Desse modo, buscou-se atingir um acabamento uniforme e a padronização da qualidade do tratamento periodontal não-cirúrgico.

Os pacientes que demandaram tratamento periodontal foram submetidos aos procedimentos de raspagem supra e subgengival 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. Os pacientes também foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal correta por meio de ensino da técnica de escovação 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 orientação de higiene bucal de forma individualizada para motivação, 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 orientação de higiene bucal e o controle de biofilme supragengival foram realizados nas consultas de retorno agendadas a cada 15 dias, até totalizar 45 e 90 dias. Após esses períodos novos exames clínicos periodontais e coletas de fluido sulcular foram realizados em cada paciente.

4.5 Delineamento Laboratorial do estudo

4.5.1 Análise Imunológica

4.5.1.1 Construção da curva padrão para o Periotron

Para a construção da curva padrão foram utilizados volumes de fluidos pré-definidos (valores de referência), pipetada água destilada no volume pré-definido e mensurada no Periotron. Isso foi realizado duas vezes para cada volume e foi utilizada a média do valor obtido no Periotron (Tabela 1) para construção da curva padrão. Esse protocolo é considerado fundamental devido às variações de diferentes regiões e climáticas que podem interferir na mensuração do fluido pelo aparelho. Esta curva deve ser construída para que o volume de fluido sulcular coletado e mensurado por meio de aparelho mencionado (Periotron 8000 - Oraflow Inc.) seja transformado em unidade de volume (μL) com o auxílio do programa específico para esse fim, também já mencionado (Periotron Professional - Oraflow Inc.) que insere os valores obtidos do periotron nessa curva padrão (Figura 5).

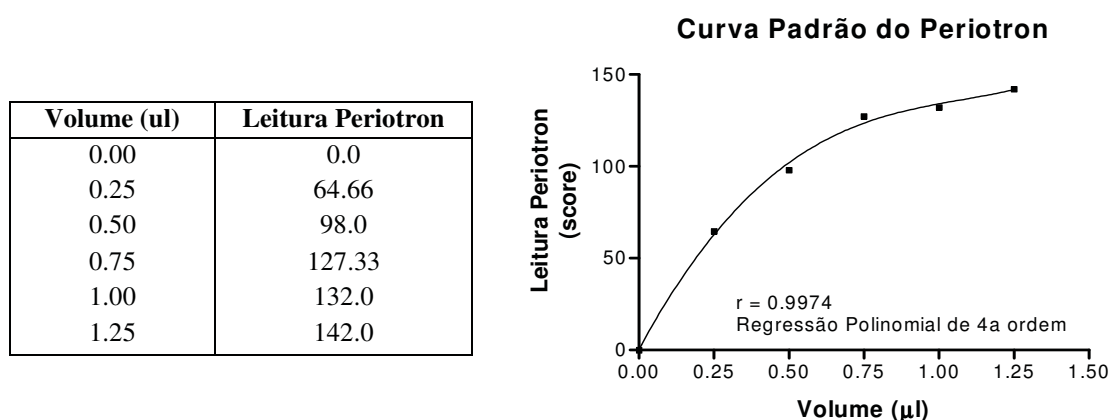


FIGURA 5 - Valores de referência para construção da curva padrão e curva padrão utilizada nesse estudo.

4.5.1.2 Preparo das Amostras e teste ELISA para quantificação da IL-4

As amostras de fluido sulcular presentes nas tiras de papel foram retiradas do freezer a -80°C e adicionou-se em cada uma destas 250 μl de solução tampão de extração (contendo PBS – phosphate *buffered saline*, pH 7, 2 e 0,1% de *Tween 20*)⁴¹, sendo deixadas em gelo, no agitador horizontal por 30 minutos. A seguir, foram colocadas em centrífuga refrigerada a 4°C , 13.000 g por 10 minutos⁷³.

Um kit enzimático ultra-sensível para imunoensaio específico (R&D Systems – Quantikine HS - Minneapolis, MN, USA) foi utilizado para medir a quantidade de IL-4 presente nas amostras de fluido sulcular de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as placas são revestidas por um anticorpo monoclonal. Após a preparação de todos os reagentes, de acordo com as instruções do fabricante, aplicou-se na placa 50 μl do diluente de ensaio. Para a obtenção da curva padrão de IL-4 foram feitas concentrações seriadas partindo de 16 pg/mL até 0, 25 pg/mL ou 200 μl de cada diluição foi aplicada na placa, sendo que aplicou-se também 200 μl das amostras. As placas foram incubadas por três horas, em temperatura ambiente e então lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem do kit (PBS + 0,05% Tween 20). O anticorpo de detecção (um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina) foi adicionado, seguido de nova incubação à temperatura ambiente por duas horas. Novamente a placa foi lavada por 4 vezes, adicionou-se em cada poço da placa 50 μl da solução de substrato e a placa foi incubada por 1 hora. Após esse período, a solução amplificadora foi adicionada na quantidade de 50 μl para cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos. A reação foi

finalizada, com a adição de 50 μ l da solução de parada (ácido sulfúrico a 2%) à solução substrato presente em cada poço. Para a determinação da densidade óptica para a citocina IL-4 deste ensaio, a absorbância foi determinada a 490 nm em um espectrofotômetro (μ Quant, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). A absorbância obtida por amostra foi convertida na concentração de IL-4, baseado na curva padrão. Os resultados finais foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml) de concentração de IL-4 presente no fluido sulcular. Posteriormente, a concentração foi ajustada somando o volume do fluido sulcular mais o volume da diluição da amostra, e esse valor foi multiplicado pelo volume obtido na placa de ELISA assim a concentração de IL-4 por amostra foi expressa em pg/ μ l.

4.5.1.3 Preparo das Amostras e Teste ELISA para quantificação da MMP-8

Um kit enzimático para imunoenensaio específico (R&D Systems - Minneapolis, MN, USA) foi utilizado para medir a quantidade de MMP-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 e bloqueadas com soro de albumina bovina (1% BSA diluído em PBS) por uma hora, em temperatura ambiente. Após três lavagens, a curva padrão (MMP-8 em concentrações seriadas partindo de 4.000 pg/ml) e as amostras foram adicionadas nos respectivos poços das placas (todos com volume final de 100 µl) e as placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente, e então lavadas. O anticorpo de detecção, um anticorpo conjugado à biotina, foi adicionado, seguido de nova incubação à temperatura ambiente por duas horas. Após lavagem, um conjugado de estreptoavidina e peroxidase foi adicionado às placas para incubação. As placas foram novamente lavadas e uma solução substrato foi adicionada em 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 MMP-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 MMP-8 por amostra, de acordo com a curva padrão. Os resultados finais foram expressos

em nanogramas por mililitro (ng/ml) de concentração de MMP-8 presente no fluido sulcular.

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*, 45 e 90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico) para todos os grupos (ScDP, SsDP, PcDP e PsDP).

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-paramétricos) 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 mostraram paramétricos foi realizado o Teste de t-Student, e para os dados não-paramétricos foi realizado o Teste de Friedman.

Para verificar a correlação entre os parâmetros clínicos e imunológicos (dados de IL-4), 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

Participaram deste estudo 62 indivíduos divididos em 4 grupos conforme descrição na Figura 6. A amostra foi composta por 43 indivíduos (70,5%) do gênero feminino e 19 (29,5%) do masculino, com idade média de 43,68 anos, de acordo com todos os critérios de inclusão e exclusão do estudo.

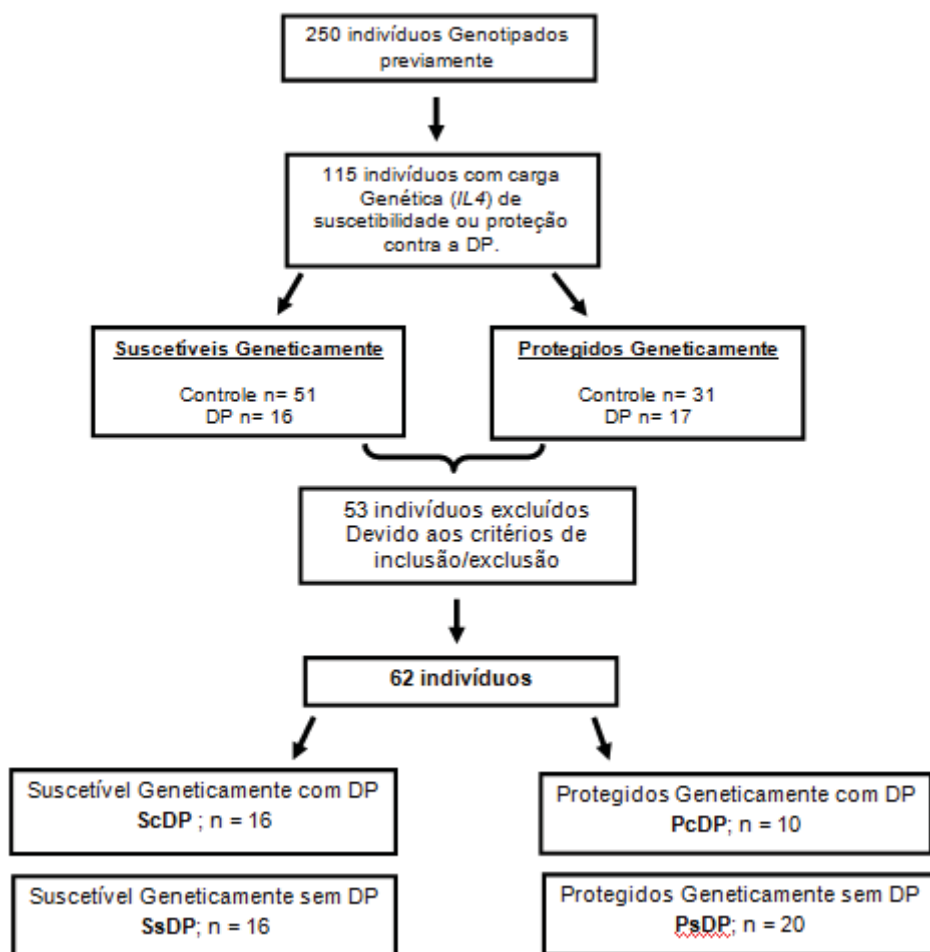


FIGURA 6- Fluxograma do estudo

O número de pacientes investigados em cada grupo também está apresentado na Tabela 1. O menor número de pacientes está presente no grupo PcDP (n=10). No entanto, como o cálculo amostral realizado considerando o valor de $\alpha = 0,05$ e poder estatístico de 95%, revelou que o número mínimo seria de 7 de pacientes em cada grupo, esse aparente limitado número de pacientes é suficiente para demonstrar diferenças estatísticas com aceitável confiança.

Pelo teste estatístico Qui-quadrado, não foi encontrada diferença significativa em relação à variável gênero entre os grupos investigados ($p = 0,66$), assim como também não foi significativa a diferença obtida da variável idade ($p = 0,57$) 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	Suscetível		Protegidos		Total
	ScDP n=16	SsDP n=16	PcDP n=10	PsDP n=20	
Média de Idade (anos) (\pm Desvio Padrão)	47.94 (± 10.46)	35.75 (± 15.56)	48.30 (± 13.43)	42.75 (± 9.57)	43.68 (± 12.90)
Gênero	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Feminino	14 (32.6)	9 (20.9)	8 (18.6)	12 (27.9)	43 (70.5)
Masculino	2 (11.1)	7 (36.8)	2 (11.1)	8 (44.4)	19 (29.5)
Nº de Dentes (\pm Desvio Padrão)	23.38 (± 3.54)	26.63 (± 1.26)	22.80 (± 4.21)	25.80 (± 2.89)	24.65 (± 3.33)

n = número de indivíduos; % = porcentagem da quantidade de indivíduos.

5.2 Análise clínica - Boca Toda

Todos os indivíduos completaram o período experimental do estudo e não houve desistências. Nesse período também não foram verificadas situações de abscessos e infecções durante ou após o tratamento periodontal não-cirúrgico em nenhum dos pacientes que aceitaram participar do estudo.

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 o grupo ScDP (77,9%) apresentou uma maior porcentagem de sítios com placa bacteriana comparado ao grupo PcDP (59,0%), apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,013$) (Tabela 2).

O grupo ScDP (77,9%) também apresentou maior porcentagem de IPV em relação ao grupo SsDP (16,9%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00011$). Ainda no *baseline* verificou-se uma diferença significativa entre os grupos PcDP e PsDP ($p=0,00075$). Esses resultados não causam surpresa, uma vez que a maior porcentagem de IPV já era esperada nos grupos com DP.

Após 45 dias do término do tratamento periodontal não-cirúrgico as diferenças significativas se mantiveram apenas entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,00032$). Após 90 dias, não houve diferenças significantes entre os

grupos. Na comparação entre os três períodos todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem ($p < 0,0001$), indicando desse modo, uma melhora na escovação dental e remoção mais eficiente do biofilme bacteriano pelo indivíduo (Tabela 2). Os níveis de significância foram corrigidos pelo teste de Bonferroni ($p = 0,0167$).

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

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre períodos**
IPV (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	77,9(36,45- 94,4) ^{a+}	21,3 (10,5 - 46,0) ^b	7,94 (3,0- 9,0) ^c	< 0.0001
SsDP	16,9 (10,0 - 79,9) ^{a¶}	10 (6,0 - 49,0) ^b	7,0 (2,6 - 18,5) ^c	< 0.0001
PcDP	59,0 (13,8 - 88,9) ^{a+}	21,0 (5,5 - 36,5) ^b	8,0 (3,0 - 10,0) ^c	< 0.0001
PsDP	16,0 (4,0 - 42) ^{a#}	7,0 (1,0- 10,2) ^{b#}	4,0 (0 - 18,0) ^c	< 0.0001
Diferença entre grupos*	0,00011 [¶] 0,00075 [#] 0,013 ⁺	<0,00032 [#]	NS	

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

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

(+) Diferença significativa quando comparado o grupo ScDP com o grupo PcDP no mesmo período.

NS: não significativo

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

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

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

Avaliando o Índice de Sangramento Marginal (ISM) no *baseline* foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ScDP e PcDP ($p = 0,005$), bem como entre SsDP e PsDP ($p = 0,00008$) (Tabela 3). No mesmo período foi observado que o grupo ScDP (32 %) apresentou uma maior porcentagem de sítios com sangramento gengival em relação ao grupo SsDP (7,0 %), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0004$) e também que o grupo PcDP (21,5%) apresentou uma maior porcentagem que o grupo PsDP (7,4%) ($p = 0,002$). Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ScDP e PcDP ($p = 0,0005$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,0024$). Em 90 dias não houve diferença entre os grupos.

Na comparação entre períodos, todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem ($p \leq 0,0001$), indicando assim, uma melhora na inflamação gengival com a concomitante remoção do biofilme bacteriano, como demonstrado na Tabela 3.

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

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre períodos**
ISM (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	32 (6,0 - 57,0) ^{a+}	12 (2,0- 23,2) ^b	5,7 (2,0 - 20,3) ^c	< 0.0001
SsDP	7 (1,8 - 27,7) ^{a¶}	5,9 (1,0 - 24,1) ^{b¶}	4,0 (1,0 - 13,8) ^c	0.0001
PcDP	21,5 (11,0 - 43,0) ^a	10,5 (4,0 - 38,0) ^b	4,0 (3,0 - 7,0) ^c	0.0001
PsDP	7,4 (8,9 - 22,7) ^{a#}	4,2 (1,0 - 10,2) ^{b#}	3,0 (0 - 10,2) ^c	0.0001
Diferença entre grupos*	0,0004 [¶] 0,002 [#] 0,005 ⁺ 0,00008 [¶]	0,0005 [¶] 0,0024 [#]	NS	

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

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

(+) Diferença significativa quando comparado o grupo ScDP com o grupo PcDP no mesmo período.

(*) Diferença significativa quando comparado o grupo SsDP com o grupo PsDP no mesmo período

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

NS- não significativo

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

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

Na avaliação do Sangramento à Sondagem (SS) foi verificado no *baseline* que o grupo ScDP (26,9%) apresentava maior porcentagem de sítios com sangramento à sondagem em relação ao grupo PcDP (16,0%) apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 0,015$) (Tabela 4). No mesmo período foram observadas diferenças significantes entre os grupos doentes e saudáveis com a mesma carga genética, os grupos ScDP (26,9%) e SsDP (1,61%) ($p = 0,00003$); e os grupos PcDP (16,0%) e PsDP (0,59%) ($p = 0,00013$) (Tabela 4). Em 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ScDP (6,8%) e SsDP (0,3%) ($p = 0,00008$); e os grupos PcDP (4,0%) e PsDP (0,5%) ($p = 0,0027$). Ao final de 90 dias, essas diferenças se

mantiveram nos mesmos grupos observados em 45 dias ScDP (3,6%) e SsDP (0,003%) ($p = 0,0016$); e os grupos PcDP (2,5%) e PsDP (0,002%) ($p = 0,00065$) (Tabela 4).

Na comparação entre períodos, todos os grupos avaliados apresentaram uma diminuição significativa dessa porcentagem, como pode ser visto na Tabela 4; 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 de sangramento marginal. (Tabela 3).

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

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre
SS (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	períodos**
ScDP	26,9(11,3 –70,1) ^{a+}	6,8 (2,9 - 18,7) ^b	3,6 (0,6 - 10,5) ^c	<0,0001
SsDP	0,61(0 - 14,8) ^{a¶}	0,3 (0 - 6,0) ^{b¶}	0,003 (0 - 3,0) ^{c¶}	0,007
PcDP	16,0 (7,5 - 54,8) ^{a+}	4,0 (2,4 - 8,0) ^b	2,5 (0,1 - 5,0) ^c	0,001
PsDP	0,59 (0 - 13,0) ^{a#}	0,5 (0 – 3,7) ^{b#}	0,002 (0 - 1,2) ^{c#}	<0,0001
Diferença entre grupos*	0,00003 [¶] 0,00013 [#] 0,015 ⁺	0,00008 [¶] 0,0027 [#]	0,0016 [¶] 0,00065 [#]	

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

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

(+) Diferença significativa quando comparado o grupo ScDP com o grupo PcDP no mesmo período.

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

NS- não significativo

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

(**) Teste de Friedman 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 PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo ScDP (2,4 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo SsDP (1,6 mm), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00005$). De modo semelhante, neste mesmo período, o grupo PcDP (2,3 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo PsDP (1,5 mm), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000001$). Em 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da PS entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,004$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,0003$), como havia sido verificado no *baseline* (Tabela 5). Ao final de 90 dias, essas diferenças se mantiveram nesses grupos ScDP e SsDP ($p = 0,002$) e entre PcDP e PsDP ($p = 0,004$).

Na comparação entre períodos, os grupos ScDP e PcDP 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 PcDP serem portadores de DP e terem recebido tratamento periodontal não-cirúrgico, e os indivíduos dos outros dois grupos (SsDP e PsDP) serem considerados controles do estudo (em relação à DP) e apenas terem recebido instruções de higiene e profilaxia oral.

Tabela 5 – Distribuição da Profundidade de Sondagem (mm) entre os grupos nos diferentes períodos: mediana das medidas (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre períodos**
IPS (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	2,4 (2,0 - 3,9) ^a	1,9 (1,2 - 3,8) ^b	1,8 (1,3 - 3,7) ^c	< 0.0001
SsDP	1,6 (1,1 - 2,1) ^{a¶}	1,5 (1,2 - 1,9) ^{b¶}	1,2 (1,0 - 1,9) ^{c¶}	NS
PcDP	2,3 (2,1 - 3,7) ^a	1,6 (1,5 - 2,3) ^b	1,3 (1,2 - 1,5) ^c	0.0001
PsDP	1,5 (1,1 - 1,9) ^{a#}	1,2 (1,0 - 1,6) ^{b#}	1,1 (1,0 - 1,3) ^{c#}	NS
Diferença entre grupos*	0,00005 [¶] 0,000001 [#]	0,004 [¶] 0,0003 [#]	0,002 [¶] 0,004 [#]	

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

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

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

NS- não significativo

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

(**) Teste de Friedman 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 PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Após 45 dias e 90 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do percentual de sítios com PS \geq 4mm entre os grupos ScDP e PcDP, como reportado da mesma forma para o período *baseline* (Tabela 6).

Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram uma diminuição significativa no percentual de sítios com PS \geq 4mm (ScDP, $p < 0,0001$; PcDP, $p = 0,0001$). Isso indica que os indivíduos nos grupos ScDP e PcDP responderam de maneira similar ao tratamento periodontal não-cirúrgico recebido.

Tabela 6 – Distribuição da Profundidade de Sondagem > 4 mm (%) entre os grupos e nos diferentes períodos: mediana das medidas (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre
IPV (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	períodos**
ScDP	13,1 (6- 75) ^a	2,3 (1,0-15,3) ^b	0,8 (0- 12,2) ^c	< 0.0001
PcDP	8,5 (1,9 -19,4) ^a	1,3 (1,0 - 9,0) ^b	0,6 (0- 2,0) ^c	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 Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos.

Na avaliação da mediana do Nível de Inserção Clínica (NIC), em milímetros (Tabela 7), foi verificado que os grupos ScDP e PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos 3 períodos de avaliação. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram uma diminuição significativa no NIC (ScDP, $p = 0,008$; PcDP, $p = 0,001$), descrevendo, juntamente com a redução da PS, uma recuperação dos tecidos periodontais doentes que receberam o tratamento periodontal não-cirúrgico, independentemente da carga genética do paciente.

Tabela 7 – Distribuição do Nível de Inserção Clínico (mm) mediana das medidas (min-max) entre os grupos e nos diferentes períodos:

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre
NIC (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	períodos**
ScDP	2,7 (2,1- 4,2) ^a	2,2 (1,5- 3,8) ^b	1,8 (1,3- 3,7) ^c	0,008
PcDP	2,8 (2,1- 5,2) ^a	2,2 (1,5- 2,8) ^b	1,6 (1,3- 3,1) ^c	0,001
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 Friedman 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 90 dias do final do 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 PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios com PS \geq 4 mm. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios com PS \geq 4 mm que reduziram \geq 2 mm após o tratamento periodontal (ScDP, $p = 0,002$; PcDP, $p = 0,013$).

Ao final de 90 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do número de sítios que reduziram \geq 2mm entre os grupos ScDP e PcDP, 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 com PS \geq 4mm no baseline que após tratamento reduziram \geq 2mm: mediana (min-max)

Grupos	Baseline n sítios	90 dias n sítios	% sítios que Reduziram	Diferença entre períodos**
ScDP	8,5 (3- 42) ^a	6,5 (1- 22) ^b	78 (0-100)	0,002
PcDP	12,5 (3- 22) ^a	8,5 (3- 17) ^b	75 (0-100)	0,013
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 PcDP responderam ao tratamento periodontal realizado, foi analisado o número de sítios periodontais que no *baseline* apresentava NIC \geq 4 mm e que ganharam \geq 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 PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios com NIC \geq 4mm. Na comparação entre períodos, estes mesmos grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa no número de sítios que

ganharam ≥ 2 mm após o tratamento periodontal (ScDP, $p = 0,001$; PcDP, $p = 0,009$).

Ao final de 90 dias, não houve diferença estatisticamente significativa do número de sítios que ganharam ≥ 2 mm entre os grupos ScDP e PcDP, 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 protegidos geneticamente à DP.

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

Grupos	Baseline n sítios (PS ≥ 4 mm)	90 dias n sítios (redução ≥ 2 mm)	% sítios que Reduziram	Diferença entre períodos**
ScDP	8,5 (5- 21) ^a	4,5 (1- 13) ^b	25 (0- 78) ^c	0,001
NScDP	10,5 (3- 18) ^a	7,0 (2- 13) ^b	28,8 (0 - 88,4) ^c	0,009
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 124 sítios periodontais, sendo 105 (84,7%) sítios provenientes de dentes monorradiculares, 19 (15,3%) de dentes com duas ou mais raízes. Desses sítios, 107 (86,3%) originaram de sítios interproximais e 17 (13,6 %) de sítios vestibulares ou linguais. Em cada grupo de indivíduos avaliados, os sítios periodontais foram distribuídos da seguinte forma: ScDP (n=32), PcDP (n=20), SsDP (n=32) e PsDP (n=40).

Na avaliação do IPV, ISM e SS mensurados nos sítios periodontais selecionados (Tabela 10), observou-se que no *baseline*, os grupos ScDP e PcDP apresentaram maior presença de biofilme bacteriano (dada pelo IPV) e sangramento à sondagem (SS) em relação aos grupos SsDP e PsDP. 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=124)	IPV			ISM			SS		
	Baseline	45 dias	90 dias	Baseline	45 dias	90 dias	Baseline	45 dias	90 dias
ScDP (n=32)									
Presente	31(96,8%)	21(65,6%)	5 (15,6%)	30(93,7%)	11(34,4%)	4(12,5%)	32(100%)	12(37,5%)	3(9,3%)
Ausente	1 (3,2%)	11(34,4%)	27(84,4%)	2 (6,3%)	21(65,6%)	28 (87,5%)	0 (0%)	20(62,5%)	29 (90,7%)
PcDP (n=20)									
Presente	18 (90%)	9 (45%)	4 (20%)	13 (65%)	5 (25%)	2 (10%)	20(100%)	7 (35%)	2 (10%)
Ausente	2 (10%)	11 (55%)	16 (80%)	7 (35%)	15 (75%)	18 (90%)	0 (0%)	13 (65%)	18 (90%)
SsDP (n=32)									
Presente	12(37,5%)	2 (6,2%)	1 (3,1%)	13(40,6%)	4 (12,5%)	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ausente	20(62,5%)	30(93,8%)	31(96,9%)	19(60,4%)	28(87,5%)	31(97,5%)	32(100%)	32 (100%)	32(100%)
PsDP (n=40)									
Presente	9 (22,5%)	2 (5%)	1 (2,5%)	9 (22,5%)	2 (5%)	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Ausente	31(77,5%)	38 (95%)	39(97,5%)	31(77,5%)	38 (95%)	39 (97,5%)	40(100%)	40 (100%)	40(100%)

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 PcDP 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 ($p < 0,0001$). De modo semelhante, neste mesmo período, o grupo PcDP (5,0 mm) apresentou maior PS em relação ao grupo PsDP (1,0 mm), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$). Em 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da PS entre os grupos ScDP e SsDP ($p < 0,0001$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p < 0,0001$) (Tabela 11). Ao final de 90 dias essas diferenças se mantiveram de forma semelhante aos períodos anteriores, ScDP e SsDP ($p = 0,0001$), bem como PcDP e PsDP ($p < 0,0001$).

Na comparação entre períodos, os grupos ScDP e PcDP 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 PcDP serem portadores de DP e terem recebido tratamento periodontal não-cirúrgico, e os indivíduos dos outros dois grupos (SsDP e PsDP) serem considerados controles do estudo (em relação à DP) e apenas terem recebido instruções de higiene e profilaxia oral.

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

Grupos IPS (%)	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre períodos**
	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	
ScDP	5,0 (4,0 - 6,0) ^a	3,0 (2,0 - 5,0) ^b	3,0 (2,0 - 3,0) ^c	< 0.0001
SsDP	2,0 (1,0 - 2,0) [¶]	1,0 (1,0 - 2,0) [¶]	1,0 (1,0 - 2,0) [¶]	NS
PcDP	5,0 (4,0 - 7,0) ^a	3,0 (2,0 - 5,0) ^b	2,0 (2,0 - 3,0) ^c	< 0.0001
PsDP	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	NS
Diferença entre grupos*	< 0,0001 [¶] 0,0001 [#]	< 0,0001 [¶] < 0,0001 [#]	0,0001 [¶] <0,0001 [#]	

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

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo PcDP 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 Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos.

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

Ao final de 90 dias, houve diferença estatisticamente significativa do NIC entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,00001$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,00003$), como havia sido verificado de forma semelhante no *baseline* e em 45 dias (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição do Nível de Inserção Clínico (mm) dos sítios seleccionados entre os grupos nos diferentes períodos: mediana (min-max)

Grupos	Baseline	45 dias	90 dias	Diferença entre
IPS (%)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	períodos**
ScDP	5,0 (4,0 - 6,0) ^a	3,0 (2,0 - 5,0) ^b	3,0 (2,0 - 4,0) ^c	< 0.0001
SsDP	1,0 (1,0 - 2,0) [¶]	1,0 (1,0 - 2,0) [¶]	1,0 (1,0 - 2,0) [¶]	NS
PcDP	5,0 (4,0 - 5,0) ^a	2,0 (2,0 - 3,0) ^b	2,0 (2,0 - 2,0) ^c	< 0.0001
PsDP	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	1,0 (1,0 - 2,0) [#]	NS
Diferença entre grupos*	< 0,0001 [¶]	< 0,0001 [¶]	0,00001 [¶]	
	< 0,0001 [#]	< 0,0001 [#]	0,00003 [#]	

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

(#) Diferenças significantes quando comparado com o grupo PcDP 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 Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos.

Portanto, considerando-se os sítios periodontais selecionados, comparando-se indivíduos geneticamente suscetíveis e geneticamente protegidos, no *baseline* e 45 e 90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico, verificou-se que não houve diferença estatística significativa quanto à PS (Tabela 11) e NIC (Tabela 12).

No entanto, na análise dos índices clínicos periodontais de boca toda, no *baseline*, comparando-se indivíduos geneticamente suscetíveis com os geneticamente protegidos, verificou-se que houve diferença estatística significativa dos índices clínicos periodontais IPV (Tabela 2), ISM (Tabela 3) e SS (Tabela 4). Ao contrário dos índices PS (Tabela 5), PS \geq 4 mm (Tabela 6), NIC (Tabela 7), número de sítios com PS \geq 4 mm no *baseline* que reduziram \geq 2mm após 90 dias (Tabela 8) e número de sítios com NIC \geq 4 mm no *baseline* que ganharam \geq 2mm após 90 dias (Tabela 9), onde não houve influência da suscetibilidade genética à DP.

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 apresentou maior volume de FS (0,46 μ l) em relação ao grupo SsDP (0,18 μ l), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0000001$) (Figura 7). De modo similar, neste mesmo período, o grupo PcDP apresentou maior volume de FS (0,46 μ l) em relação ao grupo PsDP (0,15 μ l), também proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000011$) (Figura 7). Esses resultados indicam que tanto entre indivíduos geneticamente suscetíveis quanto entre geneticamente protegidos à DP, houve maior volume de FS naqueles que apresentaram DP. Em 45 dias, entre os grupos ScDP e SsDP houve diferença estatisticamente significativa do volume do FS ($p = 0,0000001$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,00011$). Ao final de 90 dias do término do tratamento periodontal não-cirúrgico, essas diferenças se mantiveram significantes entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,0000001$) e entre os grupos PcDP e PsDP ($p = 0,000006$).

Na comparação ao longo dos períodos, os grupos PcDP e ScDP apresentaram uma diminuição significativa no volume do FS ($p = 0,002$) e ($p = 0,001$), enquanto os demais grupos não apresentaram diminuição desse

parâmetro. Este achado sugere que, independentemente da carga genética do paciente, essa diminuição significativa foi devida aos grupos serem portadores da doença periodontal no *baseline* e terem recebido tratamento periodontal, diminuindo assim o volume de FS.

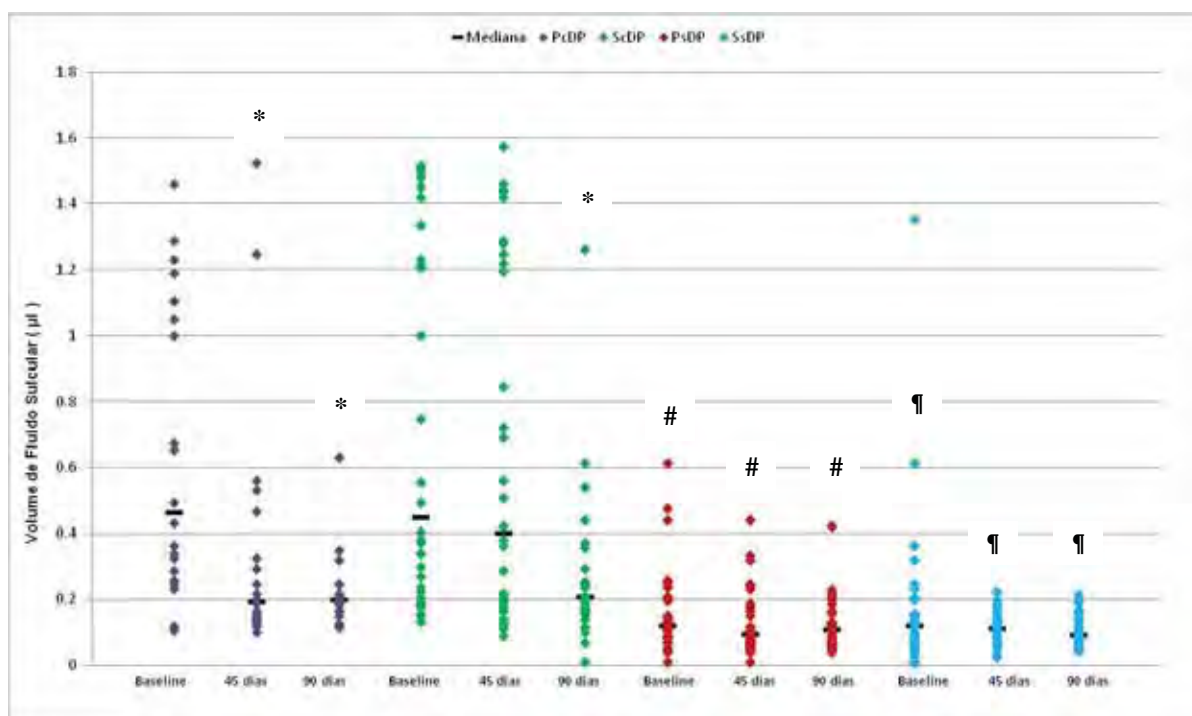


FIGURA 7 - Comparação do FS (µl) entre os grupos nos diferentes períodos.

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

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

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

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

Teste de Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos de cada grupo.

Na avaliação da quantidade total de IL-4 (pg/ml) entre os grupos foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p = 1,0$) (Figura 8). Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo SsDP apresentou maior quantidade total de IL-4 (0,37

pg/ml) em relação ao grupo ScDP (0,23 pg/ml), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000002$) e o grupo PsDP também apresentou uma maior quantidade total de IL-4 (0,32 pg/ml) em relação ao grupo PcDP (0,18 pg/ml) ($p = 0,0015$). Ao final de 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da quantidade total de IL-4 (pg/ml) entre os grupos: ScDP e SsDP ($p = 0,002$), PcDP e PsDP ($p = 0,025$) e entre os grupos PcDP e ScDP ($p = 0,000001$), apresentando uma maior quantidade total de IL-4 o grupo ScDP (0,46 pg/ml) comparado ao grupo PcDP (0,33 pg/ml) (Figura 8). Ao final dos 90 dias, houve diferença significativa entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,000006$) e entre os PcDP (0,44 pg/ml) e ScDP (0,77 pg/ml), ($p = 0,000001$).

Na comparação ao longo dos períodos observou-se um aumento significativo da quantidade total de IL-4 comparados ao baseline em todos os grupos: PcDP ($p < 0,0001$); ScDP ($p < 0,0001$); PsDP ($p < 0,0001$) e SsDP ($p = 0,001$) (Figura 8).

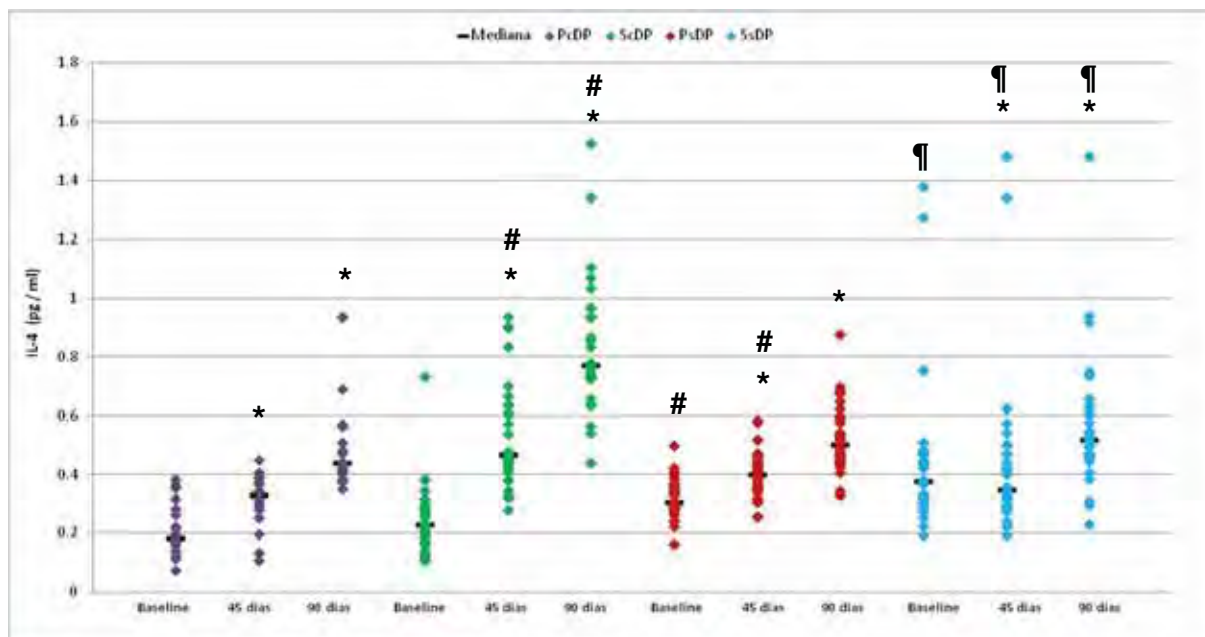


FIGURA 8 - Comparação da quantidade total de IL-4 (pg/ml) entre os grupos nos diferentes períodos.

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

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

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

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

Teste de Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos de cada grupo.

Na avaliação da concentração de IL-4 (pg/ μ l) foi verificado no *baseline* que os grupos ScDP e PcDP não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 9). Ainda no *baseline*, verificou-se que o grupo SsDP apresentou maior concentração de IL-4 (3,3 pg/ μ l) em relação ao grupo ScDP (0,37 pg/ μ l), proporcionando uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000002$) e também que o grupo PsDP (2,4 pg/ μ l) apresentou maior concentração de IL-4 que o grupo PcDP (0,38 pg/ μ l), ($p = 0,0015$). Após 45 dias, houve diferença estatisticamente significativa da concentração de IL-4 (pg/ μ l) entre os grupos ScDP e SsDP ($p = 0,0025$), PcDP e PsDP ($p = 0,028$) e entre os grupos ScDP e PcDP ($p = 0,000002$), sendo que o grupo PcDP

apresentou uma maior concentração de IL-4 (1,7 pg/ μ l) comparado ao grupo ScDP (1,0 pg/ μ l). Ao final de 90 dias, essas diferenças se mantiveram entre os 2 grupos, ScDP e SsDP ($p = 0,000005$), e entre ScDP e PcDP ($p = 0,0000001$).

Na comparação ao longo dos períodos houve um aumento significativo na concentração total de IL-4 (pg/ μ l) em todos os grupos: PcDP ($p < 0,0001$); ScDP ($p < 0,0001$); PsDP ($p < 0,0001$) e SsDP ($p = 0,006$) (Figura 9).

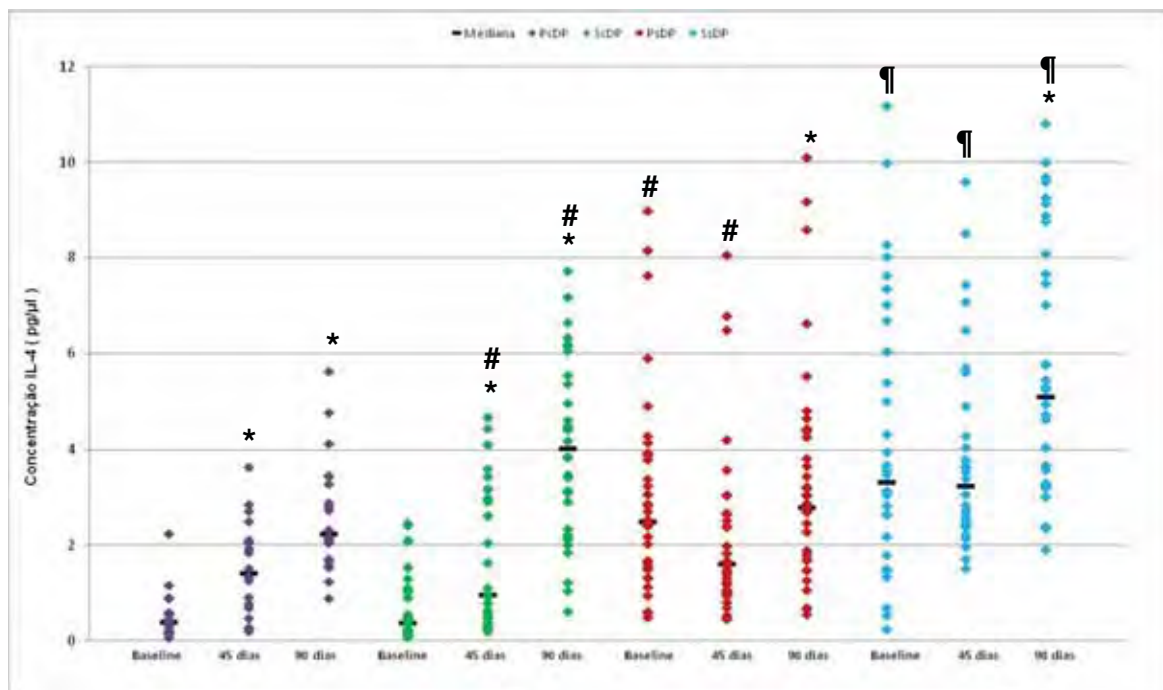


FIGURA 9 - Comparação da concentração de IL-4 (pg/ μ l) entre os grupos nos diferentes períodos.

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

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

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

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

Teste de Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos em cada grupo.

Portanto, comparando-se indivíduos geneticamente suscetíveis com os geneticamente protegidos contra a DP, no *baseline*, ao final de 45 dias e 90 dias do tratamento periodontal não-cirúrgico, verificou-se que não houve diferença estatística significativa no volume do FS.

Para os outros parâmetros imunológicos avaliados (quantidade total de IL-4 (pg/ml) e concentração de IL-4 (pg/ μ l) foram encontradas diferenças estatísticas significantes nos períodos de 45 e 90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico entre os grupos ScDP e PcDP. Em outras palavras, a suscetibilidade genética à DP dada por diferentes haplótipos do gene *IL4* influenciou na presença da proteína IL-4 detectada no fluido sulcular dos indivíduos após 45 e 90 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico (Figuras 8 e 9).

Metaloproteinases de Matriz

No intuito de evidenciar que havia inflamação nos sítios selecionados dos pacientes diagnosticados com DP (independente da carga genética) em relação aos selecionados dos pacientes sem DP, decidiu-se mensurar a quantidade total de MMP8 (ng/ml) nas mesmas amostras de fluido sulcular que foram utilizadas para quantificar IL-4.

Verificou-se no *baseline* que os grupos com DP apresentaram maior quantidade total de MMP-8 (290 ng/ml) em relação ao grupo Controle (18.3 ng/ml) ($p < 0,0001$) (Figura 10). No período de 45 dias após a finalização do tratamento periodontal não-cirúrgico essa diferença se manteve significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Ao final dos 90 dias, observou-se ainda essa diferença significativa entre os grupos. Na comparação ao longo dos períodos, tendo como referência o *baseline*, para os grupos com DP observou-se uma diminuição significativa da quantidade total de MMP-8 após 45 e 90 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico ($p = 0,0001$). Para os grupos controle, houve diferença significativa entre o *baseline* e o período de 90 dias após finalização do tratamento periodontal não-cirúrgico ($p = 0,0001$) (Figura 10).

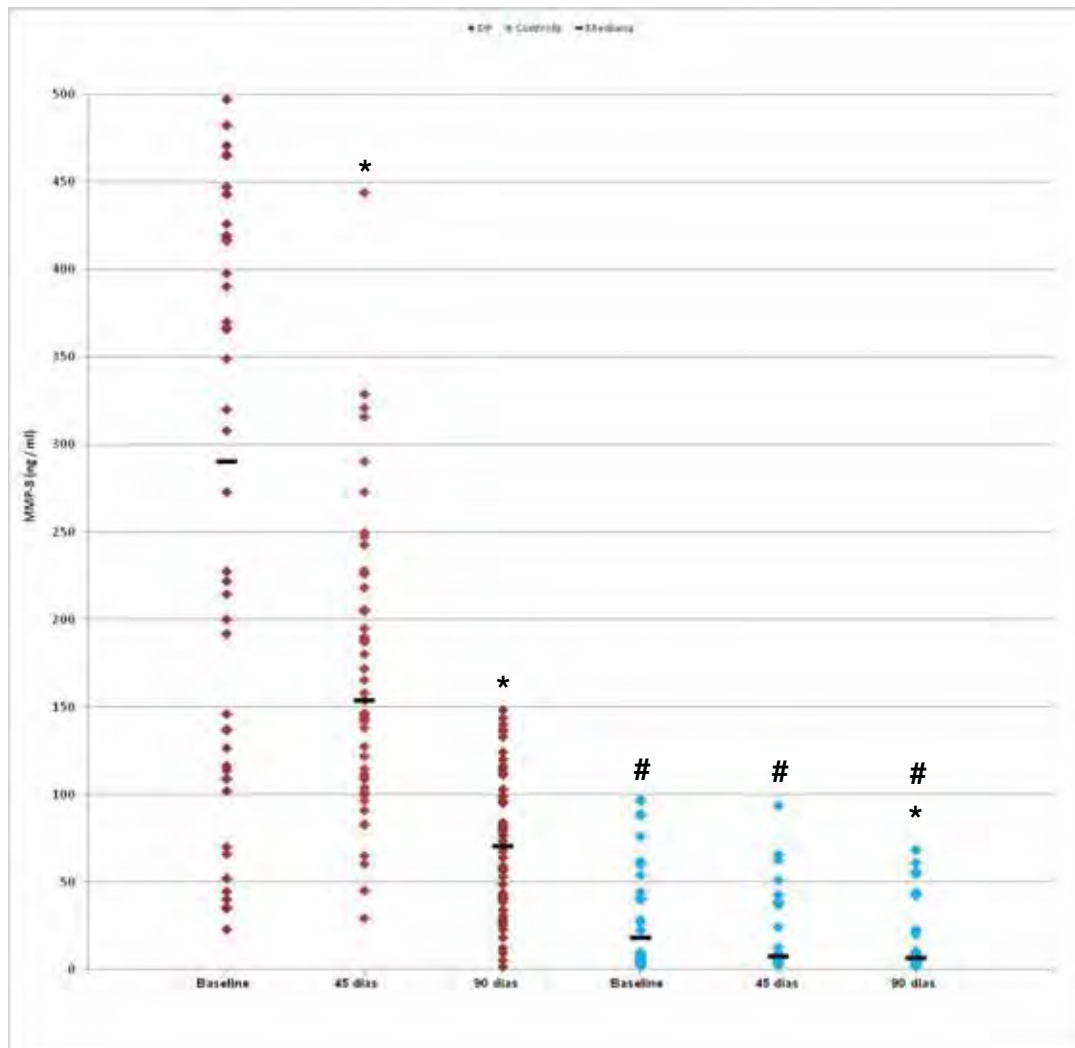


FIGURA 10 - Comparação da quantidade total de MMP-8 (ng/ml) entre os grupos nos diferentes períodos.

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

(#) Diferenças significantes quando comparado ao grupo DP no mesmo período.

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

Teste de Friedman para as avaliações entre os diferentes períodos em cada grupo.

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.

Para o grupo ScDP no *baseline* houve correlação significativa entre a quantidade total de IL-4 e IPV (razão do coeficiente de correlação de Spearman = $r_s = 0,50$) e a concentração de IL-4 e IPV ($r_s = 0,61$) (Tabela 13). Referente ao grupo SsDP, houve uma correlação negativa entre a quantidade total de IL-4 e IPV ($r_s = - 0,63$) e com SS ($r_s = - 0,69$). Ainda no baseline, referente ao grupo PcDP, observou-se correlação positiva entre a quantidade total de IL-4 e SS ($r_s = 0,89$) e PS ($r_s = 0,85$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre os níveis de IL-4 e parâmetros clínicos de boca toda (*Baseline*)

Grupo/ Parâmetro	Quantidade total de IL-4	Concentração de IL-4	Volume do FS
PcDP			
IPV	0,14	-0,01	0,09
ISM	0,36	0,13	0,03
SS	0,89*	0,09	0,36
PS	0,85*	0,41	0,04
ScDP			
IPV	0,50*	0,61*	-0,49
ISM	0,12	0,38	-0,22
SS	0,13	0,29	-0,41
PS	-0,11	-0,17	0,34
PsDP			
IPV	-0,16	-0,21	0,20
ISM	-0,24	-0,07	0,05
SS	-0,36	0,10	-0,20
PS	0,25	0,17	-0,23
SsDP			
IPV	-0,63*	0,01	-0,12
ISM	-0,07	0,02	-0,09
SS	-0,69*	-0,26	0,13
PS	0,18	0,29	-0,11

*Correlação significativa
Coeficiente de Correlação de Spearman

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal as correlações significativas mais fortes observadas foram referente ao grupo ScDP, entre PS e o volume do FS $rs = 0,69$), e negativa ($rs = - 0,58$) para PS (Tabela 14).

Tabela 14 - Correlação entre os níveis de IL-4 e parâmetros clínicos de boca toda (45 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico)

Grupo/ Parâmetro	Quantidade total de IL-4	Concentração de IL-4	Volume do FS
PcDP			
IPV	0,28	-0,07	0,37
ISM	-0,27	-0,43	0,26
SS	0,49	0,38	0,01
PS	0,55	0,18	0,27
ScDP			
IPV	0,39	0,18	-0,10
ISM	0,40	0,01	0,17
SS	-0,05	-0,09	0,10
PS	-0,20	-0,58*	0,69*
PsDP			
IPV	-0,44*	-0,12	-0,01
ISM	-0,25	-0,01	-0,19
SS	-0,38	-0,09	0,24
PS	-0,54*	-0,43	-0,43
SsDP			
IPV	0,13	-0,42	0,49
ISM	0,18	-0,20	0,32
SS	-0,56*	0,08	0,36
PS	-0,16	-0,21	0,09

*Correlação significante
Coeficiente de Correlação de Spearman

Ao final de 90 dias do término do tratamento periodontal, referente ao grupo SsDP, correlações negativas foram observada entre a concentração de IL-4 e os parâmetros clínicos ISM ($r_s = - 0,57$) e PS ($r_s = - 0,59$) (Tabela 15). Para o grupo ScDP observou-se uma correlação negativa entre a quantidade total de IL-4 e SS ($r_s = - 0,61$). As correlações mais fortes encontradas foram referente ao grupo PcDP, sendo negativa entre PS e concentração de IL-4 ($r_s = - 0,78$) e positiva entre PS e volume do FS ($r_s = 0,67$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Correlação entre os níveis de IL-4 e parâmetros clínicos de boca toda (90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico)

Grupo/ Parâmetro	Quantidade total de IL-4	Concentração de IL-4	Volume do FS
PcDP			
IPV	0,16	-0,02	-0,27
ISM	-0,43	-0,30	0,50
SS	0,07	0,19	0,19
PS	0,19	-0,78*	0,67*
ScDP			
IPV	-0,15	-0,18	0,04
ISM	-0,06	-0,15	0,21
SS	-0,61*	-0,40	0,33
PS	-0,21	0,16	-0,16
PsDP			
IPV	0,05	0,01	-0,26
ISM	0,36	-0,32	-0,02
SS	0,26	-0,38	0,18
PS	-0,24	-0,08	-0,26
SsDP			
IPV	0,26	0,21	0,17
ISM	0,39	-0,57*	-0,17
SS	0,20	0,21	-0,03
PS	0,44	-0,59*	-0,27

*Correlação significativa
Coeficiente de Correlação de Spearman

Analisando coletivamente os resultados de correlação apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15, pode-se notar maior incidência de correlações significativas nos grupos ScDP, seguido dos grupos PcDP e SsDP. O grupo com menor relevância em termos de análise de correlações foi o PsDP, tendo mostrado somente correlações fracas e regulares após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. Isso sugere que a presença do haplótipo que confere suscetibilidade genética à DP ou proteção contra o

desenvolvimento desta, correlaciona-se a determinados parâmetros clínicos periodontais em função da produção de IL-4 ou do volume de FS.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Analisando a literatura científica, não há nenhum estudo de associação investigando simultaneamente os índices clínicos periodontais, níveis da citocina IL-4 (no fluido sulcular) e a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico em indivíduos com suscetibilidade genética à DP ou proteção contra o desenvolvimento desta, conferida por meio dos haplótipos formados pelos polimorfismos -590(T/C), +33(T/C) e VNTR (I/D) no gene *IL4*, até o presente momento.

Em relação ao número de pacientes investigados em cada grupo deste estudo, nos grupos ScDP e SsDP o número de 16 pacientes incluídos está semelhante ao observado em outros estudos longitudinais com 3 períodos de acompanhamento, tendo sido investigados 15 pacientes em cada grupo^{55, 77}. O menor número de pacientes está presente no grupo PcDP (n=10). No entanto, mediante o cálculo amostral realizado inicialmente a um valor de $\alpha = 0,05$ e poder estatístico de 95%, o número mínimo de pacientes seria de 7 indivíduos em cada grupo. Portanto, apesar do aparente limitado número de pacientes em cada grupo este foi suficiente para que demonstrar diferenças estatísticas com aceitável confiança. Os dados demográficos deste estudo mostraram homogeneidade quanto à média de idade, gênero e número de dentes entre os indivíduos dos diferentes grupos. Portanto, esses fatores não se caracterizaram como variáveis para o presente estudo.

Na análise dos parâmetros clínicos de boca toda do presente estudo, no período *baseline*, os resultados dos parâmetros clínicos avaliados IPV, ISM, e SS apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os indivíduos

suscetíveis geneticamente à DP e os protegidos contra a DP. Isso confirmou a hipótese que talvez aqueles indivíduos com suscetibilidade genética apresentassem piores índices clínicos periodontais que aqueles geneticamente protegidos contra a DP.

Verificou-se também que independentemente da suscetibilidade genética, os indivíduos com DP apresentaram significativos piores índices clínicos periodontais quando comparados aos sem DP, resultado esse, já esperado. Destaca-se o parâmetro clínico de SS onde houve uma maior porcentagem no grupo ScDP (26,9%) em relação ao grupo PcDP (16,0%) proporcionando uma diferença significativa entre os grupos ($p = 0,015$) (Tabela 4). Este é um resultado importante porque a presença de sangramento à sondagem está diretamente relacionada com a presença da doença periodontal. Portanto podemos concluir que os indivíduos que apresentavam o haplótipo de proteção do gene *IL4* ao desenvolvimento da DP, apresentaram uma menor porcentagem de sangramento, assim tendo a menor quantidade de sítios doentes.

Ainda no período *baseline*, avaliando a mediana da PS de boca toda dos indivíduos dos grupos com DP, independente da sua carga genética (Tabela 5), observou-se que estes apresentaram uma DP de intensidade leve, na qual essa medida variou entre 2,4 mm (ScDP) e 2,3 mm (PcDP). Na avaliação da mediana do NIC de boca toda (Tabela 7), esses mesmos indivíduos apresentaram, independente da sua carga genética, mensuração de perda de inserção clínica, indicando presença de recessões gengivais⁶⁰, 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.

Um estudo prévio realizado por nosso grupo com semelhante delineamento experimental, mas com foco em polimorfismos e análise imunológica de IL-8²⁴, também investigou parâmetros clínicos periodontais após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico. A avaliação da resposta do periodonto à RAR (raspagem e alisamento radicular) não deve ser realizada antes de 4 semanas após o tratamento^{20, 27, 60}. Tais mensurações tomadas prematuramente não irão representar a completa cicatrização dos tecidos e podem ser erroneamente interpretadas como resposta insatisfatória ao mesmo. Neste presente estudo, também foram avaliados os parâmetros clínicos após 90 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, pois 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 tratamento²³.

Independentemente de o indivíduo apresentar suscetibilidade ou proteção genética à DP, verificou-se melhora em todos os índices clínicos periodontais, como resultado do tratamento periodontal não-cirúrgico comparando-se com o período *baseline*. Portanto, para todos os grupos avaliados, não houve diferenças estatisticamente significantes na resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico. Mais precisamente, não foi observada diferença significativa entre indivíduos com diferente carga genética nos parâmetros clínicos IPV, ISM e SS nos períodos de 45 e 90 dias após o tratamento periodontal. Dessa forma, notamos que todos os grupos

apresentaram uma boa resposta frente ao tratamento não cirúrgico. Ao final de 90 dias do término do tratamento periodontal, refletindo a fase de manutenção dos pacientes, quando terá ocorrido a cicatrização do tecido periodontal^{73, 97, 135}, novos exames clínicos foram realizados e verificou-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Este resultado indica que a presença do haplótipo no gene *IL4* não foi capaz de influenciar a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico e que a terapia periodontal realizada foi igualmente eficiente para todos os grupos estudados. Em concordância com este achado, mas considerando o período de avaliação pós-tratamento de 45 dias, estão os resultados de Corbi et al.²⁴, em relação a haplótipos no gene *IL8* que conferem ou não suscetibilidade genética à DP.

Também semelhante aos resultados de Corbi et al.²⁴, 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^{26, 52} em todos os grupos de indivíduos analisados (ScDP, SsDP, PcDP e PsDP). Sugere-se que o SS tenha diminuído devido ao tratamento periodontal, pois somente o controle de biofilme supragengival pode explicar a redução do SS para os grupos que não apresentavam a doença (SsDP e PsDP). Nesses grupos sem DP não há bolsas periodontais, assim o sangramento à sondagem inicialmente verificado pode estar relacionado a uma inflamação gengival, de modo que o controle de biofilme supragengival pode explicar sua diminuição após 90 dias⁶⁰, pois todos os pacientes receberam instruções de higiene oral e profilaxia quinzenalmente.

Nos grupos ScDP e PcDP que apresentavam doença periodontal, as mudanças clínicas após o tratamento periodontal não-cirúrgico mostraram a efetividade do mesmo em diminuir a inflamação, diminuir a profundidade de sondagem e promover a cura de sítios ativos (diminuição na prevalência de sangramento à sondagem) e ganho no NIC (Tabelas 4, 5, 6). Estes resultados mostraram-se de acordo com estudos clínicos que descrevem a eficácia do tratamento periodontal não-cirúrgicos na terapia periodontal. Figueiredo et al.³⁷ demonstraram que o tratamento periodontal não-cirúrgico melhora significativamente as condições clínicas periodontais, por meio da diminuição da PS, diminuição na prevalência do SS e ganho no NIC.

Mombelli et al.⁸⁰ ressaltam 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 mm. Por isso, para minimizar este tipo de erro, foram realizadas sondagens por um examinador especialista em Periodontia (G.A), devidamente treinado e calibrado e placas de acrílico foram confeccionadas para padronizar a posição de inserção da sonda periodontal. Com boa viabilidade, mas pelo rigor metodológico, este método tem sido utilizado, apenas em pesquisa acadêmica⁸⁰.

Na análise da quantificação do volume do FS, no período *baseline*, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com suscetibilidade ou proteção genética à DP, como pode ser observado na Figura 7. 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 7). Este resultado mostra-se de

acordo com os resultados apresentados^{11, 41, 57, 74, 123}. Uma vez que, pacientes doentes por apresentarem um expressivo processo inflamatório, têm aumentada essa quantidade de fluido sulcular⁶⁸.

Ainda em relação ao volume do FS, ao final de 45 dias do término do tratamento periodontal não-cirúrgico verificou-se que os indivíduos com e sem suscetibilidade genética à DP não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Ao final de 90 dias, nova quantificação foi realizada e não houve diferença significativa entre os grupos com suscetibilidade à DP ou protegidos geneticamente contra esta. Na comparação ao longo dos períodos verificou-se uma diminuição significativa do volume de FS nos grupos PcDP e ScDP (Figura 7). Essa diminuição significativa do volume de FS ocorreu devido ao tratamento periodontal não-cirúrgico realizado com eficiência, e está em concordância com outros estudos que encontraram, em indivíduos com DP, menor volume de FS após a terapia periodontal^{11, 37, 41, 57, 74, 123}. Na avaliação da citocina IL-4 detectada no FS (quantidade total pg/ml e da concentração ng/ μ l) no período *baseline*, verificou-se que os indivíduos com suscetibilidade ou proteção genética à DP não apresentaram diferenças significantes. Os indivíduos sem DP apresentaram maiores níveis de quantidade total e concentração de IL-4 do que os com DP (Figura 8 e 9). Este resultado concorda com os estudos de Giannopoulou et al.⁴⁷, Bozurk et al.¹⁷, Figueiredo et al.³⁷ que encontraram maiores níveis da IL-4 no fluido gengival de pacientes saudáveis em comparação aos pacientes com periodontite.

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, houve um aumento significativo da quantidade total de IL-4 (pg/ml) e da concentração

total de IL-4 (pg/ μ l) nos grupos PcDP e ScDP (Figuras 8 e 9) comparando-se ao respectivo *baseline*, com diferença significativa ($p= 0,00002$) entre eles. Ao final de 90 dias houve um aumento significativo na quantidade total de IL-4 e na concentração total de IL-4 em todos os grupos comparados ao *baseline*. Nesse mesmo período observou-se uma maior quantidade significativa de IL-4 no grupo ScDP comparado ao grupo PcDP. Esses resultados de aumento na quantidade e na concentração de IL-4 após o tratamento não-cirúrgico concorda com os achados de Kabashima et al.⁵⁸ e Tsai et al.¹²³ que encontraram maiores níveis de IL-4 após o tratamento periodontal. Sugerindo assim, que a citocina Th2 representada pela IL-4 está associada com a remissão e melhora da inflamação periodontal. Shapira et al.¹⁰⁷, Fujihashi et al.³⁹, Kabashima et al.⁵⁸, Giannopolou et al.⁴⁷ e Tsai et al.¹²³ sugerem que o baixo nível de IL-4 nos tecidos periodontais doentes está relacionado com a atividade e progressão da DP. Em contrapartida, Gorska et al.⁵¹, Behle et al.¹² e Duarte et al.³³ não observaram diferenças nos níveis de IL-4 antes e depois do tratamento periodontal. Possíveis explicações para essas diferenças de quantidade e concentração de IL-4 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 realizado⁵⁷.

Em relação à análise imunológica, apesar do foco deste estudo estar na quantificação da IL-4 no fluido sulcular, como esta tem caráter pleiotrópico, pois inibe células Th1 enquanto estimula células Th2¹⁰⁶; também há resultados conflitantes sobre a quantidade de IL-4 encontrada no fluido sulcular de sítios afetados pela DP, que vão desde a ausência^{39, 78, 106, 131} ou baixa quantidade⁹⁹, até alta concentração de IL-4⁶². Assim, para comprovar que havia realmente inflamação nos sítios escolhidos de pacientes de grupos diagnosticados como doentes periodontalmente, optou-se por fazer o teste imunoenzimático ELISA para MMP-8. Essa enzima foi escolhida pela sua comprovada ação pró-inflamatória e por ser considerada pela literatura científica como um bom marcador para detecção de sítios com doença periodontal ativa^{63, 64, 73, 95}. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura, onde altas concentrações de MMP-8 foram encontradas nos indivíduos doentes proporcionando uma diferença significativa com o grupo controle, e também mostrando uma diminuição desta após o tratamento periodontal (Figura 10). Deste modo, apesar do grau de inflamação periodontal leve observado nos pacientes incluídos neste estudo, foi possível confirmar que os sítios considerados afetados pela DP apresentavam-se com inflamação ativa, dados os resultados imunológicos para MMP-8. Interessantemente, Pirhan et al.⁹⁰ desenvolveram um estudo com hipóteses semelhantes a desta Dissertação, sendo que procuraram verificar 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.

Os resultados da análise imunológica deste estudo sugerem que a suscetibilidade genética à DP dada por diferentes haplótipos no gene *IL4* influenciaram a quantidade (Figura 8) e a concentração de IL-4 (Figura 9). Este resultado parece indicar que esse haplótipo é funcional, pois foi capaz de influenciar a produção da citocina IL-4 pelos tecidos periodontais avaliados no FS. No entanto, estudos *in vitro*, apropriados à investigação da funcionalidade de haplótipos em nível transcricional e pós-transcricional, poderão contribuir para confirmar ou não se tais haplótipos no gene *IL4* são funcionais. Contudo, o presente estudo, semelhantemente ao de Corbi et al.²⁴ enfocando IL-8, por investigar *in vivo* a produção de IL-4 em pacientes com e sem DP mediante diferentes haplótipos no gene *IL4*, 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.

Analisando os resultados de correlação deste estudo, correlacionando-se os dados clínicos periodontais com os dados imunológicos, observou-se que no *baseline* o grupo SsDP mostrou uma correlação negativa entre a IPV e SS com a quantidade total de IL-4, pois à medida que diminui a PS e o SS aumenta a quantidade total de IL-4.

Após 45 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico, o grupo ScDP mostrou correlação negativa entre PS e concentração de IL-4, pois

à medida que a PS diminuiu com o tratamento periodontal, a concentração de IL-4 aumenta (Figura 9), e também uma correlação positiva entre a PS e volume de fluido, pois a medida que diminui a PS diminui o volume do fluido (Figura 7). No grupo SsDP observamos uma correlação negativa entre o SS e a quantidade total de IL-4. Esses resultados sugerem que à medida que diminuem os índices clínicos periodontais, indicando recuperação da saúde periodontal aumenta a quantidade de IL-4, por ser esta considerada uma citocina antiinflamatória está relacionada com o estado de saúde periodontal ^{61, 106, 123}.

Ao final de 90 dias do término do tratamento (Tabela 15), no grupo PcDP observou-se uma correlação negativa entre a PS e a concentração de IL-4, ou seja conforme diminui a PS aumenta a concentração de IL-4. (Figura 8), Também foi constatada e uma correlação positiva entre a PS e o volume do fluido, pois conforme diminuiu a PS diminui também o volume de Fluido (Figura 7), indicando diminuição do exudato inflamatório. No grupo ScDP observamos uma correlação negativa entre SS e a quantidade total de IL-4, pois conforme diminui o SS aumentam as concentrações da citocina IL-4. Já no grupo SsDP verificaram-se correlações negativas entre a concentração de IL-4 e os índices clínicos ISM e PS (Figura 9).

Esses resultados de correlações concordam com os achados na literatura de que a citocina IL-4 está inversamente relacionada à DP, indicando que à medida que os parâmetros clínicos diminuem, as concentrações de IL-4 aumentam ^{17, 58, 123}. Diante dos resultados clínicos e imunológicos apresentados, observa-se que a presença do haplótipo que confere

suscetibilidade genética à DP ou proteção contra o desenvolvimento desta correlacionou-se a determinados parâmetros clínicos periodontais em função da produção da IL-4 ou do volume de FS. Os indivíduos com suscetibilidade ou proteção genética à DP dada pelo haplótipo no gene *IL4*, apresentaram diferenças estatisticamente significantes nos índices clínicos periodontais avaliados no *baseline*, e também nos parâmetros imunológicos avaliados entre os grupos com DP nos períodos de 45 e 90 dias após o término do tratamento.

Porém, apesar da carga genética dos pacientes não estar associada a diferenças no volume de fluido coletado, nem interferirem na resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico, foram evidenciados níveis aumentados da quantidade e concentração de IL-4 presentes no FS. Apesar da periodontite apresentada pelos indivíduos do estudo ser de intensidade leve a moderada, a análise de correlação sugere que a presença do haplótipo que confere suscetibilidade genética à DP ou proteção contra o desenvolvimento desta, correlaciona-se a determinados parâmetros clínicos periodontais em função da produção de IL-4 ou do volume de FS.

Futuros estudos *in vitro* poderão contribuir para compreender como os diferentes haplótipos influenciam a taxa de transcrição e tradução da proteína IL-4, bem como isso poderia ser influenciado pela ação de microrganismos, tal como ocorre na doença periodontal.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

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

1) Entre indivíduos com suscetibilidade genética à DP ou proteção genética contra o desenvolvimento desta houve diferença significativa dos parâmetros clínicos periodontais: índice de placa visível, sangramento marginal e sangramento à sondagem, considerando-se o período *baseline*.

2) Indivíduos com suscetibilidade ou proteção genética à DP responderam de forma semelhante ao tratamento periodontal não-cirúrgico.

3) A suscetibilidade genética à DP conferida pela presença de haplótipos no gene *IL4* influenciou a produção da citocina IL-4 após 45 e 90 dias de finalizado o tratamento periodontal não-cirúrgico.

Referências

8 REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
2. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 259.
3. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
4. Anovazzi G. Haplótipos no gene il4 estão associados com suscetibilidade à doença periodontal? [Trabalho de Conclusão de Curso]. Araraquara: Faculdade de Odontologia Unesp; 2008.
5. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2010; 81:392-402.
6. Arai N, Nomura D, Villaret D, et al. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol.* 1989; 142: 274-82.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4:1-6.
8. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53:12-27.
9. Armitage GC, Cullinan MP, Seymour GJ. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontol 2000.* 2010; 53:7-11.
10. 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.
11. Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis.* 2009; 15: 82-7.
12. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celenti R, Kerschull M, et al. Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009;36:287-94.
13. Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2002; 23: 201-8.

14. 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: 640-4.
15. Borges-Osório RW. *Genética humana.* Porto Alegre: Artmed; 2001.
16. Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 233-9.
17. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Berker E, Tepe E, Akkus S. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine.* 2006; 35:180-5.
18. Buchs N, Silvestri T, di Giovine FS, Chabaud M, Vannier E, Duff GW, et al. IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. *Rheumatology.* 2000; 39: 1126-31.
19. Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos, and complexity. *Immunity.* 1999; 11: 507-13.
20. Caton J, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after a single episode of root planing. *J Periodontol.* 1982; 53:420-4.

21. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 366-9.
22. Chou YH, Ho YP, Lin YC, Hu KF, Yang YH, Ho KY, et al. MMP-8 -799 C>T genetic polymorphism is associated with the susceptibility to chronic and aggressive periodontitis in Taiwanese. *J Clin Periodontol.* 2010; 38:1078-84.
23. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 Suppl 2: 6-16.
24. Corbi S. 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. 114.
25. Corey LA, Nance WE, Hofstede P, Schenkein HA. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol.* 1993; 64: 1205-8.

26. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 30-6.
27. Dahlen G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 6-11.
28. Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000.* 2001; 26: 33-53.
29. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 12-32.
30. De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 154-8.
31. Dimou NL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Fcγ receptor polymorphisms and their association with periodontal disease: a meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 255-65.

32. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol.* 2010; 81: 1056-63.
33. Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol.* 2009; 80: 234-43.
34. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 112-41.
35. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 597-609.
36. Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Jr., Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun.* 2008; 76: 3725-34.

37. Figueredo CM, Brito F, Barros FC, Menegat JS, Pedreira RR, Fischer RG, et al. Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011; 46: 141-6.
38. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 32-8.
39. Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, et al. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol.* 1993; 142:1239-50.
40. 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: 541-5.
41. 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.
42. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 112-43.

43. Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 14: 28-38.
44. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol.* 1992; 63: 338-55.
45. Genco RJ, Cohen DW, Goldman HM. *Periodontia contemporanea.* São Paulo: Santos; 1996.
46. Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect.* 2000; 2: 897-906.
47. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 996-1002.
48. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, Sorsa T, Reinhardt RA, Wolff MS, et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol.* 2008; 79: 1409-18.

49. Gonzales JR, Groger S, Haley G, Bodeker RH, Meyle J. Production of interleukin-13 is influenced by the interleukin-4 -34TT and -590TT genotype in patients with aggressive periodontitis. *Scand J Immunol.* 2010; 73: 128-34.
50. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 781-5.
51. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:1046-52.
52. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 324-34.
53. Hartog CM, Wermelt JA, Sommerfeld CO, Eichler W, Dalhoff K, Braun J. Pulmonary matrix metalloproteinase excess in hospital-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 593-8.
54. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 196-209.

55. Heller D, Varela VM, Silva-Senem MX, Torres MC, Feres-Filho EJ, Colombo AP. Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *J Clin Periodontol.* 2010; 38: 355-64.
56. Hyman JJ, Reid BC. Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 230-7.
57. Jin L, Soder 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.
58. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, Toriya Y, Iijima T, Maki K, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 449-55.
59. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol.* 1993; 64: 243-53.

60. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Dyer JK, Bates RE, Jr. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. *J Periodontol.* 1988; 59: 783-93.
61. Kamma J, Mombelli A, Tsinidou K, Vasdekis V, Giannopoulou C. Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 7-10.
62. 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.
63. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 224-32.
64. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14: 430-49.
65. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 72-7.

66. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2008; 53: 175-86.
67. Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 675-80.
68. Lindhe JKT, Lang NT. *Tratado de periodontia e implantologia oral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
69. 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.
70. Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, Van der Velden U. Fcγ receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 595-602.
71. 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.

72. 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.
73. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 180-90.
74. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 489-95.
75. McFarlane CG, Meikle MC. Interleukin-2, interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are elevated in the sera of patients with periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 402-8.
76. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol.* 1999; 70: 49-56.

77. Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 353-65.
78. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71: 981-8.
79. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 483-8.
80. Mombelli A. Clinical parameters: biological validity and clinical utility. *Periodontol 2000.* 2005; 39: 30-9.
81. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000.* 1994; 4: 81-6.
82. Morrison EC, Ramfjord SP, Hill RW. Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 199-211.

83. Newman MG TH, Carranza Jr FA, Klokkevold PR. C. Carranza periodontia clínica. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2007.
84. Nieri M, Muzzi L, Cattabriga M, Rotundo R, Cairo F, Pini Prato GP. The prognostic value of several periodontal factors measured as radiographic bone level variation: a 10-year retrospective multilevel analysis of treated and maintained periodontal patients. *J Periodontol.* 2002; 73: 1485-93.
85. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 754-67.
86. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 248-66.
87. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 216-48.
88. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 617-29.

89. Pihlstrom BL, McHugh RB, Oliphant TH, Ortiz-Campos C. Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. *J Clin Periodontol.* 1983; 10: 524-41.
90. 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.
91. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22: 396-402.
92. Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2008; 43: 712-6.
93. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, et al. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol.* 1987; 14: 445-52.
94. Rasouli M, Kianny S. Association of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iranian patients. *Cytokine.* 2007; 38: 49-53.

95. Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun.* 1999; 67: 2319-26.
96. Ronderos M, Ryder MI. Risk assessment in clinical practice. *Periodontol* 2000. 2004; 34: 120-35.
97. Rosalem W, Rescala B, Teles RP, Fischer RG, Gustafsson A, Figueredo CM. Effect of non-surgical treatment on chronic and aggressive periodontitis: clinical, immunologic, and microbiologic findings. *J Periodontol.* 2010; 82: 979-89.
98. Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 226-38.
99. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1998; 33: 212-25.
100. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 108-29.

101. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:1034-47.
102. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 443-8.
103. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Jr., Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 341-5.
104. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 587-91.
105. Shao MY, Huang P, Cheng R, Hu T. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10: 920-7.

106. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992; 39: 319-22.
107. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 72-86.
108. 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: 1864-9.
109. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63: 322-31.
110. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-44.
111. Soder B, Airila Mansson S, Soder PO, Kari K, Meurman J. Levels of matrix metalloproteinases-8 and -9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood. *J Periodontal Res*. 2006; 41: 411-7.

112. Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 709-17.
113. Sorsa T, Mantyla P, Ronka H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 130-40.
114. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10: 311-8.
115. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol.* 2001; 6: 91-8.
116. Stern DL. Evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution.* 2000; 54: 1079-91.
117. Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 94-106.
118. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005; 49: 491-516.

119. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2006; 42: 180-218.
120. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 438-42.
121. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 233-9.
122. Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 2009; 44: 598-608.
123. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2007; 23: 1-7.

124. Tuter G, Serdar M, Kurtis B, Walker SG, Atak A, Toyman U, et al. Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010; 81: 1132-9.
125. Vandembroeck K, Goris A. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 284-9.
126. Vandembroeck K, Martino G, Marrosu M, Consiglio A, Zaffaroni M, Vaccargiu S, et al. Occurrence and clinical relevance of an interleukin-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1997; 76: 189-92.
127. Vergnes JN, Arrive E, Gourdy P, Hanaire H, Rigalleau V, Gin H, et al. Periodontal treatment to improve glycaemic control in diabetic patients: study protocol of the randomized, controlled DIAPERIO trial. *Trials.* 2009; 10: 65.
128. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-39.

129. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res.* 1996; 31: 393-407.
130. Wolf DL, Neiderud AM, Hinckley K, Dahlen G, van de Winkel JG, Papapanou PN. Fcγ receptor polymorphisms and periodontal status: a prospective follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 691-8.
131. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997; 32: 115-9.
132. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23: 347-53.
133. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 281-7.
134. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2010; 38: 509-16.

135. Zuza EP, Barroso EM, Carrareto AL, Pires JR, Carlos IZ, Theodoro LH, et al. The role of obesity as a modifying factor in patients undergoing non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol.* 2010; 82: 676-82.

Anexo

9 Anexos

Anexo 1 - Cálculo Amostral do estudo

Teste de hipótese para uma média

Página 1 de 1

Valores calculados com os dados de entrada

Desvio padrão: **0.4170**
Diferença a ser detectada: **0.8000**
Nível de significância: **5%**
Poder do teste: **95%**
Teste de hipótese: **bicaudal**
Tamanho da amostra calculado: **4**

Para outros valores do nível de significância e poder do teste temos:

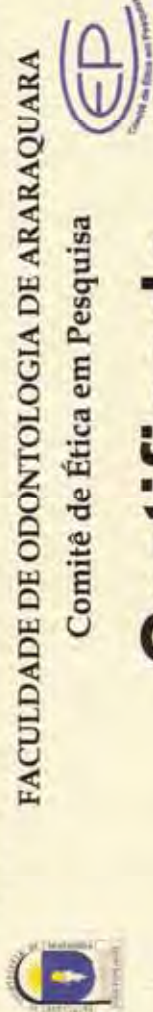
Nív. de signif.	Poder do teste	Tamanho da amostra
5%	65%	1
5%	70%	2
5%	75%	2
5%	80%	2
5%	85%	2
5%	90%	3
0.1%	95%	7
1%	95%	5
10%	95%	3

Anexo 2 - Cópia do certificado de aprovação do Projeto anterior a este estudo pelo CEP



Anexo 3 - 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 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À DOENÇA PERIODONTAL*", sob o protocolo nº 52/08, de responsabilidade do Pesquisador (a) **RAQUEL MONTUJANELI 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 MONTUJANELI 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 Onoffe*
 Coordenadora

Anexo 4 - 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, pertencente 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 da natureza e 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 possuio alguma sensibilidade a algum anestésico; c) Também me perguntaram se tenho alguma doença como: do coração, diabetes, alergia. 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, retirando 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) 3301-8504

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

Assinatura do Paciente _____


 Pesquisador Responsável
 Prof. Dra. Raquel M. Scarel Caminaga

Protocolo CEP nº 52/08
 Aprovado em Reunião de 05/12/08
 Presidente do CEP - FOAR

Anexo 5 - 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? _____

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 09 de março de 2012.

GIOVANA ANOVAZZI