

THAIS OLIVEIRA GONÇALVES
Cirurgiã-Dentista

***INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA SECREÇÃO DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM
PERIODONTITE CRÔNICA SEVERA***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

PIRACICABA
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

G586i Gonçalves, Thais Oliveira.
Influência do tabagismo na secreção de citocinas inflamatórias em
pacientes com periodontite crônica severa. / Thais Oliveira Gonçalves.
-- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Getúlio da Rocha Nogueira Filho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. ELISA. I. Nogueira Filho, Getúlio da Rocha. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Impact of tobaccoism on the cytokine secretion of patients with chronic severe periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontics. 2. ELISA

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Antônio Wilson Sallum, Carlos Marcelo da Silva Figueredo, Getúlio da Rocha Nogueira Filho

Data da Defesa: 26-01-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Janeiro de 2007, considerou a candidata THAIS OLIVEIRA GONÇALVES aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Getúlio L. Nogueira Filho".

PROF. DR. GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carlos Marcelo da Silva Figueredo".

PROF. DR. CARLOS MARCELO DA SILVA FIGUEREDO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Antonio Wilson Sallum".

PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM

Dedico este trabalho

Aos meus queridos pais

Arlete Maria Oliveira Gonçalves e Jerenaldo Teixeira Gonçalves,

Que sempre acreditam quando até mesmo eu duvido, que fazem dos meus sonhos seus sonhos. Não somente este trabalho, mas aos meus pais eu dedico a minha vida.

Aos meus irmãos

Tatiana Gonçalves Poldermans e Gabriel Oliveira Gonçalves,

Aos meus sobrinhos

Kevin Gonçalves Poldermans e Nicholas Gonçalves Poldermans,

Aos meus avós

Adiléia Apolinário Teixeira, Alaíde Teixeira Neves, Celízia Albergaria de Oliveira (in memoriam) e Raimundo Moitinho de Oliveira

Ao meu amor

Erick Leonardo de Oliveira

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho, Orientador;

Ao Prof. Dr. José Tadeu Jorge, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas;

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia;

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica;

Ao Prof. Dr. Marcelo Ferraz Mesquita, Chefe do Departamento de Prótese e Periodontia

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, Responsável pela Área de Periodontia;

Aos Professores da Área de Periodontia, Dr. Antonio Wilson Sallum, Dr. Enilson Antônio Sallum, Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, Dr. Márcio Zaffalon Casati e Dr. Sérgio de Toledo;

Aos Profesores da banca de qualificação, Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, Dr. Márcio Zaffalon Casati e Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa;

Aos Profesores da banca de defesa de dissertação, Dr. Antônio Wilson Sallum e Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo;

Aos colegas do Mestrado, Beatriz Bezerra, Daniela Feitosa, Fabrícia Suaid, Fernanda Ribeiro, Kamille Pontarolli, Liana Linhares, Mauro Santamaria, Renato Casarin, Wagner Filho;

Aos colegas do Doutorado, Ângela Guimarães, Bruno Benatti, Bruno Gurgel, Cléverson Silva, Daiane Peruzzo, Érica Ribeiro, Gabriela da Cruz, Marcelo

Carvalho, Patrícia Furtado, Roberta Tunes, Sandro Bittencourt, Saulo Cabral;

À Secretária da Periodontia, Eliete Aparecida Marim

Ao Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), na pessoa da sua Coordenadora, Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral;

À Colaboradora Profa. Dra. Cláudia Ida Brodskyn, Pesquisadora Associada CPqGM, Fiocruz;

Ao Colaborador Dirceu Joaquim Costa, Doutorando CPqGM, Fiocruz;

À Secretária Camila Motta, CPqGM, Fiocruz;

Ao Curso de Odontologia da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC), na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Urbino da Rocha Tunes

À Secretária da Diretoria do Curso de Odontologia da FBDC, Verônica Miranda;

Aos doadores da pesquisa;

Aos meus amigos, em especial a Cristiane Teixeira, Viviane Britto, Aline Viana, Luciana Valadares, Andréa Lira, Alynne Vieira, Adriana Alcina de Oliveira e Luis Antônio Alves de Oliveira;

À minha família, em especial ao meu cunhado Allard Wouter Poldermans; às minhas primas Célia Mariza Rizzatti Barbosa, Ana Cecília Rizzatti de Albergaria Barbosa e Ana Paula de Araújo Lima; ao meu primo José Ricardo de Albergaria Barbosa e à minha tia Rita Maria Lins de Araújo,

Muito obrigada!

RESUMO

O hábito de fumar representa um dos principais fatores de risco no desenvolvimento e progressão da periodontite, entretanto ainda não foram totalmente esclarecidos os mecanismos patogênicos da doença periodontal relacionados ao tabagismo. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tabagismo pesado (consumo ≥ 20 cig/dia) sobre as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes periodontais, quando comparados a controles saudáveis e não fumantes. As CMSP foram isoladas pelo método Ficoll a partir de 20mL de sangue obtidos de 20 doadores divididos por conveniência em 4 grupos experimentais: fumantes saudáveis (FS), fumantes com periodontite crônica severa (FP), não fumantes saudáveis (FS) e não fumantes com periodontite crônica severa (NFP). As células foram incubadas por 24/48 horas em poços contendo 500 μ L de meio de cultura e ativadas com 1,0ng/mL de LPS (*E.coli*). A partir dos sobrenadantes coletados após a ativação, procedeu-se a dosagem das interleucinas IL-6, IL-8 e IL-10 e do fator de necrose tumoral TNF- α através do teste ELISA, de acordo com cada grupo experimental. Os resultados mostraram que houve redução significativa da secreção de TNF- α ($p \leq 0,05$) no grupo FP quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$), sem diferenças estatísticas na secreção de IL-8, IL-6 e IL-10 entre os grupos ($p > 0,05$). Conclui-se, dentro dos limites deste estudo, que o tabagismo pesado reduz a secreção de TNF- α em pacientes com periodontite crônica severa.

Palavras-chave: periodontite, células mononucleares, ELISA, tabagismo, citocinas

ABSTRACT

Tobaccoism is a major risk factor in the development and further progression of periodontitis however the pathogenesis of tobacco-related periodontal disease is not well understood. Thus, the purpose of this study was to evaluate heavy tobacco smoking effects (consuming ≥ 20 cigarettes/day) on cytokine secretion by peripheral mononuclear cells (PBMC) obtained from periodontal patients compared with healthy non-smokers donors. PBMC were isolated by Ficoll method from 20mL of blood obtained from 20 subjects distributed in four experimental groups: healthy current smokers (FS), periodontitis current smokers (FP), healthy non-smokers (NFS) and periodontitis non-smokers (NFP) donors. Cells were incubated for 24/48 hours in wells containing 500 μ L RPMI 1640 and activated with 1,0ng/mL LPS (*E.coli*). Culture supernatants were assessed for interleukins IL-8, IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor TNF- α by the ELISA test. Results showed that tobaccoism appears to down-regulate TNF- α ($p \leq 0,05$) secretion by mononuclear cells from FP subjects although did not appear to interfere on IL-8, IL-6 and IL-10 between groups ($p > 0,05$). Within the limits of this study, it could be concluded that heavy tobacco smoking reduces TNF- α secretion in patients with chronic severe periodontitis.

Key words: periodontitis, mononuclear cells, ELISA, tobaccoism, cytokines

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO PERIODONTO	4
2.2 FUMO COMO FATOR DE RISCO PARA PERIODONTITE	8
3 PROPOSIÇÃO	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 AMOSTRA DE DOADORES (OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS)	14
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	15
4.3 FASE LABORATORIAL	15
4.3.1 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS	15
4.3.2 CULTURA DE CÉLULAS	15
4.3.3 DOSAGEM DE CITOCINAS	16
4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
5 RESULTADOS	17
5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS	17
5.2 SECREÇÃO DE IL-8 (ELISA)	17
5.3 SECREÇÃO DE TNF- α (ELISA)	18
5.4 SECREÇÃO DE IL-6 (ELISA)	19
5.5 SECREÇÃO DE IL-10 (ELISA)	20

6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE	36
ANEXO	38

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal consiste na infecção dos tecidos de proteção e suporte que se caracteriza por um razoável espectro de formas clínicas. Abrange desde uma gengivite assintomática até casos mais severos de periodontite que acarretam em redução do nível clínico de inserção e perda dental. Estima-se que mais de 80% dos adolescentes em todo o mundo apresentam gengivite. Enquanto apenas uma pequena parcela da população desenvolve as formas mais severas de periodontite, permanecem freqüentes em diversos grupos populacionais os casos de periodontite crônica leve a moderada (Løe *et al.*, 1986; Grossi *et al.*, 1994; Neely *et al.*, 2001; Albandar & Rams, 2002; Neely *et al.*, 2005).

O biofilme dental inicia o processo de destruição dos tecidos periodontais, o qual resulta em diversas manifestações clínicas (Løe *et al.*, 1965; Lindhe & Rylander, 1975). Das bactérias anaeróbias e microaerófilas gram-negativas que compõem este biofilme, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythensis* representam os principais patógenos do processo de desenvolvimento e progressão da periodontite (Socransky *et al.*, 1998). Entretanto, a manifestação da periodontite depende de diversos fatores, tais como: características individuais, sociais e comportamentais (Nunn, 2003).

O sistema imunológico tem como função proteger os tecidos do constante desafio microbiano e limitar os efeitos da presença do biofilme. Como parte deste processo, ocorre algum grau de destruição tecidual dependente da interação micróbio-hospedeiro (Graves & Cochran, 2003; Dixon *et al.*, 2004; Kinane & Attström, 2005). Os fatores de risco parecem então modular a ação dos componentes celulares e moleculares derivados predominantemente do hospedeiro (Kinane & Attström, 2005; Schenkein, 2006). Embora o fumo seja apontado como um dos principais fatores de risco para a iniciação e progressão da doença periodontal, os seus mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (Bergström & Preber, 1994; Grossi *et al.*, 1994; Boström *et al.*, 1999; Kinane, 1999; Research, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology, 1999; Bergström, 2004; Kinane & Attström, 2005; Palmer *et al.*, 2005).

Algumas pesquisas que avaliaram a microbiota subgengival dos pacientes fumantes e não fumantes não detectaram diferenças na composição do biofilme dental (Boström *et al.*, 1999; Apatzidou *et al.*, 2005; Salvi *et al.*, 2005). Os estudos que encontraram elevados níveis de patógenos encontraram também aumento na profundidade de sondagem dos pacientes fumantes fortemente associados ao aumento do número de bactérias (Kinane & Chestnutt, 2000). Por outro lado, os estudos de cultura de células do sistema imune como linfócitos e monócitos demonstram um efeito imunossupressivo do tabaco, da nicotina e dos principais metabólitos da mistura que compõe o fumo (Pfeifer & Irons, 1981; Li *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Ryder *et al.*, 2002).

Em modelos animais, tanto a inalação da fumaça do cigarro quanto a injeção regular de nicotina contribuíram para a redução da densidade óssea e colapso periodontal em modelo de periodontite induzido por ligadura (Nociti *et al.*, 2001; Cesar-Neto *et al.*, 2006). Os dados dos estudos atuais sugerem a exploração da resposta do hospedeiro, já que não há sustentação da hipótese de que há diferenças na composição da microbiota do biofilme subgengival dos pacientes fumantes (Dixon *et al.*, 2004; Apatzidou *et al.*, 2005; Salvi *et al.*, 2005), embora o acúmulo de cálculo subgengival pareça maior em fumantes (Bergström, 2005).

Permanecem restritas as informações a respeito dos componentes celulares e sinalizadores afetados pelas substâncias tóxicas do fumo, assim como sua ligação com a patogênese da periodontite. Portanto, para adicionar informações que possam direcionar novos estudos, torna-se necessário avaliar o padrão celular de secreção de citocinas pró-inflamatórias, antiinflamatórias e quimiotáticas através da cultura de células mononucleares obtidas a partir do sangue de pacientes fumantes ou não, com periodontite ou saudáveis. Dentre as citocinas, destaca-se a IL-8, que irá recrutar mais neutrófilos para o sítio de infecção. Além disto, a IL-8 pode estimular a liberação de ânions superóxidos, enzimas lisossômicas e ativar a expressão de integrinas que facilitam a diapedese. A IL-8 também possui algum efeito quimiotático sobre os linfócitos T (Gesser *et al.*, 1995; Gainet *et al.*, 1998).

As células dendríticas migram para os tecidos linfóides periféricos onde vão estimular a diferenciação dos linfócitos T CD4 que se distinguem pelas citocinas

secretadas. As citocinas produzidas como TNF- α e IL-1 β são responsáveis pela ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8) e macrófagos, que possuem efeitos diretos sobre as células infectadas. Além disso, essas citocinas estimulam a produção de collagenases como MMP e ativam osteoclastos via sistema RANK/RANK-L (Hirose *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; DeFranco *et al.*, 2006).

As células T podem secretar citocinas como IL-6, uma citocina multifuncional com efeito destrutivo sobre os tecidos periodontais e também com efeito protetor (Lerner, 1994; Barbour *et al.*, 1997; Erdemir *et al.*, 2004). A IL-10 tem papel antiinflamatório, estimula as células B a produzirem anticorpos e inibem a ativação dos linfócitos T (Vestergaard *et al.*, 1997; Kucharzik *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2004; DeFranco *et al.*, 2006).

O hábito de fumar, mesmo sendo categoricamente indicado como fator de risco pelas pesquisas epidemiológicas e observacionais, ainda não teve seus mecanismos completamente esclarecidos. Ainda se discute as alterações microbiológicas e por outro lado, os mecanismos celulares e moleculares da influencia do fumo sobre o sistema imunológico ainda não estão completamente esclarecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modulação da resposta imune no periodonto

A resposta imune no periodonto tem início com os componentes do sistema imune inato. Estão incluídas células epiteliais, células de Langerhans, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Kinane & Lappin, 2001; Teng, 2006a). As citocinas regulam as atividades celulares, possuem influência na produção e ativação de diferentes células efetoras e são secretadas principalmente por células T e macrófagos (Seymour & Gemmell, 2001).

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana (Weiss, 1989; Fredriksson *et al.*, 2002), e podem ser encontrados estrategicamente alinhados formando uma parede entre o epitélio juncional e as bactérias. Constitutivamente, as células endoteliais dos vasos sanguíneos do tecido gengival expressam pequenas quantidades de E-selectina, molécula de adesão leucocitária do endotélio (ELAM)-1 e molécula de adesão intracelular (ICAM)-1 que facilitam o extravasamento dos neutrófilos e seu acúmulo nos tecidos (Moughal *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 2004). Postula-se que os neutrófilos rolam sobre as células endoteliais e, uma vez nos tecidos, segue um gradiente de concentração de interleucina (IL)-8, uma potente citocina quimiotática para neutrófilos produzida pelo epitélio, fibroblastos e macrófagos em resposta às bactérias (Moughal *et al.*, 1992; Tonetti *et al.*, 1998).

A IL-8 exerce uma série de efeitos sobre os neutrófilos, além da quimiotaxia (Gesser *et al.*, 1995; Gainet *et al.*, 1998). Esses efeitos incluem estimulação da liberação de ânions superóxidos, enzimas lisossômicas e expressão da integrina CD11b/CD18 (Mac-1), que interage com ICAM-1 endotelial (Fagerholm *et al.*, 2006). A IL-8 também exerce algum efeito quimiotático sobre as células T e mostra-se capaz de induzir a sua secreção (Gesser *et al.*, 1995). Este processo de auto-estimulação pode amplificar a migração de neutrófilos e linfócitos da corrente sanguínea para os tecidos.

Apesar de todos os mecanismos de defesa dos neutrófilos, se os tecidos do hospedeiro são identificados como estranhos ou danificados, tais células podem iniciar o processo de destruição destes tecidos (Weiss, 1989). No caso da periodontite agressiva, os tecidos periodontais são rapidamente destruídos e Gainet *et al.* (1998) associaram este processo à atuação dos neutrófilos, que apresentaram expressão reduzida de moléculas de adesão e aumento de oxigênio reativo, que causariam danos vasculares. Constatou-se também no referido estudo o aumento significativo de IL-8 plasmática nos pacientes com periodontite agressiva, enquanto não detectou-se aumento da expressão de outras citocinas como IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α .

A constante migração de células T, neutrófilos e outros leucócitos para o sítio de infecção permite que todo repertório do sistema imune proteja os tecidos de uma variedade de desafios antigênicos (Moughal *et al.*, 1992). As células do sistema imune inato como monócitos, por exemplo, expressam em suas superfícies receptores *toll-like* (TLR) que reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e desencadeiam as diferentes respostas celulares (Teng, 2006a). As células de Langerhans, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas na gengiva e no ligamento periodontal podem participar direta ou indiretamente na apresentação do antígeno bacteriano às células T, que darão início à resposta imune adaptativa.

A ativação de células T CD4⁺ nos padrões T *helper* (Th)1 e Th2 se distinguem pelas citocinas secretadas (Yamamoto *et al.*, 1997; Erdemir *et al.*, 2004). Entretanto, as formas Th1 e Th2 dependem das condições ambientais para que um clone secrete citocinas Th1, Th2 ou até mesmo ambas (Seymour & Gemmell, 2001). Os micróbios, no sítio de infecção, estimulam as células dendríticas a produzirem citocinas e migrarem para os tecidos linfóides periféricos. A depender das citocinas secretadas pelas células dendríticas, as células T auxiliares irão então se diferenciar em células efetoras, tanto Th1 quanto Th2. Algumas bactérias intracelulares (Yilmaz *et al.*, 2006) estimulam as células dendríticas a produzirem IL-2, o que pode propiciar o desenvolvimento de Th1 e conseqüentemente a ativação de macrófagos. Diversos parasitos, vermes e protozoários estimulam a secreção de uma citocina ainda desconhecida que direciona o desenvolvimento de Th2 e assim, a

produção de anticorpos e ativação de eosinófilos, acarretando a expulsão do parasito. A IL-4 produzida por células T pode desempenhar esta função (DeFranco *et al.*, 2006).

As células Th1 produzem citocinas ativadoras da imunidade celular como IL-12, interferon (IFN)- γ e TNF- α , que ativam células efectoras como os macrófagos, que fagocitam microrganismos e produzem óxido nítrico (NO) (Hirose *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; DeFranco *et al.*, 2006). O NO, sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), possui atividade antibacteriana via oxigênio reativo e ativa células efectoras como linfócitos e *natural killers* (NK) (Hirose *et al.*, 2001). Recentemente, o NO foi relacionado com a modulação da expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) e com a regulação negativa de inibidores teciduais de MMPs (Brennan *et al.*, 2003). As MMPs, enzimas proteolíticas extracelulares, degradam componentes da matriz tecidual do conjuntivo e do osso como colágeno, laminina e fibronectina (DeFranco *et al.*, 2006).

As citocinas das células Th1 também ativam as células T citotóxicas, que destroem as células infectadas. Ainda, TNF- α tem uma ampla abrangência de efeitos inflamatórios e imunorregulatórios, como o estímulo direto dos fibroblastos a produzir colagenase, indução de apoptose¹ de fibroblastos e osteoblastos, estímulo da produção de IL-1 β e prostaglandinas, que também podem estimular a reabsorção óssea (Graves & Cochran, 2003; Erdemir *et al.*, 2004). A IL-1 produzida pelos monócitos estimula a produção de IL-2, outra importante citocina secretada pelas células Th1, a qual ativa a proliferação e maturação de linfoblastos (Li *et al.*, 1996). Suryono *et al.* (2005) ativaram culturas de monócitos com TNF- α e IL-1 β e verificaram o aumento da produção de calprotectina, liberada nos estágios iniciais de inflamação com efeitos bactericidas e quimiotático para neutrófilos. A IL-1 e o TNF- α podem modular a reabsorção óssea ao ativar o ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK-L) (Schenkein, 2006). O RANK-L constitui um membro da superfamília do TNF sintetizado pelos osteoblastos, células do estroma da medula óssea, pelos linfócitos T e células endoteliais. Sua função consiste em ativar os osteoclastos ao ligar-se ao receptor ativador do fator nuclear κ B

¹ Morte programada de uma população celular

(RANK) expresso nos precursores de osteoclastos, linfócitos T e células endoteliais resultando em degradação óssea (Graves & Cochran, 2003; Teng, 2006b).

Em contrapartida, células Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, estimulantes das respostas humorais e inibidores das respostas celulares do tipo Th1 (Yamamoto *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2004). As células Th2 protegem o hospedeiro principalmente contra patógenos extracelulares e a produção de anticorpos pode exercer efeito protetor contra infecções (DeFranco *et al.*, 2006; Teng, 2006a).

A IL-6 caracteriza-se como uma citocina pró-inflamatória multifuncional, cujas atividades biológicas incluem estímulo do crescimento e diferenciação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas, estímulo da proliferação de linfócitos T e ativação da cascata do complemento. A IL-6 também possui a capacidade de induzir reabsorção óssea via indução da secreção de proteínas de fase aguda, fator importante para a patogênese da periodontite (Lerner, 1994; Barbour *et al.*, 1997; Erdemir *et al.*, 2004).

A IL-10 revela-se como a principal citocina antiinflamatória que inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β e TNF- α , inibe a secreção de proteína quimiotática e ativadora de monócitos (MCP)-1 e o desenvolvimento de macrófagos e de células Th1 (Vestergaard *et al.*, 1997; Kucharzik *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2004; DeFranco *et al.*, 2006). Gesser *et al.* (1995) demonstrou que a IL-10 pode ainda bloquear a secreção auto-ativada de IL-8 por linfócitos T.

Em camundongos, a IL-10 mostrou-se um potente supressor de perda óssea alveolar induzida por inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. A supressão da expressão de IL-10 em camundongos infectados levou ao aumento da expressão de IL-4, IL-6, INF- γ e prostaglantina E₂, mediador inflamatório cuja secreção é regulada por TNF- α e IL-1. (Sasaki *et al.*, 2004). A IL-10 pode reduzir a osteoclastogênese via supressão de RANK-L (Teng, 2006b).

Hirose *et al.* (2001) mostraram o perfil panorâmico da expressão de citocinas por células do tecido gengival obtido de paciente com periodontite e de tecido gengival sadio. Em seu estudo, apresentaram sempre maior expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), que especifica a sequência de aminoácidos das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α em pacientes com periodontite, embora com significância

estatística apenas para IL-6. A expressão de mRNA de IL-10 em pacientes com periodontite foi inferior, porém não significativa em relação aos doadores com saúde periodontal.

2.2 Fumo como fator de risco para periodontite

Segundo a *World Health Organization* (2006), no ano de 2003 em torno de 26,3% dos homens adultos e 17,5% das mulheres adultas faziam uso do tabaco no Brasil. Existe uma preocupação global em torno dos prejuízos causados à saúde pública devido à associação entre o tabagismo, a incidência de doenças crônicas e a taxa de mortalidade (Warren *et al.*, 2006).

Com a saúde periodontal em foco, um estudo epidemiológico realizado na região sul brasileira (Susin *et al.*, 2004) associou o hábito de fumar com a perda de inserção severa e com o risco aumentado para fumantes moderados a pesados, com consumo de 20 cigarros por dia, durante 7,5 a 20 anos e por mais de 20 anos respectivamente. Os fumantes moderados representaram 17,1% da população, e os fumantes pesados 15,9%, totalizando 33% da população estudada.

O hábito de fumar tem sido associado com a patogênese da doença periodontal, com o aumento do risco para periodontite e perda dental através de evidências epidemiológicas claras (Löe *et al.*, 1986; Grossi *et al.*, 1994; Bergström & Preber, 1994; Axelsson *et al.*, 1998; Albandar *et al.*, 2000; Albandar *et al.*, 2002; Paulander *et al.*, 2004; Natto *et al.*, 2005). Pesquisas epidemiológicas relativamente recentes sugeriram que os efeitos adversos do fumo de cachimbo, charuto (Albandar *et al.*, 2000) e *narghile*² (Natto *et al.*, 2005) sobre a saúde periodontal mostraram-se comparáveis àqueles do cigarro.

Em acompanhamentos longitudinais de 10 anos, a perda óssea foi maior em fumantes quando comparado com não fumantes, sendo que os fumantes considerados pesados apresentaram maior severidade (Bergström, 2004; Paulander *et al.*, 2004; Baljoon *et al.*, 2005; Natto *et al.*, 2005). Após controlar todos os fatores que podem confundir os

² Cachimbo d'água. Aparelho para fumar tabaco adocicado adicionado de frutas e flores, muito popular no Oriente Médio.

resultados, como padrão de higiene oral, acúmulo de biofilme, presença de cálculo dental, fatores socioeconômicos e demográficos, o consumo do cigarro permanece como fator de risco para desenvolvimento e progressão da doença periodontal, numa relação dose-dependente, ou seja, quanto maior o consumo de tabaco, mais severa será a perda de inserção (Grossi *et al.*, 1994; Kinane & Chestnutt, 2000). Adicionalmente, nunca ter fumado ou parar de fumar parece trazer benefícios na redução da profundidade de sondagem durante o tratamento periodontal (Apatzidou *et al.*, 2005; Preshaw *et al.*, 2005). Porém, Moszczyński *et al.* (2001) afirmam que não há correlação entre a duração do hábito de fumar e seus efeitos supressivos sobre o sistema imune.

Em estudos histométricos em animais, tanto a inalação da fumaça do cigarro (Cesar-Neto *et al.*, 2006), quanto a injeção regular de nicotina (Nociti *et al.*, 2001; Nogueira-Filho *et al.*, 2004) contribuíram para redução da densidade óssea e colapso periodontal no modelo de periodontite induzida por ligadura. Outro estudo da mesma equipe (Cesar-Neto *et al.*, 2004) documentou o aumento da expressão de MMP-2 no tecido periodontal de ratos com periodontite induzida por ligaduras que inalaram fumaça de cigarro.

Salvi *et al.* (2005) utilizaram o modelo da gengivite experimental em humanos para avaliar clínica e microbiologicamente às alterações gengivais em fumantes moderados e pesados por um período de 21 dias de acúmulo de placa. Não houve diferença entre os fumantes e os não fumantes quanto aos índices de placa e gengival durante a fase de abstinência de higiene oral. A eliminação completa do biofilme bacteriano resultou na resolução do processo inflamatório marginal e estabelecimento da saúde gengival tanto em fumantes quanto em não fumantes. Também não houve diferença estatisticamente significativa na composição do biofilme entre os fumantes e não fumantes em todos os períodos experimentais.

As pesquisas que se concentram nos efeitos da nicotina, principal componente psicoativo do tabaco, atribuem erroneamente os efeitos tóxicos do cigarro exclusivamente a este componente (Li *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 1997). Os cigarros contêm várias substâncias tóxicas, muitas das quais se apresentam diretamente letais para organismos vivos, como alcatrão, benzeno, benzopireno, monóxido de carbono, amônia,

dimetilnitrosamina, formaldeído, cianeto de hidrogênio, acrilaldeído, entre outras (Palmer *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos (Pfeifer & Irons, 1981; Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997) demonstraram claramente que os metabólitos do benzeno, e não o próprio benzeno são os principais responsáveis tanto pelos efeitos imunossupressivos quanto pelos efeitos mielotóxicos do cigarro. Apesar das evidências, pouco se sabe sobre os efeitos dos diversos metabólitos do benzeno em nível celular e molecular. A hidroquinona representa seu principal metabólito e está presente no cigarro em grandes quantidades como resultado da combustão das folhas do tabaco. Por esta razão, Li *et al.* (1996) avaliaram seus efeitos imunossupressivos sobre a proliferação *in vitro* de linfoblastos dependente de IL-2. A hidroquinona foi capaz de inibir a proliferação de linfoblastos IL-2-dependente sem afetar a sua viabilidade, sem bloquear a ligação dos receptores e com mínimo efeito sobre a produção de IL-2. Além da hidroquinona, a p-benzoquinona e o catecol foram posteriormente avaliados por Li *et al.* (1997). Tanto o catecol como a hidroquinona inibiram a proliferação de linfoblastos dependente de IL-2, com uma relação dose-dependente e sem afetar a produção de IL-2. A hidroquinona e o catecol tem sua ação preferencialmente através da inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e este efeito foi também observado, ainda que em menor extensão, em cultura de fibroblastos humanos sem afetar sua viabilidade. A p-benzoquinona também inibiu a proliferação de linfoblastos, porém não afetou a síntese de DNA. Seu mecanismo consistiu em inibição da síntese de IL-2. A hidroquinona age significativamente mais em linfócitos que nas células mielóides. Atribui-se a p-benzoquinona os efeitos inibitórios da produção de IL-1 e supressão da fagocitose.

Em estudo anterior (Pfeifer & Irons, 1981), a hidroquinona e a p-benzoquinona inibiram *in vitro* a síntese de IL-2, de mRNA, a produção de IFN- γ , e a mitogênese dos linfócitos. Li *et al.* (1996) atribuem esses resultados, em parte, à inibição da produção de IL-1 pelos monócitos, já que esta citocina estimula a secreção de IL-2. Como nos experimentos as culturas de linfoblastos eram puras, a produção de IL-2 era estimulada por uma combinação de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) e A23187, disponíveis comercialmente.

Curiosamente, Madretsma *et al.* (1996) pesquisaram os possíveis efeitos benéficos da nicotina no tratamento de colite ulcerativa. Esta se define como doença inflamatória crônica do intestino grosso, geralmente tratada com corticóides, antiinflamatórios ou imunossupressores. Para tanto, dosaram IL-2 e TNF- α secretadas em culturas de células mononucleares humanas estimuladas com tartarato de nicotina hidrogenado ou fosfato dissódico de prednisolona (glicocorticóide) por 24 horas. A nicotina foi capaz de inibir a secreção de IL-2 e TNF- α com aproximadamente 50% da potência do corticóide, e alcançou seu efeito máximo numa concentração semelhante àquela encontrada no plasma de fumantes.

Localmente há registro de aumento significativo de TNF- α no fluido gengival crevicular (FGC) em pacientes fumantes com periodontite moderada a severa comparada aos não fumantes, e redução nos níveis de IL-6, embora não significativa estatisticamente (Boström *et al.*, 1999). Adversamente, Erdemir *et al.* (2004) encontraram um aumento na secreção de IL-6 no FGC nos fumantes e redução da quantidade de TNF- α .

Um estudo com culturas celulares de monócitos/macrófagos obtidas de doadores saudáveis e estimuladas *in vitro* com extrato de tabaco sem fumaça encontrou supressão da secreção de IL-1 β dose-dependente, em resposta ao desafio com LPS bacteriano (Payne *et al.*, 1994). Outro estudo do mesmo grupo (Payne *et al.*, 1996), encontrou uma redução na secreção de IL-1 β em culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) estimuladas com concentrado de nicotina e LPS comparada à cultura estimulada apenas com LPS, porém sem significância estatística. Bernzweig *et al.* (1998) avaliaram a sequência dos efeitos da nicotina e do tabaco sobre células mononucleares gengivais (CMG) e CMSP. As células foram obtidas de seis pacientes com periodontite não fumantes. As ativações das culturas de CMSP com LPS apenas e com LPS associado ao tabaco sem fumaça ou nicotina resultaram em aumento da secreção de IL-1 β . A adição de nicotina ou tabaco sem fumaça não alterou significativamente a quantidade de citocina produzida. Nas culturas de CMG ativadas apenas com nicotina e com nicotina associada ao LPS houve redução na quantidade de IL-1 β secretada relativamente ao controle contendo apenas meio de cultura. A nicotina suprimiu a secreção de IL-1 β mediada por LPS.

As CMSP obtidas de doadores fumantes com saúde sistêmica e periodontal expostas *in vitro* à fumaça do cigarro apresentaram aumento crescente dos níveis de secreção de IL-1 β à medida que aumentava o tempo de exposição quando comparados com os doadores não fumantes. Ao contrário, as CMSP obtidas de doadores não fumantes expostos *in vitro* à fumaça do cigarro apresentaram níveis crescentes de secreção de TNF- α até dois minutos de exposição e então decrescente até cinco minutos de exposição, quando comparados com os doadores fumantes. Porém nenhuma dessas diferenças apresentou significância estatística (Ryder *et al.*, 2002). Posteriormente, Ryder *et al.* (2004) avaliaram a expressão gênica de células mononucleares do sangue de doadores saudáveis não fumantes expostas *in vitro* à fumaça do cigarro. De um modo geral, houve um aumento da expressão de genes relacionados aos efeitos destrutivos da inflamação como genes para IL-1 α , cicloxigenase-2 e fosfolipase A₂; e supressão de genes com efeitos regulatórios, tais como o gene para IFN- α , que inativa a síntese protéica. Apatzidou *et al.* (2005) relataram uma redução na resposta imune humoral (produção de anticorpos) e correlacionou com resultados clínicos significativamente menos favoráveis para fumantes.

Em camundongos, Kim *et al.* (2005) registraram uma redução na produção de IL-12, citocina que induz respostas tipo Th1, por macrófagos ativados com LPS na presença da hidroquinona. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que a inibição da síntese de IL-12 provavelmente deu-se em nível transcricional, pela coincidente supressão induzida pela hidroquinona da ligação de fator nuclear (NF)- κ B ao sítio κ B. O NF- κ B regula a expressão gênica ligando-se ao DNA e dando início à decodificação de enzimas inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e receptores.

Outros mecanismos imunes foram avaliados, como a secreção de IL-8 e TNF- α por neutrófilos periféricos (Fredriksson *et al.*, 2002). Os doadores saudáveis apresentam o mesmo padrão de secreção de IL-8 pelos neutrófilos, independentemente do hábito de fumar. Entre os pacientes com periodontite, a hábito de fumar reduziu de forma significativa a quantidade de IL-8 secretada. A produção de TNF- α dos fumantes superou a produção dos não fumantes, independentemente do seu *status* periodontal, sendo estatisticamente significativa apenas a diferença entre os pacientes com periodontite.

3 PROPOSIÇÃO

Observar o padrão de resposta inflamatória periodontal através da observação da influência do tabagismo sobre as citocinas IL-8, TNF- α , IL-6 e IL-10 produzidas por células mononucleares do sangue periférico provenientes de pacientes fumantes e não fumantes; saudáveis e com periodontite, estimuladas com LPS de *Escherichia coli*.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seleção dos doadores, exame clínico e coleta do sangue procederam-se nas dependências do Curso de Odontologia da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC, Salvador-BA). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Salvador-BA).

4.1 Amostra de doadores (obtenção das células mononucleares humanas)

As células (monócitos/macrófagos e linfócitos) foram obtidas de 20 doadores com boa saúde geral, entre 20 e 58 anos de idade. Os doadores referiram não ter feito uso crônico de drogas antiinflamatórias e não apresentar condições sistêmicas, como diabetes ou imunossupressão, que pudessem alterar a função das células mononucleares do sangue. Os doadores foram divididos em quatro grupos compostos por cinco indivíduos cada um, a saber: NFS (não fumantes com saúde periodontal); FS (fumantes com saúde periodontal); NFP (não fumantes com periodontite crônica); e FP (fumantes com periodontite crônica). Foram considerados fumantes aqueles cujo consumo de cigarros ultrapassava 20 cigarros por dia; o diagnóstico de periodontite crônica severa consistiu nos achados de mais de cinco sítios de com profundidade de sondagem ≥ 7 mm, com sangramento e sem tratamento periodontal prévio.

Os pacientes com periodontite foram selecionados a partir da lista de espera para iniciar o tratamento periodontal na FBDC. Os doadores saudáveis incluíram pesquisadores do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz e indivíduos pessoalmente contatados para participar da pesquisa, todos residentes na cidade de Salvador-BA.

4.2 Considerações éticas

Os doadores foram submetidos ao exame clínico (anamnésico e físico) por examinador único e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que autoriza o uso do sangue e de seus componentes para pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas em 19/09/2005 sob o protocolo de número 049/2005 (ANEXO).

4.3 Fase Laboratorial

4.3.1 Coleta do sangue periférico e separação das células

Inicialmente realizou-se antissepsia da fossa antecubital do antebraço, seguida de perfuração da veia braquial para retirada de 20 a 25mL de sangue em 4 ou 5 tubos de 5mL contendo heparina sódica como anticoagulante. A coleta era realizada em ambiente adequado, por um técnico treinado e com todo aparato necessário. O sangue contendo os leucócitos foi submetido à passagem em gradiente de Ficoll-Hipaque 1077, (densidade: 1,077g/mL Sigma, St. Louis, USA), em ambiente de fluxo laminar, para obtenção das CMSP. Após separação, as CMSP foram então lavadas três vezes com solução salina em centrifugação gradual (1500/1100/1000 rpm, 30 minutos). As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para concentração de 5×10^6 células/mL e ressuspensas em tubos de 15mL meio de cultura [RPMI 1640 R-0883 (Sigma), suplementado com HEPES Buffer 11203 (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/mL), estreptomicina (1%)] e citrato de sódio 3,8% pH 7.2 (proporção 9:1 v/v) para o plaqueamento.

4.3.2 Cultura de células

Imediatamente após a separação e contagem, as células foram distribuídas em placas de 24 poços na proporção estabelecida de 5×10^6 células (500µL/poço), para então

serem ativadas com LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma L-4391), na concentração única de 1.0ng/mL. Um poço serviu de controle não ativado. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 24 e 48 horas. Os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação, individualizados em tubos tipo eppendorf de 600µL e congelados a -20°C.

4.3.3 Dosagem de citocinas

As concentrações de IL-8, TNF- α e IL-6 em sobrenadantes de culturas após 24 horas de incubação, e as concentrações de IL-10 em sobrenadantes de culturas após 48 horas, foram determinadas por imunoensaio tipo *enzyme-linked* (ELISA) usando kits comerciais (BD PharMingen, San Diego, USA) em duplicata, seguindo o protocolo do fabricante. Recombinantes humanos de IL-8, TNF- α , IL-6 e IL-10 (BD PharMingen, San Diego, USA) foram usados para gerar curvas-padrão..

4.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SAS 0.1.3, Service Pack 2 (North Carolina, USA). A comparação das concentrações das citocinas dos sobrenadantes dos diversos grupos foi realizada através do teste paramétrico de Tukey, por terem as variáveis uma distribuição contínua. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Observações gerais

Os sobrenadantes das culturas de CMSP provenientes dos diferentes grupos foram utilizados para dosar a produção de citocinas, pela técnica de ELISA, 24 e 48 horas após a estimulação com LPS. Determinaram-se os valores médios para cada grupo e estes foram comparados estatisticamente (APÊNDICE).

Através da análise exploratória dos dados, detectou-se um ponto de discrepância no grupo NFS. A análise exploratória consistiu de teste de distribuição dos dados das variáveis, teste de homogeneidade da variância, teste para ponto discrepante e teste do tamanho da amostra através do sistema SAS. Constatou-se que a remoção do indivíduo que apresentou a discrepância não comprometeria a validade dos dados (dados não mostrados). A análise estatística foi realizada então com um indivíduo a menos no grupo NFS.

A dosagem das citocinas produzidas pelas células cultivadas sem ativação serviu como controle negativo, onde nada além do meio de cultura estava presente. Para os controles não ativados com LPS os resultados mostraram que as produções de IL-6, IL-8 e IL-10 por CMSP provenientes de doadores dos diversos grupos foram próximas a zero e não puderam ser detectada pelo teste ELISA. No entanto, a dosagem de TNF- α , sofreu aumento detectável, porém mínimo, nas culturas dos pacientes do grupo FP (183,2 pg/mL) quando comparados aos demais grupos ($p \leq 0,05$) que produziram quantidades não detectáveis pelo ELISA (dados não mostrados).

5.2 Secreção de IL-8 (ELISA)

Procedeu-se análise do padrão de secreção de IL-8 pelas células mononucleares do sangue periférico (Figura 1). Entre os doadores saudáveis (grupos NFS e FS) não houve diferença estatística no padrão de secreção de IL-8 para fumantes

e não fumantes ($p>0,05$). Da mesma forma, comparando-se os fumantes e os não fumantes com periodontite crônica severa (grupos NFP e FP), não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes na secreção de IL-8 ($p>0,05$).

Entre os pacientes fumantes mostrou-se estatisticamente significativa ($p\leq0,05$) a redução da secreção de IL-8 dos pacientes do grupo FP (portadores de periodontite crônica severa) quando comparado ao padrão de secreção do grupo FS (saudáveis).

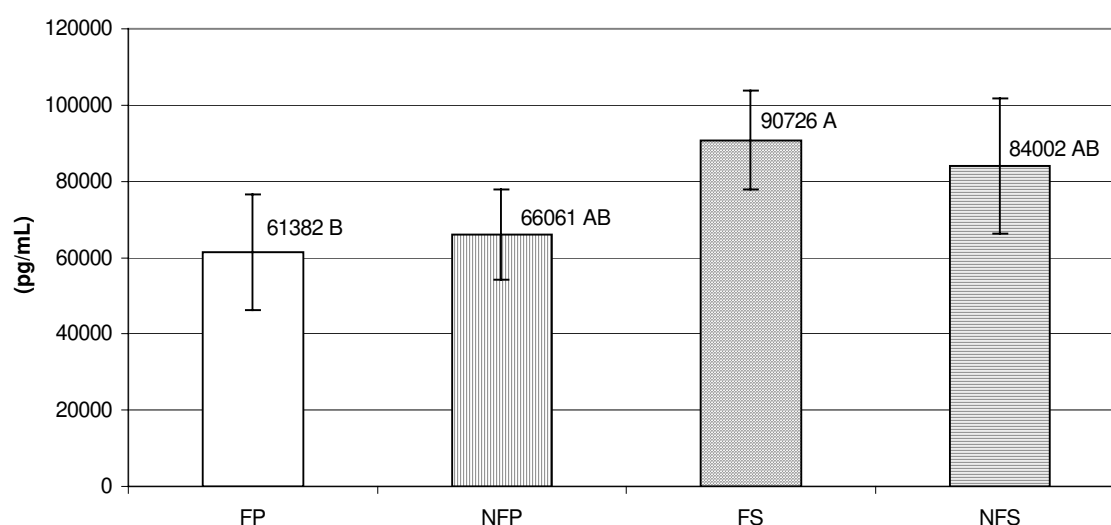


Figura 1 – Secreção de IL-8 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p\leq0,05$)

5.3 Secreção de TNF- α (ELISA)

Procedeu-se análise do padrão de secreção de TNF- α pelas células mononucleares do sangue periférico (Figura 2). As células provenientes de pacientes com periodontite (grupo NFP) produziram TNF- α numa magnitude significativamente maior ($p\leq0,05$), comparada ao padrão de secreção dos demais grupos.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os doadores saudáveis (grupos NFS e FS). Quando o hábito de fumar está associado à periodontite crônica severa (grupo FP), os doadores apresentaram uma redução da secreção de TNF- α em relação aos pacientes não fumantes (NFP). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$).

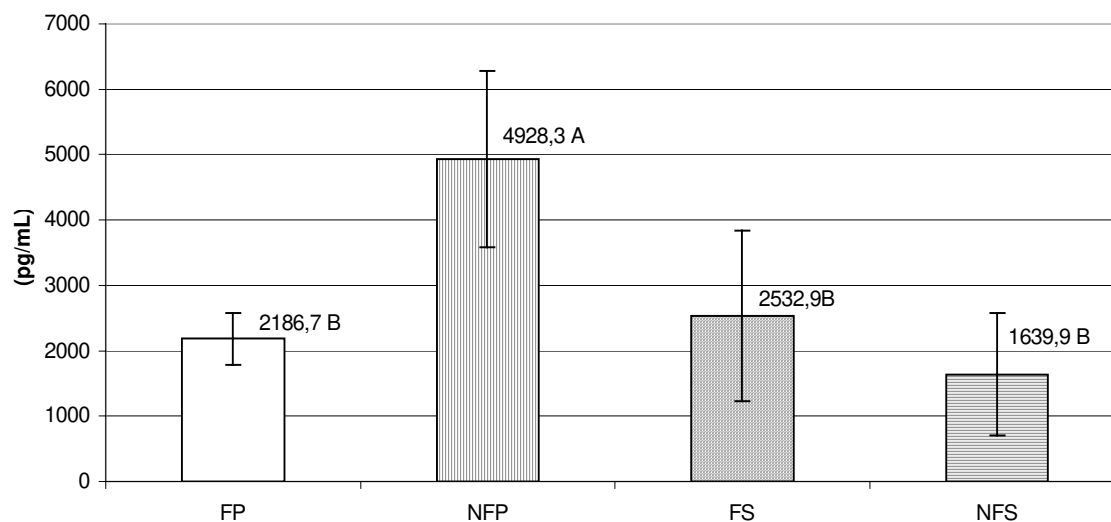


Figura 2 – Secreção de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p\leq 0,05$)

5.4 Secreção de IL-6 (ELISA)

Procedeu-se análise do padrão de secreção de IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico (Figura 3). A comparação entre os doadores saudáveis (grupos NFS e FS) não revelou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). Da mesma forma, não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes na quantificação da secreção dos pacientes com periodontite crônica (grupos FP e NFP) ($p>0,05$).

Entre os doadores não fumantes (NFS e NFP) o grupo com periodontite crônica severa produziu significativamente mais IL-6 que os doadores saudáveis ($p \leq 0,05$).

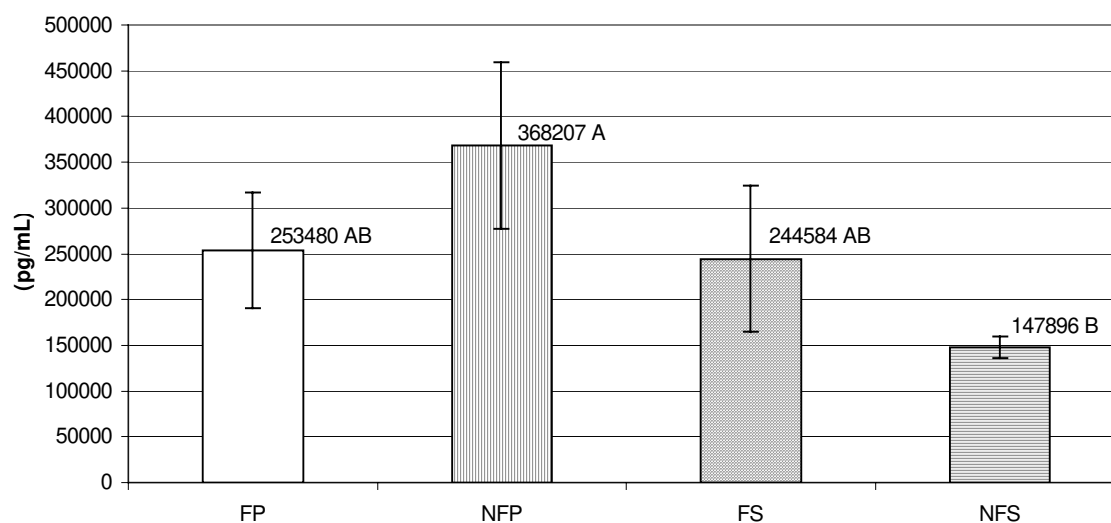


Figura 3 – Secreção de IL-6 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

5.5 Secreção de IL-10 (ELISA)

Procedeu-se análise do padrão de secreção de IL-10 pelas células mononucleares do sangue periférico (Figura 4). Não foi possível detectar diferenças estatisticamente dignificantes entre os grupos ($p > 0,05$).

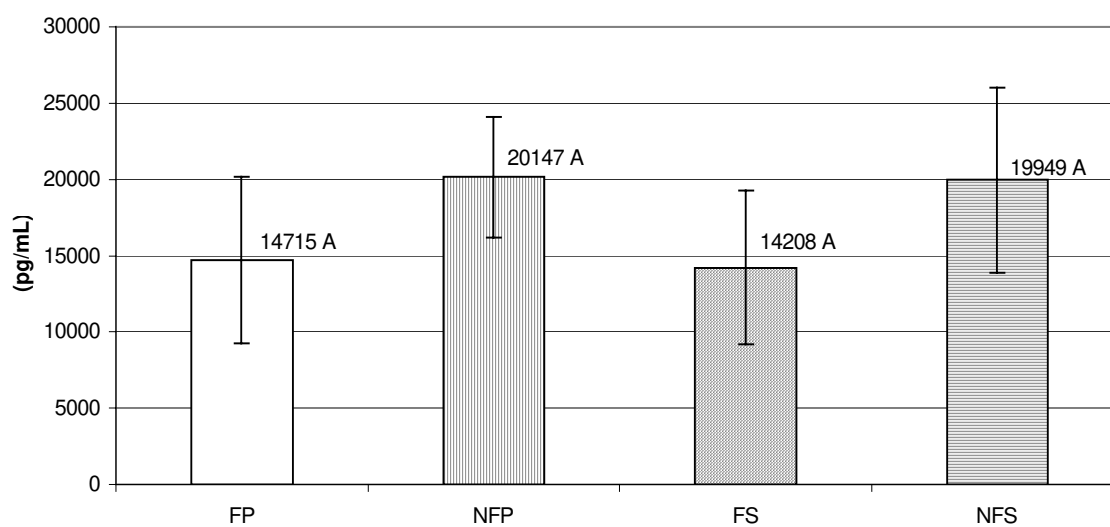


Figura 4 – Secreção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 48 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo observou uma tendência interessante à supressão da resposta das células mononucleares do sangue periférico de pacientes fumantes com doença periodontal desafiadas *in vitro* por LPS. Houve uma redução da expressão, mesmo que discreta, de IL-6, IL-8 e IL-10; e uma redução significativa da expressão de TNF- α nas culturas celulares dos fumantes com periodontite. O contrário ocorreu nas culturas do sangue de doadores saudáveis, nos quais a expressão de IL-6, IL-8 e TNF- α parecem mais acentuadas nos doadores fumantes, ainda que esta tendência não apresente significância estatística. Exceto para a IL-10, que permaneceu com menor expressão nos fumantes saudáveis (Figuras 1 a 4).

A análise estatística pelo sistema SAS assegurou a validade dos dados, porém o aumento do número de doadores seria interessante para verificar a confirmação das tendências. O que de fato limitou o aumento da amostra no presente estudo foram os doadores do grupo FS, extremamente difíceis de localizar. Grossi *et al.* (1994) realizaram um levantamento epidemiológico objetivando apontar os indicadores de risco para o desenvolvimento das formas severas de periodontite. Numa amostra de 1426 pessoas obtida através de censo e anúncios em jornais locais, não foi possível encontrar fumantes saudáveis. O presente estudo contou com cinco fumantes saudáveis.

Outro fator limitante, além do n foi a forma de obtenção dessas células. Como as células utilizadas foram provenientes de sangue periférico, a confirmação dos dados através uma avaliação local da expressão gênica do tecido gengival e/ou de granulação pode ser importante. Sabe-se que a célula no local da injúria pode expressar receptores e secretar proteínas diversas ou em quantidade diferente. Portanto, para estudos futuros, seria válida a utilização de técnicas mais sensíveis como *Western Blot*, imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase em tempo real.

No presente estudo, não houve diferenças entre os pacientes saudáveis e portadores de periodontite crônica severa no que se refere à secreção de IL-8 na ausência do tabagismo. Porém, a inserção do fator de risco determinou uma redução significativa

de IL-8 na periodontite crônica severa instalada. Hirose *et al.* (2001) avaliaram a expressão gênica de diversas citocinas em doadores saudáveis e com periodontite e não houve diferenças significativas da expressão de mRNA IL-8 em pacientes com periodontite. Fredriksson *et al.* (2002) avaliaram a secreção de IL-8 por neutrófilos, os doadores saudáveis apresentaram o mesmo padrão de secreção de IL-8, independente do hábito de fumar. No experimento de Fredriksson *et al.* (2002), nos pacientes com periodontite o hábito de fumar reduziu significativamente a secreção de IL-8. Destes dois estudos juntos pode inferir-se a imunocompetência referente ao recrutamento de neutrófilos frente a estímulos como LPS bacteriano independentemente da periodontite crônica e, ainda, uma interferência negativa do fumo neste fenômeno. No presente estudo a produção de IL-8 esteve reduzida em fumantes com periodontite frente ao estímulo das CMSP com LPS (Figura 1), indicando talvez uma alteração de recrutamento dessas células. Porém devido às limitações desse estudo, fica difícil a confirmação desta hipótese.

A ativação das células Th1 resulta na secreção de TNF- α , entre outras citocinas pró-inflamatórias (Seymour & Gemmel, 2001; Kim *et al.*, 2005). No presente estudo, os pacientes não fumantes com periodontite apresentaram um aumento significativo da produção de TNF- α em comparação com os demais grupos (Figura 2). Por outro lado, os doadores periodontais fumantes apresentaram um padrão que sugere um estado de imunossupressão pela redução significativa da secreção de TNF- α . Relata-se freqüentemente na literatura a associação entre os mecanismos destrutivos da resposta imune e o aumento da secreção de TNF- α , como liberação de NO, aumento na expressão de MMPs e outras enzimas proteolíticas extracelulares como collagenase, indução à apoptose de fibroblastos e ativação de osteoclastos (Hirose *et al.*, 2001; Brennan *et al.*, 2003; Erdemir *et al.*, 2004; DeFranco *et al.*, 2006). Hirose *et al.* (2001), registraram o aumento da expressão de mRNA de TNF- α em cultura celular de tecido gengival de não fumantes, e aumento significativo da expressão da enzima NOS em pacientes com periodontite. Este achado estaria de acordo com os resultados do presente estudo.

Vale ressaltar que a expressão reduzida de TNF- α nos doadores fumantes com periodontite corrobora com os achados de Pfeifer & Irons (1981), Li *et al.* (1996), Madrestma *et al.* (1996) e Li *et al.* (1997). Nesses experimentos, os metabólitos do benzeno induziram a redução da expressão de IL-2, citocina que estimula a proliferação e maturação de linfoblastos e diferenciação em linfócitos Th1 com conseqüente secreção de TNF- α (Yamamoto *et al.*, 1997; DeFranco *et al.*, 2006). Madrestma *et al.* (1996) relatou que a potência do efeito da nicotina sobre a inibição da secreção de IL-2 e TNF- α corresponde a 50% da potência de um corticoesteróide.

O traçado de um paralelo entre a secreção de citocinas pro-inflamatórias indutoras de processos osteolíticos revela que há coerência entre os achados do presente estudo e de estudos que avaliaram a secreção de IL-1 β . Os experimentos de Payne *et al.* (1994) e Payne *et al.* (1996) resultaram na inibição da secreção de IL-1 β quando as culturas de células mononucleares ativadas com LPS eram tratadas com extrato de tabaco e nicotina, respectivamente. Igualmente, Bernzweig *et al.* (1998) encontraram um efeito similar sobre as células mononucleares gengivais. Entretanto, Ryder *et al.* (2002) verificaram o aumento da secreção de IL-1 β quando expôs as placas de cultura de CMSP proveniente de fumantes à fumaça do cigarro por cinco minutos. A comparação da secreção de IL-1 β da cultura proveniente de fumantes e não fumantes no *baseline* revelaram aumento significativo da expressão da citocina nas culturas provenientes de fumantes. A avaliação da expressão de TNF- α demonstrou redução da expressão dessa citocina por células provenientes de fumantes em comparação com não fumantes, o que estaria de acordo com o experimento realizado neste estudo.

No estudo de Cesar-Neto *et al.* (2004), em modelo de periodontite induzida em ratos, a inalação da fumaça do cigarro repercutiu em aumento da expressão de MMP-2, enzima ligada à destruição da matriz óssea. Ryder *et al.* (2004) constataram aumento da expressão de genes associados com respostas destrutivas, tais como IL-1 α , cicloxigenase-2 e fosfolipase A₂; e supressão de genes com efeitos regulatórios. Estes dados podem levar à hipótese de que haveria outros mecanismos patogênicos ligados à ativação celular osteolítica em fumantes, já que a expressão de TNF- α parece reduzida,

enquanto os efeitos relacionados às respostas destrutivas parecem presentes. Itazawa *et al.* (2003) verificaram que a habilidade reduzida de produzir IL-12, que induz respostas Th1, proporciona o desenvolvimento de respostas Th2 aberrantes nos processos alérgicos. As limitações deste estudo não permitem a confirmação desta hipótese.

As citocinas secretadas pelas células Th2 induzem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e produção de imunoglobulinas. Este mecanismo caracteriza-se pela ação direta sobre as bactérias e pela opsonização³ dos patógenos com conseqüente aumento da efetividade das células fagocíticas (Barbour *et al.*, 1997; Erdemir *et al.*, 2004). O estudo histológico em cães realizado por Lindhe & Rylander (1975) revelou que em lesões gengivais com mais de 28 dias o infiltrado inflamatório contava com a predominância de plasmócitos. A IL-6 produzida por linfócitos e plasmócitos adicionalmente estimula a proliferação de linfócitos T e pode induzir a reabsorção óssea (Gemmell & Seymour, 1993). No presente estudo, a inflamação periodontal por si só pareceu elevar os níveis de IL-6 em cultura de CMSP provenientes de pacientes não fumantes (Figura 3). Entretanto, na presença do tabagismo, a quantidade de IL-6 secretada não apresentou diferenças significativas.

Por outro lado, a avaliação da expressão gênica realizada por Hirose *et al.* (2001), no qual houve aumento estatisticamente significativo da expressão de mRNA de IL-6 pelas células mononucleares de culturas de tecidos gengivais obtidos de pacientes com periodontite relativamente à células obtidas de tecido gengival sadio, corrobora com a hipótese que a IL-6 está envolvida na sinalização de processos osteolíticos. Gemmell & Seymour (1993) também avaliaram a secreção de IL-6 de CMSP e CMG. Em sua metodologia, as CMSP obtidas de pacientes saudáveis consistiram do controle; e as CMG obtidas de pacientes com periodontite crônica durante procedimentos de cirurgia periodontal representaram o grupo teste. Não foram encontradas diferenças significativas. Também Boström *et al.* (1999) e Erdemir *et al.* (2004) compararam os padrões de secreção de fumantes e não fumantes com periodontite através da dosagem de citocinas no FGC e não verificaram diferenças significativas.

³ Marcação de antígenos para fagocitose

O efeito negativo da IL-6 sobre o metabolismo ósseo pode conferir um padrão destrutivo da resposta imune (Barbour *et al.*, 1997; Gemmell & Seymour, 2001). Logo, a secreção elevada de IL-6 nos pacientes com periodontite crônica poderia alterar a sinalização dos mecanismos destrutivos do periodonto, justificando talvez a supressão da sua expressão em fumantes devido a ativação de outros mecanismos imunes não avaliados no presente estudo.

Quanto à secreção de IL-10, a diferença entre os pacientes com periodontite e saudáveis foi mínima e não estatisticamente significativa, tanto para os fumantes quanto para os não fumantes (Figura 4). Porém, Hirose *et al.* (2001) avaliaram a expressão de mRNA de IL-10 de culturas de CMG de doadores saudáveis e com periodontite e encontram tendência ao aumento (não significante) da expressão de IL-10 em culturas de gengiva provenientes de doadores saudáveis. No presente estudo, a imunocompetência poderia estar relacionada à ausência do hábito de fumar. O padrão de secreção semelhante entre as culturas de CMSP provenientes de doadores saudáveis e com periodontite sugere que a IL-10 não parece estar ligada aos mecanismos destrutivos da resposta imune sobre o periodonto dos fumantes.

Logo, os dados obtidos do presente estudo experimental levam a crer que pode haver plausibilidade biológica na relação entre a secreção de citocinas e o hábito de fumar em pacientes periodontais. Porém, mais estudos seriam necessários avaliando-se mais citocinas num número maior de pacientes.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que:

- O tabagismo reduz a secreção de TNF- α produzida por células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de periodontite crônica severa;
- O tabagismo não interferiu na secreção de IL-8, IL-6 e IL-10;
- A periodontite crônica severa aumenta a secreção de TNF- α e IL-6 na ausência de fatores de risco associados.

REFERÊNCIAS*

1. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000*. 2002; 29: 7-10.
2. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol*. 2000; 71(12): 1874-1881.
3. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(9): 973-983.
4. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 297-305.
5. Baljoon M, Natto S, Berström J. Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(7): 789-797.
6. Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB, Tangada S, Hahn CL, Schenkein HA *et al*. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(4): 437-460.
7. Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*. 1994; 65(5 Suppl): 545-550.
8. Bergström J. Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long-term observations and a hypothesis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(4): 260-266.
9. Bergström J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(1): 81-88.
10. Bernzweig E, Payne JB, Reinhardt RA, Dayer JK, Patil KD. Nicotine and smokeless tobacco effects on gingival and peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(3): 246-252.

* De acordo com a norma da Unicamp/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1999; 26(6): 352-357.
12. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral disease. *Arch Oral Biol*. 2003; 48(2): 93-100.
13. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res*. 2006; 41(2): 118-123.
14. Cesar-Neto JB, de Souza AP, Barbiere D, Moreno H Jr, Sallum EA, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol*. 2004; 75(7): 995-1000.
15. DeFranco A, Howard J, Janeway C, Littman D, Marrack P, Mitchison NA *et al*. Sistema Imune Adaptativo. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Biologia Molecular da Célula*. 2.ed. São Paulo: Artmed; 2006. p.1363-1421.
16. Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau, RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol 2000*. 2004; 35:53-74.
17. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(2): 99-104.
18. Fagerholm S, Varis M, Stefanidakis M, Hilden TJ, Gahmberg CG. α -chain phosphorylation of the human leucocyte CD11b/CD18 (Mac-1) integrin is pivotal for integrin activation to bind ICAMs and leukocyte extravasation in vivo. *Blood*. 2006; 108(10) 3379-3386.
19. Fredriksson M, Bergström K, Åsman B. IL-8 and TNF- α from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis. Effect of cigarette smoking: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(2): 123-128.

20. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA *et al.* Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest.* 1998; 78(6): 755-762.
21. Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodont Res.* 1993; 28(2): 122-129.
22. Gesser B, Deleuran B, Lund M, Vestergaard C, Lohse N, Deleuran M *et al.* Interleukin-8 induces its own production in T lymphocytes – a process regulated by interleukin-10. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 210(3): 660-669.
23. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74(3): 391-401.
24. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65(3): 260-267.
25. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol.* 2001; 72(5): 590-597.
26. Itazawa T, Adachi Y, Okabe Y, Hamamichi M, Adachi YS, Toyoda M *et al.* Developmental changes in interleukin-12 producing ability by monocytes and their relevance to allergic disease. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33(4): 525-530.
27. Kim E, Kang BY, Kim TS. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor- κ B binding activity. *Immunol Lett.* 2005; 99(1): 24-29.
28. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl.6): 130-131.
29. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3): 356-365.

30. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol.* 2001; 59: 154-160.
31. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 54-63.
32. Kucharzik T, Lügering N, Pauels H-G, Domschke W, Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1998; 111(1): 152-157.
33. Lerner UH. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(4): 481-493.
34. Li Q, Aubrey MT, Christian T, Freed BM. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundam Appl Toxicol.* 1997; 38(2): 158-165.
35. Li Q, Geiselhart L, Mittler JN, Mudzinski SP, Lawrence DA, Freed BM. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139(2): 317-323.
36. Lindeboom JA, Mathra KR, Harkisoen S, van der Akker HP, Ince C. Effect of smoking on the gingival capillary density: assessment of gingival capillary density with orthogonal polarization spectral imaging. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(12): 1208-1212.
37. Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *J Dent Res.* 1975; 83(6): 314-326.
38. Loe H, Ånerud Å, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986; 13(5): 431-445.
39. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177-187.
40. Madretsma GS, Donze GJ, van Dijk APM, Tak CJAM, Wilson JHP, Zijlstra FJ. Nicotine inhibits the in vitro production of interleukin 2 and tumour necrosis factor- α by human mononuclear cells. *Immunopharmacology.* 1996; 35(1): 47-51.

41. Moszczyński P, Żabiński Z, Moszczyński P Jr, Rutowski J, Słowiński S, Tabarowski Z. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett.* 2001; 118(3): 121-127.
42. Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane, DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontal Res.* 1992; 27(6): 623-630.
43. Natto S, Baljoon M, Bergström J. Tobacco smoking and periodontal bone height in a Saudi Arabian population. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(9): 1000-1006.
44. Neely AL, Holford TR, Loe H, Ånerud Å, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man. Risk factors for progression of attachment loss in individuals receiving no oral health care. *J Periodontol.* 2001; 72(8): 1006-1015.
45. Neely AL, Holford TR, Loe H, Ånerud Å, Boysen H. The natural history of periodontal disease in humans: risk factors for tooth loss in caries-free subjects receiving no oral health care. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(9): 984-993.
46. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MAN, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontol Res.* 2001; 36(6): 361-366.
47. Nogueira-Filho GR, Froes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR, Sallum EA, Nociti FH Jr, Sallum AW. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol.* 2004; 75(3): 348-352.
48. Numm M. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000.* 2003; 32: 11-23.
49. Palmer RM. Should quit smoking interventions be the first part of initial periodontal therapy? *J Clin Periodontol.* 2005; 32(8): 867-868.
50. Paulander J, Wennström JL, Axelsson P, Lindhe J. Some risk factors for periodontal bone loss in 50-year-old individuals. A 10-year cohort study. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(7): 489-496.

51. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE₂ and IL-1 β release by LPS-treated human monocytes. *J Periodont Res.* 1996; 31(2): 99-104.
52. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Maze CR, Dyer JK, Patil KD. Smokeless tobacco effects on monocyte secretion of PGE₂ e IL-1 β . *J Periodontol.* 1994; 65(10): 937-941.
53. Pfeifer RW, Irons RD. Inhibition of lectin-stimulated lymphocyte agglutination and mitogenesis by hydroquinone: reactivity with intracellular sulphydryl groups. *Exp Mol Pathol.* 1981; 35(2): 189-198.
54. Preshaw PM, Heasman L, Stacey F, Steen N, McCracken GI, Heasman PA. The effect of quitting smoking on chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(8): 869-879.
55. Research, Science and Therapy Committee of The American Academy of Periodontology. Position Paper: tobacco use and the periodontal patient. *J Periodontol.* 1999, 70(11): 1419-1427.
56. Ryder MI, Hyun W, Loomer P, Haqq C. Alteration of gene expression profiles of peripheral mononuclear blood cells by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(1): 39-49.
57. Ryder MI, Saghizadeh M, Ding Y, Nguyen N, Soskolne A. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β from peripheral blood mononuclear cells. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(6): 331-336.
58. Salvi GE, Ramseier CA, Kandylaki M, Sigrist L, Awedowa E, Lang NP. Experimental gingivitis in cigarette smokers – A clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(5): 441-447.
59. Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Periodont Res.* 2004; 39(6): 432-441.
60. Schenkein HA. Host response in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 77-93.

61. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001; 59(3): 167-173.
62. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134-144.
63. Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T. Calprotectin expression in human monocytes: induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *J Periodontol.* 2005; 76(3): 437-442.
64. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar J. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(11): 951-958.
65. Teng YA. Protective and destructive immunity in periodontium: part 1- innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res.* 2006a; 85(3): 198-208.
66. Teng YA. Protective and destructive immunity in periodontium: part 2- T-cell-mediated Immunity in the periodontium. *J Dent Res.* 2006b; 85(3): 209-219.
67. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol.* 1998; 69(10): 1139-1147.
68. Vestergaard C, Gesser B, Lohse N, Jensen SL, Sindet-Pedersen S, Therstrup-Pedersen *et al.* Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1) has an autoinductive effect in monocytes, a process regulated by IL-10. *J Dermatol Sci.* 1997; 15(1): 14-22.
69. Warren CW, Jones NR, Eriksen MP, Asma S. Patterns of global tobacco use in young people and implications for future chronic disease burden in adults. *Lancet North Am Ed.* 2006; 367(9512): 749-53.
70. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophil. *N Engl J Med.* 1989; 320(6): 365-376.
71. World Health Organization. *World Health Statistics 2006.* Geneva: WHO Press; 2006.

72. 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(1 Pt 2): 115-119.
73. Yilmaz Ö, Verbeke P, Lamont R, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 2006; 74(1): 703-710.

APÊNDICE

Tabela 1 - Média (pg/mL) e desvio padrão (DP) da secreção de IL-8 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

DOADOR	GRUPOS			
	FP	NFP	FS	NFS
1	79887,30	60019,00	89799,65	-
2	51979,40	64549,40	75653,45	89329,60
3	70970,35	55718,75	111066,70	63297,10
4	41685,05	86349,70	91768,70	105093,70
5	62386,55	63667,05	85342,30	78288,90
MÉDIA	61381,73	66060,78	90726,16	84002,33
DP	15097,77	11865,02	12960,09	17650,08

Tabela 2 - Média (pg/mL) e desvio padrão (DP) da secreção de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

DOADOR	GRUPOS			
	FP	NFP	FS	NFS
1	2143,33	5252,28	1732,49	-
2	1692,87	2884,81	1697,33	1524,88
3	2387,46	4741,23	1458,74	2973,94
4	1978,15	6650,65	3311,46	1241,57
5	2731,70	5112,44	4464,28	819,37
MÉDIA	2186,70	4928,28	2532,86	1639,94
DP	395,78	1352,42	1306,62	935,38

Tabela 3 - Média (pg/mL) e desvio padrão (DP) da secreção de IL-6 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 24 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

DOADOR	GRUPOS			
	FP	NFP	FS	NFS
1	214664,00	465865,70	132328,20	-
2	204487,20	250136,40	197140,00	134125,40
3	361763,40	296374,90	290027,30	144391,90
4	243256,60	430207,30	269048,90	163286,80
5	243228,60	398452,80	334374,10	149778,20
MÉDIA	253479,96 AB	368207,42 A	244583,70 AB	147895,58 B
DP	62932,27	91373,66	79965,91	12142,59

Tabela 4 - Média (pg/mL) e desvio padrão (DP) da secreção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS de *E. coli* após 48 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significantes (Teste de Tukey; $p \leq 0,05$)

DOADOR	GRUPOS			
	FP	NFP	FS	NFS
1	20178,86	25499,35	19382,52	-
2	10862,57	16032,89	8994,32	23721,67
3	20756,75	22960,62	10253,01	18138,24
4	8829,89	18205,55	19697,44	12204,28
5	12945,48	18037,66	12710,89	25730,39
MÉDIA	14714,71 A	20147,21 A	14207,64 A	19948,65 A
DP	5453,52	3927,74	5049,14	6080,49

ANEXO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Discriminação fenotípica da periodontite crônica em pacientes fumantes através da identificação da secreção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos**", protocolo nº **049/2005**, dos pesquisadores **THAIS OLIVEIRA GONÇALVES, FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR, GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO e MÁRCIO ZAFFALLON CASATI**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 19/09/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Phenotypic discrimination of chronic periodontitis in smokers through the identification of inflammatory cytokines secretion by human monocytes**", register number **049/2005**, of **THAIS OLIVEIRA GONÇALVES, FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JUNIOR, GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO and MÁRCIO ZAFFALLON CASATI**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 19/09/2005.


Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.