



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**PERFIL MICROBIOLÓGICO, CELULAR E DE
IMUNOGLOBULINA DA SALIVA DE ADULTOS COM
PERIODONTITE CRÔNICA.**

PRISCILLA FARIAS NAIFF - 209302

Orientadora: Prof^ª. Doutora Maria Cristina dos Santos

Co-orientadora: Prof^ª. Doutora Patrícia Puccinelli Orlandi

MANAUS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

PRISCILLA FARIAS NAIFF - 209302

**PERFIL MICROBIOLÓGICO, CELULAR E DE
IMUNOGLOBULINA DA SALIVA DE ADULTOS COM
PERIODONTITE CRÔNICA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amazonas como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA: 28 DE JUNHO DE 2012.

Prof^a. Doutora Maria do Carmo Machado Guimarães
Membro externo – Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Doutora Luciana Leomil
Membro interno – Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Doutora Maria Cristina dos Santos
Orientadora - Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

DEDICATÓRIA

Aos Meus Pais:

Roberto Daibes Naiff e Maricleide de Farias Naiff

Pelo amor e exemplo de vida que alicerçaram e motivaram cada passo de minhas conquistas.

Ao Meu Marido:

Marco Antônio Nobre Salum

Pelo companheirismo, amor e dedicação que sustentam e inspiram a cada dia a realização de nossos sonhos.

Aos Meus Irmãos:

Roberto Daibes Naiff Júnior e Rogério Farias Naiff:

Que sempre acreditaram, confiaram e torceram por mim.

Ao Meu "Filhote":

Kid:

Pelo amor incondicional e alegria que me proporciona desde que entrou em minha vida.

Amo Vocês.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por abençoar e iluminar meu caminho;

À minha orientadora, *Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina dos Santos*, pela confiança, pelo acolhimento, amizade e auxílio em todos os momentos. Pelo exemplo de seriedade, de humildade e pelos ensinamentos que motivaram o meu crescimento profissional e execução deste trabalho;

À minha co-orientadora, *Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Puccinelli Orlandi*, pela oportunidade e pelos exemplos de competência e dedicação, além da participação consistente, ensinamentos e estímulo na pesquisa;

Ao *Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos* pelos ensinamentos, receptividade e grande colaboração na realização dos ensaios de citometria de fluxo;

Aos *Profs. Dr. Benedito Taveira e Dr. Marcelo Diniz de Carvalho*, por terem aberto as portas do Curso de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas, para coleta das amostras;

Aos amigos *Carolinie Nobre, Raquel Ferraz, Clarissa Cunha, Neide Soares, Edilene Martins, Juliana Lameiras, João Paulo Pimentel, Walter Luiz e Allyson Guimarães* pelo convívio agradável, ensinamentos e por não medirem esforços ao me auxiliarem durante os experimentos;

Aos **pacientes**, que participaram da pesquisa e submeteram-se com seriedade e amizade ao estudo que lhes foi proposto;

Aos **colegas de Pós-Graduação** pela amizade e por tornarem a jornada mais agradável;

Aos **professores da Pós-Graduação** pelos ensinamentos;

Aos secretários da Pós-Graduação *Ricardo e Meg* pela atenção dedicada.

À **coordenação da Pós-Graduação** pela orientação e auxílio dispensados sempre que necessários;

À minha segunda família ***Graça Maria Nobre, Autamine Salum, Ana Carla Nina Salum, Omar Antônio Salum, Ana Salum, Omar Salum Júnior, Christiane Salum e Omar Salum Neto*** pelo carinho e por torcerem por mim;

A todos os meus familiares e demais amigos, que sempre torceram pelo meu sucesso e, de uma forma ou de outra, colaboraram para o meu crescimento.

RESUMO

Pelo fato da periodontite ser uma doença inflamatória e infecciosa, a resposta imune pode resultar em uma mudança na população leucocitária presente na saliva, quando comparada a resposta de indivíduos periodontalmente saudáveis. Até o presente, a imunofenotipagem por citometria de fluxo não havia sido utilizada para investigar padrões imunológicos em amostras de saliva provenientes de indivíduos com processos bucais inflamatórios. O objetivo do presente estudo foi avaliar, pela técnica de citometria de fluxo, a frequência de linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer* bem como a frequência da população de leucócitos na saliva de indivíduos com ou sem periodontite crônica. Paralelamente, foram determinados, por Dot-ELISA, os títulos das imunoglobulinas totais das classes A, G e M presentes na saliva destes indivíduos, além da detecção de sete patógenos periodontais, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* e *Prevotella nigrecens*, pela PCR. Pela técnica de imunofenotipagem foi observado que os pacientes com periodontite crônica apresentaram maior frequência de leucócitos - $p=0,0007$ ($50,43\% \pm 5,1$) e de linfócitos B - $p=0,0059$ ($50,93\% \pm 6,1$) em relação aos indivíduos sem doenças bucais ($22,69\% \pm 0,19$ e $13,9\% \pm 2,6$, respectivamente). Um aumento não significativo nos títulos de IgG também foi observado nos indivíduos com periodontite crônica, além de maior frequência de patógenos periodontais. Estes resultados demonstram que a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta eficaz para determinação do perfil leucocitário, proveniente de amostras de saliva de pacientes com periodontite crônica e indivíduos periodontalmente saudáveis.

Palavras chave: Diagnóstico; Periodontite; Microbiologia; Caracterização celular.

ABSTRACT

Because periodontitis is an infectious and inflammatory oral disease, the immune response may cause the leukocyte population in saliva of individuals with this condition to be different from that of periodontally healthy individuals. To date, flow cytometric immunophenotyping has not been used to investigate immune patterns in saliva samples from individuals with inflammatory processes in the oral cavity. The objective of this study was to use flow cytometry technique to evaluate the frequency of T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells and the total leukocyte population in the saliva of individuals with or without chronic periodontitis. In parallel, total IgA, IgG and IgM titers in saliva were determined by Dot-ELISA besides the detection of seven periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* and *Prevotella nigrecens*, by PCR. Cell immunophenotyping revealed that patients with chronic periodontitis had a higher frequency of total leukocytes - $p=0.0007$ ($50.43\% \pm 5.1$) and B lymphocytes - $p=0.0059$ ($50.93\% \pm 6.1$) than individuals without oral diseases ($22.69\% \pm 0.19$ and $13.9\% \pm 2.6$, respectively). A non-significant increase in IgG titers was also observed in subjects with chronic periodontitis and a higher frequency of periodontal pathogens. These results show that flow cytometry could be an effective tool for determining leukocyte profiles in saliva samples from patients with chronic periodontitis and from periodontally healthy subjects.

Key words: Diagnosis; Periodontitis; Microbiology; Cellular characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Anatomia do periodonto clinicamente saudável	13
Figura 2	Periodontite	14
Figura 3	Periodontite crônica oriunda de acúmulo de biofilme periodontopatogênico	16
Figura 4	Etiologia da periodontite	17
Figura 5	Patogênese da doença periodontal. Estágios iniciais	18
Figura 6	Patogênese da doença periodontal. Estágios tardios	19
Figura 7	Técnica de sondagem de bolsa periodontal	21
Figura 8	Exame radiográfico	22
Figura 9	Complexos microbianos periodontais	26
Figura 10	Resumo dos procedimentos realizados na pesquisa.*Dados preliminares..	43
Figura 11	Compensação de cores	49
Figura 12	Protocolo de análise utilizado para avaliar a distribuição (%) de leucócitos totais, linfócitos B, linfócitos T, Células NK	50
Figura 13	Controle positivo da PCR	54
Figura 14	Frequência de patógenos periodontais em indivíduos com periodontite crônica (teste) e indivíduos saudáveis (controle)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas da população de estudo	57
Tabela 2	Frequência e distribuição dos patógenos periodontais isolados ou associados nas amostras de saliva nos grupos teste e controle	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos utilizados no protocolo citofluorimétrico e a respectiva marcação fenotípica	47
Quadro 2	Sequência dos iniciadores específicos utilizados na PCR	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl₂	Cloreto de cálcio
CD	<i>Cluster of differentiation</i> – Grupo de diferenciação
CD1a⁺	Células dendríticas imaturas
CD14	Receptor para o complexo LPS + LPB
CD83⁺	Célula apresentadora de antígeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FCG	Fluido crevicular gengival
FcR	Receptor de região Fc de imunoglobulina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Unidade gravitacional
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFA	Imunofluorescência
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IG	Índice gengival
IL	Interleucina
LPB	Proteína de ligação de lipopolissacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mAB	Anticorpo monoclonal
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MD2	Proteína de superfície celular que se associa ao TLR-4
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases de matriz
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear- κ B
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato salina
PBS_{AZ}	PBS com azida sódica
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação de Polimerase em Cadeia
PGE₂	Prostaglandina-E ₂
pH	Potencial hidrogênio
pmol	Picomol
PMSF	Fluoreto de metil-fenil-sulfonila

RANKL	Receptor ativador de NFκB ligante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Dodecil Sulfato de Sódio
Taq DNA pol	Enzima DNA polimerase extraída do <u>Termophilus aquaticus</u>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> – tampão tris salina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tampão de Tris-HCl e EDTA
TEB	Tampão de Tris HCl, EDTA e ácido bórico
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	Células T auxiliares
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 Diagnóstico da Doença Periodontal.....	20
1.2 Micro-organismos Associados à Periodontite.....	24
1.3 Imunologia da Periodontite Crônica	29
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Geral	39
3.2 Específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Modelo de Estudo	40
4.2. Universo do Estudo	41
4.2.1 Amostragem	41
4.2.2 Critérios de Inclusão	42
4.2.3 Critérios de Exclusão	42
4.3 Procedimentos	43
4.3.1 Anamnese, exame clínico e radiográfico	43
4.3.2 Coleta de saliva	44
4.3.3 Coleta de biofilme subgingival	45
4.3.4 Avaliação do Fluxo Salivar	45
4.3.5 Quantificação de Imunoglobulinas	45
4.3.6 Perfil Celular	46
4.3.7 Detecção de micro-organismos	51
5. RESULTADOS	57
5.1. Dados Clínicos	57
5.2 Microrganismos presentes na saliva	58
6. DISCUSSÃO	61
7. ARTIGO ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	88
ANEXOS	106

1. REVISÃO DE LITERATURA

O periodonto constitui os tecidos de suporte e proteção dos dentes (mucosa alveolar, gengiva, epitélio juncional, inserção conjuntiva, osso alveolar, ligamento periodontal e cemento) (Fig.1) e sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeito a alterações morfológicas relacionadas a modificações funcionais e no meio bucal (LINDHE et al., 2005).

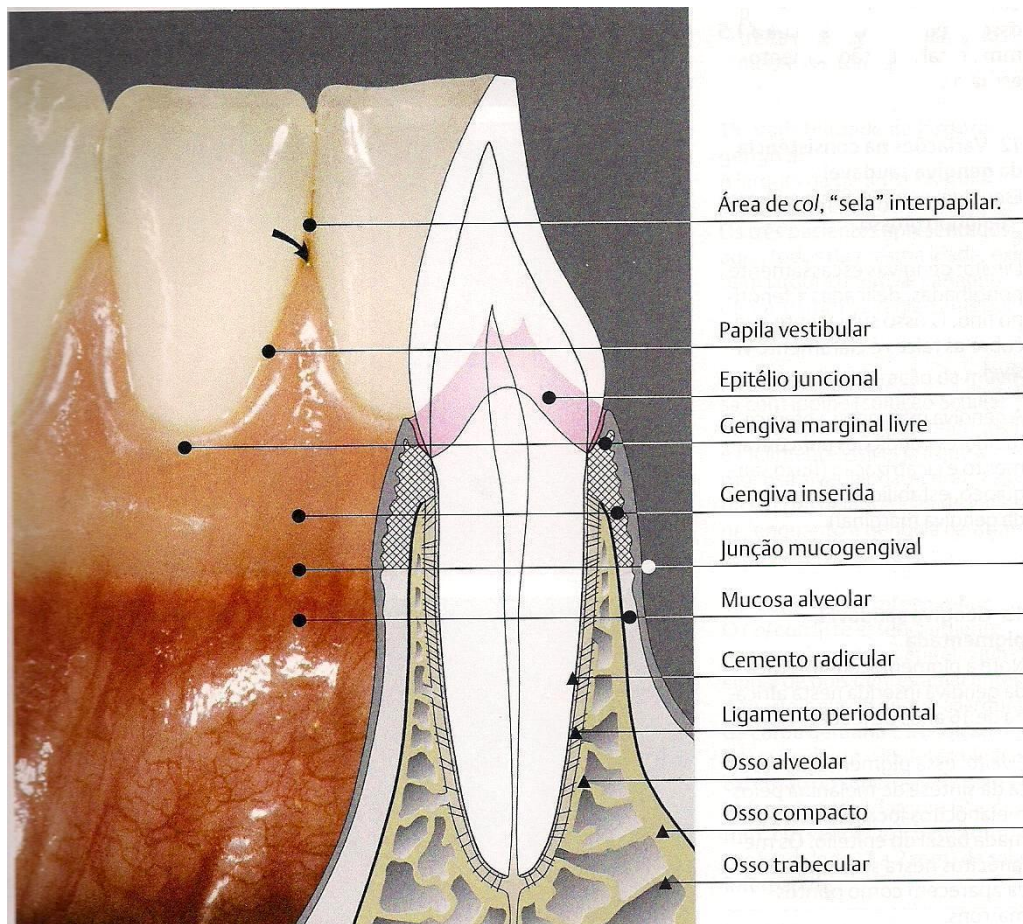


Figura 1. Anatomia do periodonto clinicamente saudável.

Fonte: WOLF; HASSELL, 2008.

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos de sustentação dos dentes (Fig.2,3). É causada por diversos micro-organismos e leva à destruição do osso alveolar,

ligamento periodontal e cemento, ocasionando mobilidade dentária e, frequentemente, perda dentária (CARRANZA et al., 2004; LINDHE et al., 2005).

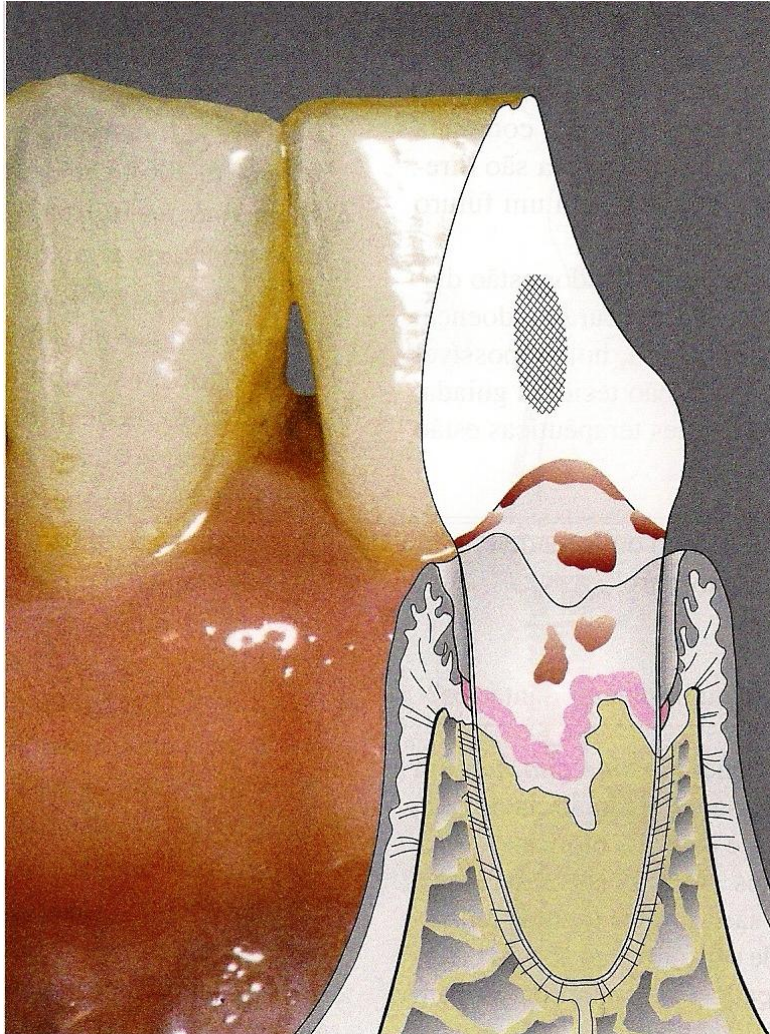


Figura 2. Periodontite.
Fonte: WOLF;HASSELL, 2008.

Existe uma discrepância significativa na prevalência de periodontite entre populações jovens, adultas e idosas de diferentes regiões geográficas. Indivíduos africanos apresentam maior prevalência de periodontite, seguidos pelos hispânicos e asiáticos. A relação entre estado periodontal e características sócio econômicas também pode ser observada, sendo a doença mais grave em populações mais pobres, sem acesso a tratamento periodontal adequado. A susceptibilidade à doença periodontal nestas populações parece, ainda, ser

agravada pela presença de fatores de risco biológicos que aumentam a predisposição à doença (ALBANDAR; RAMS, 2002 APUD SILVA, 2007).

Pela utilização dos critérios de gravidade da doença periodontal estabelecidos pelo Workshop Internacional de 1999, a prevalência estimada para periodontite grave variou entre 6%, no Canadá, em indivíduos ≥ 19 anos (BROTHWELL; GHIABI, 2009), 19%, na França, em indivíduos ≥ 35 anos (BOURGEOIS et al., 2007), 43% (DALLA VECCHIA et al., 2005), 50% em indivíduos com idade ≥ 30 anos e 92%, em indivíduos ≥ 70 anos, no Brasil (SUSIN et al., 2004) e aproximadamente 19% em indivíduos com idades entre 35 a 44 anos, em outro estudo também realizado no Brasil recentemente (BRASIL, 2010). Estes dados indicam que, em comparação ao Canadá e França, no Brasil, há prevalência similar ou mesmo maior de periodontite generalizada grave, apesar de que os números referentes ao estudo publicado em 2004, não representam a população total de brasileiros. Além disso, em relação às diferentes prevalências encontradas nos dois estudos realizados no Brasil, vale ressaltar que as pesquisas epidemiológicas sobre doenças periodontais ainda encontram grandes obstáculos – os critérios não uniformes ou subjetivos para classificação da doença além da variabilidade de definições do fenótipo de periodontite.

A periodontite crônica é a forma mais comum de periodontite. Esta doença tem início após gengivite, durante ou logo após a puberdade em indivíduos suscetíveis, mas sinais, como a reabsorção óssea aparente com formação de bolsa periodontal e perda de inserção clínica só são observados em longo prazo. Embora a periodontite crônica tenha início e continuidade pelo acúmulo de biofilme subgengival compatível com o grau de destruição tecidual (Fig.3), mecanismos de defesa do hospedeiro, hábitos, fatores sistêmicos e sociais (Fig.4) exercem papel fundamental na patogenia e susceptibilidade à doença (LINDHE et al., 2005). O curso de progressão da periodontite crônica é lento a moderado, no entanto períodos de destruição mais rápidos podem ser observados, especialmente quando a periodontite for modificada por

fatores locais, sistêmicos e/ou ambientais. A periodontite crônica é mais prevalente em adultos, especialmente naqueles acima de 30 anos de idade, contudo pode ser observada em crianças também. A doença pode ocorrer localizada ou generalizadamente, quando menos ou mais de 30% das áreas avaliadas demonstram perda óssea ou de inserção, respectivamente. A periodontite crônica, ainda, pode ser descrita como leve, moderada ou grave, dependendo da perda de inserção existente. Perdas de inserção clínica de 1 a 2 mm são classificadas como periodontite crônica leve, perdas de inserção de 3 a 4 mm como periodontite crônica moderada e perda de inserção maior ou igual a 5 mm como periodontite crônica grave (CARRANZA et al., 2004).



Figura 3. Periodontite crônica oriunda de acúmulo de biofilme periodontopatogênico.
Fonte: WOLF; HASSELL, 2008.

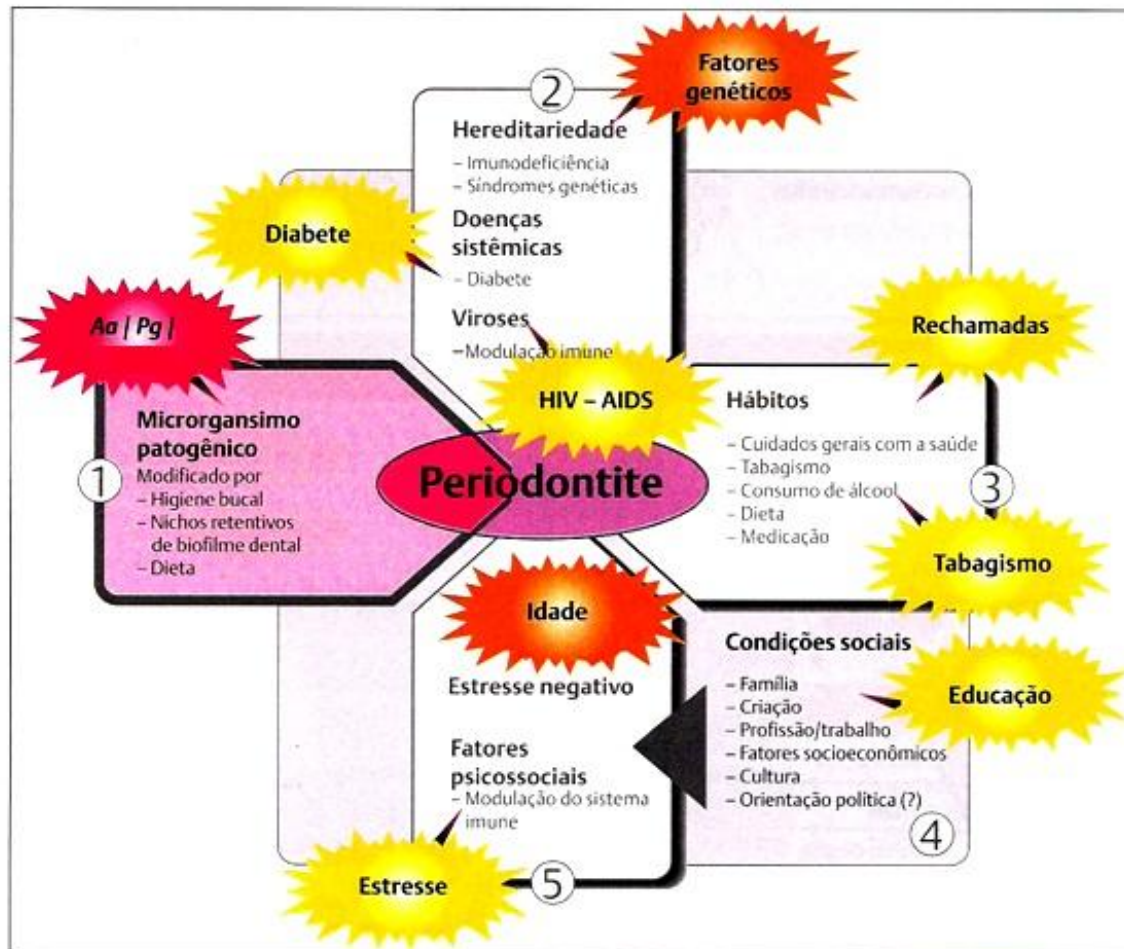


Figura 4. Etiologia da periodontite.

Fonte: WOLF; HASSELL, 2008.

A resposta imunológica primária, na periodontite crônica, ocorre após a colonização do sulco gengival por patógenos periodontais. Os periodontopatógenos estimulam, dentre outros mediadores inflamatórios, a produção de citocinas e quimiocinas pelo epitélio gengival, que resulta na expressão de moléculas de adesão, aumento na permeabilidade dos capilares gengivais e quimiotaxia para neutrófilos, do epitélio juncional para o sulco gengival. Esta resposta inicial, com a produção de citocinas e quimiocinas específicas, promove a migração de um infiltrado inflamatório composto por células T perivasculares e macrófagos no tecido conjuntivo (Fig.5) (FORD et al., 2010).

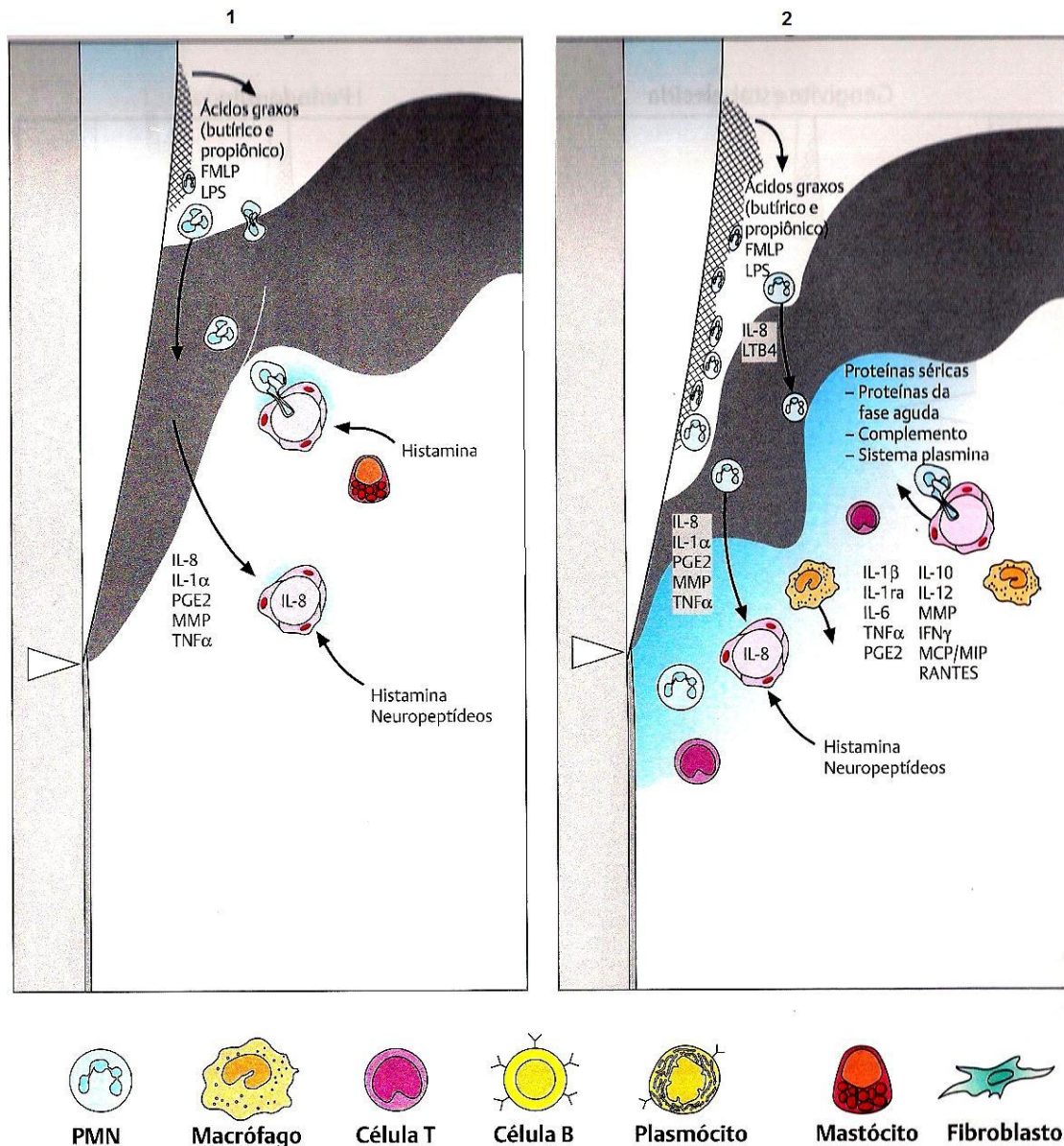


Figura 5. Patogênese da doença periodontal. Estágios iniciais.
Fonte: WOLF; HASSELL, 2008.

Caso a resposta imunológica celular não consiga controlar a infecção, ocorre o recrutamento de células B que se diferenciam em plasmócitos (Fig.6). Os plasmócitos produzem anticorpos que podem conferir proteção aos tecidos periodontais, controlando o processo infeccioso, ou ainda, ocasionar efeitos deletérios, destruindo o tecido conjuntivo e promovendo reabsorção do osso alveolar. A efetividade dessa resposta varia entre indivíduos e demonstra importância na determinação da susceptibilidade à doença (FORD et al., 2010).

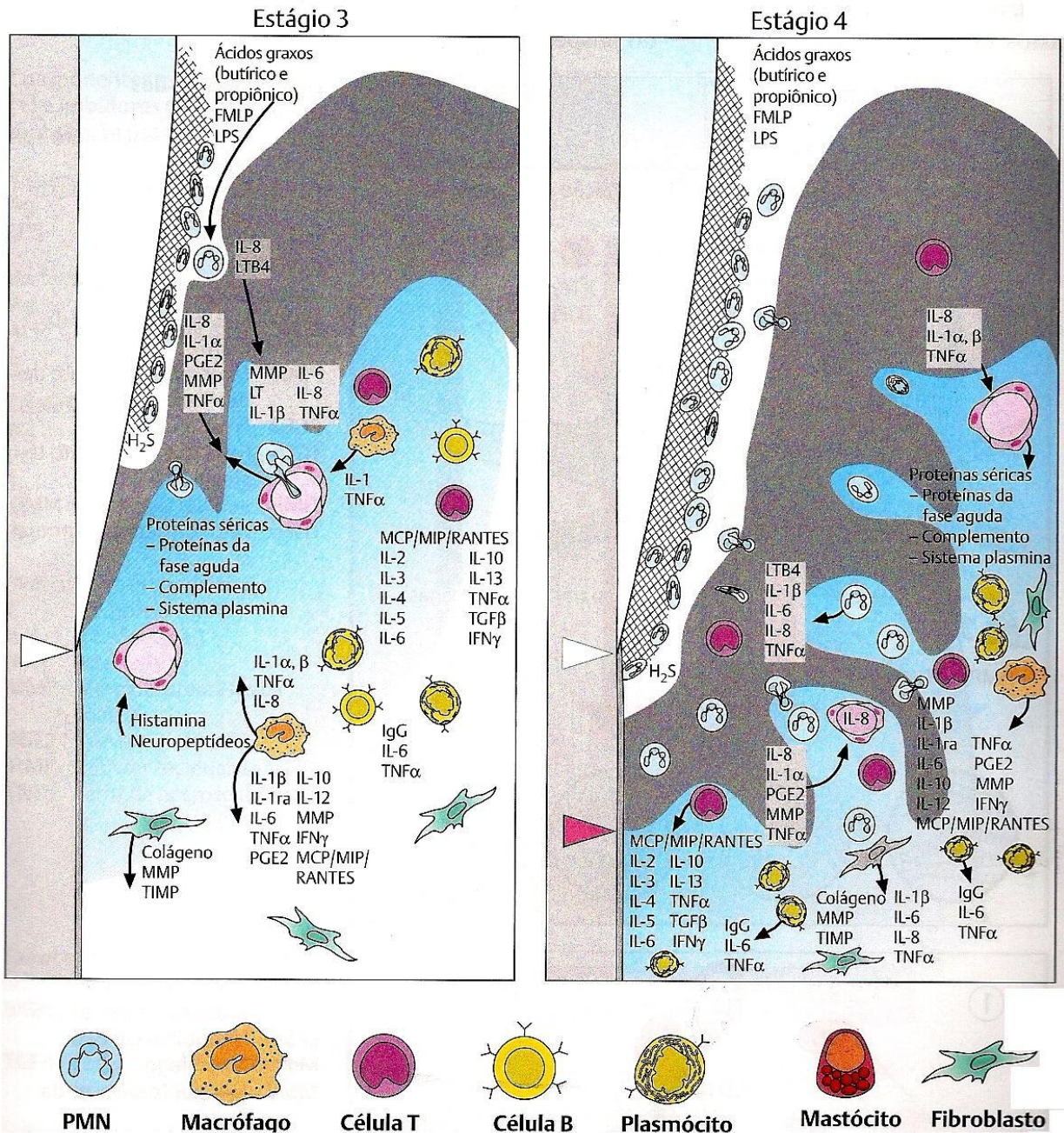


Figura 6. Patogênese da doença periodontal. Estágios tardios.
Fonte: WOLF; HASSELL, 2008.

O sistema imunológico inato reconhece os micro-organismos invasores por meio de receptores de reconhecimento de padrões associados aos patógenos, por exemplo, os receptores semelhantes ao Toll (TLR). Dentre os 10 TLR humanos identificados, o TLR-2 e TLR-4 foram os mais estudados (FORD et al., 2010). Segundo Lien e colaboradores (1999), o TLR-2 tem maior afinidade por componentes celulares bacterianos como peptidoglicano e lipoproteínas, já o TLR-4 juntamente com as proteínas de superfície celular CD14 e MD-2, reconhecem especificamente o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular das bactérias Gram-negativas (YOSHIMURA et al., 2002). Os componentes da parede celular

bacteriano estimulam (via TLR-2 e 4) a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α pelo hospedeiro. Estas citocinas induzem a reabsorção óssea e a produção de metaloproteinases da matriz (MMP). Em tecidos com infecção periodontal crônica, são detectados ambos TLR-2 e TLR-4, enquanto, em tecidos periodontalmente saudáveis há apenas baixa expressão de TLR-2 (REN et al., 2005). Atualmente, está bem estabelecida a relação entre a progressão da doença periodontal crônica e diversos fatores, como: a presença do patógeno periodontal, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, MMP e PGE₂, além de baixos níveis de citocinas inibitórias do processo inflamatório (IL-10 e TGF- β) e inibidores teciduais das MMP (TIMP). A susceptibilidade e extensão da destruição tissular parecem ser determinadas pelo complexo equilíbrio das citocinas produzidas pela presença de inúmeras associações entre micro-organismos periodontais (FORD et al., 2010).

1.1 Diagnóstico da Doença Periodontal

Métodos tradicionais de diagnóstico das doenças periodontais incluem a avaliação de parâmetros clínicos e radiográficos. Embora de relevante importância, estes parâmetros apenas permitem uma perspectiva histórica da doença. A utilização de fluidos bucais para o diagnóstico laboratorial da doença permite o estabelecimento de um prognóstico mais fidedigno, além do monitoramento do tratamento e serve como um indicador de risco ao desenvolvimento da periodontite. Pela análise da saliva e do fluido gengival pode ser verificada a presença de leucócitos, de mediadores inflamatórios oriundos da resposta do hospedeiro, bem como, de marcadores específicos da reabsorção óssea (NÓBREGA, 2008).

1.1.1 Diagnóstico Clínico

Anteriormente a qualquer terapia, a história atual da doença, história de doenças sistêmicas e dados clínicos devem ser coletados para servir de base para o diagnóstico e

prognóstico preliminar. O registro dos achados clássicos é de grande importância. O diagnóstico de periodontite deve ser feito pela técnica de sondagem de bolsa periodontal (Fig.7) para se verificar a profundidade de sondagem clínica, que avalia a presença ativa da doença. Pela utilização de uma sonda periodontal mede-se a distância entre a base do sulco gengival/ bolsa periodontal e a margem gengival. Caso essa distância seja maior que três milímetros (que é o aceitável para a profundidade clínica normal do sulco) temos o indicativo de bolsa periodontal, cuja presença está diretamente associada à doença periodontal (CARRANZA et al., 2004; LINDHE et al., 2005; WOLF; HASSELL, 2008).

Outro parâmetro a ser avaliado é o nível de inserção clínica. Este mede a distância entre a base do sulco e a junção amelocementária. Mudanças no nível de inserção demonstram a extensão e gravidade de destruição periodontal prévia e não a atividade atual da doença. Além destes dados, deve-se averiguar o sangramento gengival (para avaliação do estado de inflamação gengival), recessão gengival, mobilidade dentária e a presença de halitose (LINDHE et al., 2005).



Figura 7. Técnica de sondagem de bolsa periodontal.

Fonte: CARRANZA ET AL., 2004.

1.1.2 Diagnóstico Radiográfico

O exame radiográfico é complementar ao exame clínico periodontal (Fig.8). Auxilia no diagnóstico de doenças periodontais, além de contribuir na determinação do prognóstico e

na avaliação do resultado do tratamento. As radiografias revelam alterações no tecido calcificado após 30% da massa da crista óssea alveolar ter sido reabsorvida. Não revelam alterações nas atividades celulares atuais, mas mostram os efeitos retrógrados ocorridos no osso e raízes (CARRANZA et al., 2004).



Figura 8. Exame radiográfico.
Fonte: CARRANZA ET AL., 2004.

1.1.3 Análise Microbiológica

Os testes microbiológicos complementam o diagnóstico de diversos tipos de doenças periodontais. Servem como indicadores do início e progressão da doença e determinam os sítios periodontais que possuem maior risco de destruição ativa.

Pela utilização da saliva pode ser analisado o perfil microbiológico das doenças periodontais, verificando-se a ocorrência de periodontopatógenos, por meio de técnicas de diagnóstico (por exemplo, cultura, ensaios imunobiológicos e testes biomoleculares), visto que esta representa o veículo de transmissão desses micro-organismos (SHIMADA et al., 2008).

1.1.3.1 Cultura Bacteriana

Dentre as técnicas utilizadas temos a cultura bacteriana, cuja principal vantagem é de se obter contagens relativas e absolutas das espécies cultivadas. Entretanto, este método é capaz de cultivar apenas bactérias viáveis. Além do mais, alguns patógenos periodontais como *Treponema* sp. e *Tannerella forsythia* são frágeis e difíceis de cultivar. A sensibilidade desse método é relativamente baixa, uma vez que os limites de detecção para os meios seletivos e não seletivos têm em média 10^3 a 10^4 bactérias; consequentemente pequenos números de patógenos específicos da bolsa periodontal podem não ser detectados. Uma vantagem da cultura é a possibilidade de realização de um antibiograma para testar a sensibilidade de um microrganismo a um fármaco específico (CARRANZA et al., 2004; WOLF; HASSELL, 2008).

1.1.3.2 Imunodiagnóstico

Os ensaios imunobiológicos envolvem o uso de anticorpos específicos que reconhecem antígenos bacterianos (geralmente fímbrias, carboidratos e proteínas). Esta reação pode ser revelada utilizando-se uma variedade de procedimentos, tais como ensaios microscópicos de imunofluorescência - IFA (direta e indireta), citometria de fluxo, ensaio de imunoabsorção acoplado à enzima (ELISA), ensaio de membrana e aglutinação de látex (CARRANZA et al., 2004; WOLF; HASSELL, 2008).

Ensaio imunológico para bactérias bucais podem ocasionar reações cruzadas levando à detecção de falso-positivos, principalmente quando anticorpos policlonais são utilizados, contudo, o uso de anticorpos monoclonais pode causar ocorrência de falso-negativos quando comparados à cultura, devido à sua alta especificidade. A maioria desses ensaios fornece uma estimativa quantitativa ou semi quantitativa de micro-organismos. Entretanto, estes métodos

geralmente demonstram limites inferiores de detecção de patógenos quando comparados à reação em cadeia da polimerase (PCR) (CARRANZA et al., 2004).

1.1.3.3 Testes Biomoleculares

Testes como sonda de hibridização de DNA, PCR, testes com sondas bacterianas (IAI PadoTest), testes com sondas de DNA e RNA – (IAI Pado Test 4.5) têm sido utilizados. Estes testes podem rapidamente detectar a presença de múltiplas bactérias. As sondas são capazes de detectar quantidades ínfimas de células bacterianas (10^2 a 10^4), além de possuírem alta sensibilidade e especificidade (CARRANZA et al., 2004).

1.2 Micro-organismos Associados à Periodontite

Apesar de termos uma definição dos principais micro-organismos desencadeadores desta doença, não é incomum observamos mudanças no perfil microbiológico da doença em determinadas regiões geográficas. De acordo com Wolf e Hassell (2008) as bactérias que geralmente estão associadas à doença periodontal são, em sua maioria, gram-negativas anaeróbias estritas ou facultativas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominadas *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (previamente denominadas *Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra* (anteriormente denominadas *Peptostreptococcus micros*), *Treponema denticola*, *Selenomonas sputigena*, *Eubacterium* sp., e algumas espécies de espiroquetas.

Socransky e colaboradores (1998), empregando sondas de rDNA 16S, agruparam algumas espécies bacterianas em complexos de acordo com sua relação com a doença periodontal (Fig.9). Os autores demonstraram a existência de associações entre as espécies bacterianas estudadas, as quais foram agrupadas da seguinte forma: complexo vermelho,

composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*; complexo laranja, composto por subespécies de *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*; complexo verde, formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*), *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por espécies de *Streptococcus* sp. (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e complexo roxo, composto de *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Espécies como *Selenomonas noxia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b e *Actinomyces naeslundii* genospécie 2 não formaram complexos com outras espécies microbianas. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, a existência de relações entre os complexos, de forma que, por exemplo, o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho. Relações existentes entre certos complexos e aspectos clínicos da doença periodontal, também foram observadas.

Os parâmetros de profundidade à sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja. A sequência de colonização por estes complexos pode determinar o surgimento de gengivite. A colonização inicial parece envolver membros dos complexos: amarelo, verde e púrpura. Isto conduz à sucessão autogênica na qual os membros dos complexos laranja e vermelho se tornam dominantes. O aumento na proporção destes micro-organismos, hipoteticamente, induz mudanças ambientais que levam à manifestação clínica de gengivite (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

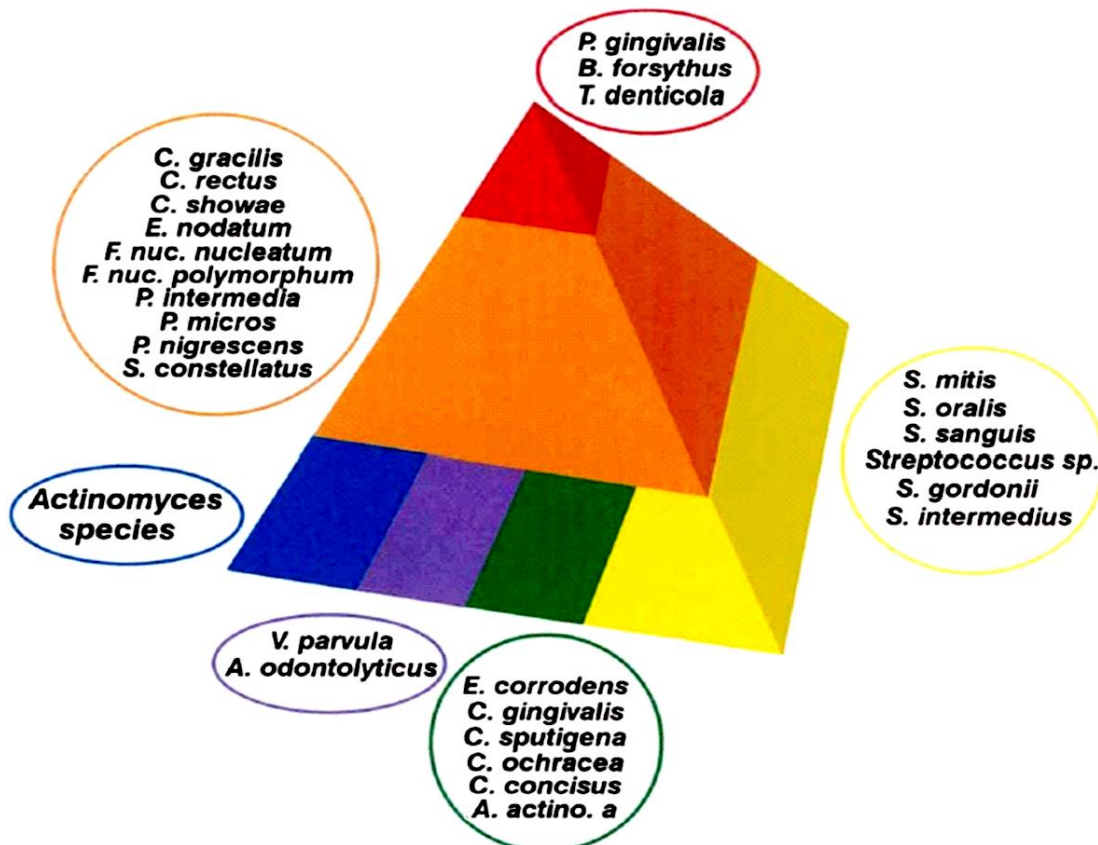


Figura 9. Complexos microbianos periodontais.
Fonte: SOCRANSKY et al., 1998.

Patógenos periodontais como *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Leptotrichia buccalis* e *Selenomonas noxia* também são encontrados em grandes quantidades, proporções e prevalências, além dos patógenos associados ao complexo vermelho, na doença periodontal crônica em comparação com indivíduos saudáveis. A maioria dessas espécies pode ser considerada como possíveis patógenos periodontais e têm sido previamente associadas com a etiologia da doença periodontal (CHOI et al., 2000; SANZ et al., 2000; DAROUT et al., 2003; HAFFAJEE et al., 2004; LOPEZ et al., 2004; GAJARDO et al., 2005; VAN WINKELHOFF et al., 2005). Alguns trabalhos (DIBART et al., 1998; SOCRANSKY et al., 1998; TANNER et al., 1998; SOCRANSKY, HAFFAJEE, 2005) têm referenciado sobre a participação da *Selenomonas*

noxia na etiologia da periodontite crônica. *Campylobacter rectus* e *Parvimonas micra* foram encontradas em altas proporções em suecos (HAFFAJEE et al., 2004) e a *Prevotella nigrescens*, em chilenos (LOPEZ et al., 2004), com periodontite crônica. Além disso, *Eubacterium nodatum* foi associada com periodontite crônica em norte-americanos com baixos níveis e proporções de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (HAFAJEE et al., 2006). Também é importante enfatizar que as proporções de todas as espécies consideradas benéficas nos complexos roxo, amarelo e verde e as espécies de *Actinomyces* sp. encontraram-se reduzidas no grupo com periodontite crônica em comparação ao grupo com periodonto saudável. Esse perfil de colonização foi descrito também para outras populações (SOCRANSKY et al., 1998; COLOMBO et al., 2002; LOPEZ et al., 2004; HAFFAJEE et al., 2006; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006a,b).

Em relação à periodontite agressiva, no estudo de Luba (2006), as espécies encontradas em altas proporções e prevalência em indivíduos com periodontite agressiva generalizada quando comparados a indivíduos saudáveis foram *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum* e *Prevotella nigrescens*. *Veillonella parvula* e *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum* também foram predominantes nas amostras de biofilme subgingival, em indivíduos com doença agressiva. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tem sido apontado como um importante agente etiológico da periodontite agressiva localizada em brasileiros (TINOCO et al., 1997; CORTELLI et al., 2005) e em outras populações (ZAMBON et al., 1983; TAN et al., 2001; LEE et al., 2003). No estudo de Luba (2006), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi uma das espécies encontradas em níveis reduzidos, tendo colonizado apenas 5,2% dos sítios e representando somente 4,7% das espécies avaliadas em indivíduos com doença agressiva. Bragd e colaboradores (1987) e Rams colaboradores (1997) sugeriram que a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresenta uma alta patogenicidade e, portanto, mesmo níveis baixos

dessa espécie poderiam ser danosos ao periodonto. Estes achados ratificam aqueles encontrados em outros estudos que reportaram baixas contagens, prevalência e proporções dessa espécie em indivíduos com periodontite agressiva (RAMS et al., 1997; LOPEZ et al., 2000; TAKEUCHI et al., 2003; KAMMA et al., 2004; GAJARDO et al., 2005). Em 2002, Mombelli e colaboradores fizeram uma revisão sistemática onde avaliaram 33 estudos que forneciam dados microbiológicos tanto de indivíduos portadores de periodontite agressiva como de periodontite crônica. Os autores concluíram que a presença ou não dos patógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter rectus* não poderiam servir como forma de distinção entre indivíduos com periodontite crônica ou agressiva, corroborando com o estudo de Luba (2006), no qual foi demonstrado que a microbiota subgengival de indivíduos brasileiros com periodontite crônica é semelhante a dos indivíduos com periodontite agressiva generalizada, porém difere marcadamente da observada em indivíduos periodontalmente saudáveis.

A associação de micro-organismos específicos com as diversas formas de periodontite permitiu e incentivou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico baseados na detecção de uma ou mais espécies de bactérias, ou de alterações em sua proporção no biofilme (BRETZ; LOESCHE, 1987; LOESCHE et al., 1990). As pesquisas em Periodontia voltaram-se então para determinação de quais os micro-organismos, dentre as mais de 700 espécies bacterianas presentes na cavidade bucal (KAZOR et al., 2003), seriam os responsáveis pelo desenvolvimento da doença periodontal.

A identificação dos micro-organismos periodontopatogênicos é extremamente relevante, pois precede a adoção de medidas eficazes na prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças periodontais. A associação do biofilme subgengival às modificações imunocelulares nos tecidos periodontais pode contribuir para a caracterização mais precisa dos diversos tipos de periodontite e, no estudo proposto, da periodontite crônica.



IMUNOLOGIA DA PERIODONTITE CRÔNICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA¹

Recebido em 23/04/2012, aceito em 20/06/2012

Priscilla Farias Naiff², Patrícia Puccinelli Orlandi³ e Maria Cristina dos Santos⁴

Resumo

A periodontite é uma doença infecciosa e inflamatória que acomete os tecidos de proteção e suporte dos dentes. Origina-se de inflamação gengival e leva à reabsorção do osso que fica ao redor das raízes dentárias. A evolução deste processo pode ocasionar a perda dentária, dependendo do nível de perda óssea atingido. O fator etiológico primário é a infecção por bactérias periodontopatogênicas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* e *Eikenella corrodens*. Além destas, outras bactérias também estão associadas à periodontite, porém em menor grau. O fator microbiológico pode ser agravado pela má higiene bucal e hábitos nocivos à saúde como o tabagismo. Fatores e doenças sistêmicas, como o diabetes, HIV, distúrbios imunológicos e gravidez também podem interferir na condição periodontal e vice-versa. As bactérias periodontopatogênicas secretam produtos como enzimas, endo e exotoxinas que, dependendo da susceptibilidade e resposta imunológica do hospedeiro, provocarão danos maiores ou menores ao periodonto. Até o presente, o diagnóstico da periodontite é clínico, fato que permite apenas a avaliação pregressa da doença. Estudos recentes sugerem o desenvolvimento de técnicas que permitam o diagnóstico das fases ativas da periodontite além da identificação do risco ao seu desenvolvimento. O presente trabalho objetiva revisar em banco de dados de pesquisa odontológica (1979-2012), aspectos imunológicos da periodontite crônica associada ao seu perfil microbiológico, por se tratar de uma das doenças periodontais mais prevalentes e causadoras de edentulismo em diversas civilizações.

Palavras-chave: periodontite crônica, biofilme, células inflamatórias, citocinas, imunoglobulinas.

Abstract

Periodontitis is an infectious and inflammatory disease that affects the protective and support tissue of the teeth. It originates from gingival inflammation and leads to resorption of bone that surrounds the tooth roots. The evolution of this process can lead to tooth loss, depending on the level of bone loss reached. The primary etiologic factor is infection by periodontopathic bacteria as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* and *Eikenella corrodens*. Besides these, other bacteria are also associated with periodontitis, but to a lesser degree. The microbiological factors may be aggravated by poor oral hygiene and habits harmful to health as smoking. Factors and systemic diseases such as diabetes, HIV, immune disorders, and pregnancy

¹ Parte da dissertação de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Professora do Curso de Odontologia - Escola Superior de Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, UEA, Av. Carvalho Leal, 1.777, Cachoeirinha, Manaus, Amazonas, Brasil.

³ Pesquisadora do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brasil.

⁴ Professora Associada, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 3.000, Coroado II, Manaus, Amazonas, Brasil. e-mail: mcsantos@ufam.edu.br.



can also affect the periodontal condition and vice versa. The periodontopathogenic bacteria secrete products such as enzymes, endo- and exotoxins that depending on the susceptibility and host immune response will cause major or minor damage to the periodontium. To date, diagnosis of periodontitis is clinical, a fact which only allows the evaluation of previous disease. Recent studies suggest the development of techniques for the diagnosis of active phases of periodontitis in addition to identifying the risk to their development. This paper aims to review in the dental research database (1979-2012), the immunology of chronic periodontitis tying to its microbiological profile, because it is one of the major prevalent periodontal diseases that lead to edentulism in many civilizations

Key-words: chronic periodontitis, biofilm; inflammatory cells, cytokines, immunoglobulins.

1. Introdução

A periodontite crônica é uma das doenças periodontais mais frequentes. Esta enfermidade acomete principalmente indivíduos adultos com má higiene bucal e sua prevenção evita a perda dentária futura além do agravo de doenças sistêmicas que podem estar associadas à periodontopatias.

Até o presente, a periodontite tem seu diagnóstico basicamente direcionado por parâmetros clínicos e história da doença. Frequentemente, esse diagnóstico só é estabelecido a partir do momento em que já há dano e perda tecidual instalada.

Os micro-organismos associados à periodontite podem variar dependendo de diferentes fatores, por exemplo, classificação e gravidade da doença periodontal.

A identificação da microbiota responsável pela manifestação das periodontopatias é de extrema importância, pois precede a adoção de medidas eficazes na prevenção e tratamento das doenças periodontais. Além disso, a associação desta microbiota a biomarcadores imunológicos como citocinas, leucócitos, linfócitos, anticorpos, dentre outros, encontrados em pacientes com e sem periodontite constitui forma eficaz de se avaliar o risco individual, diagnosticar, traçar prognóstico mais fidedigno e auxiliar no tratamento das diversas formas da doença, além de avaliar o resultado da terapia periodontal.

Com bases nessas evidências, o presente trabalho teve por objetivo revisar artigos da literatura dos últimos trinta e três anos (1979-2012) relacionados com periodontite crônica.

2. Metodologia da revisão de literatura

A revisão da literatura sobre a Imunologia da periodontite crônica foi realizada com base nos bancos de dados eletrônicos que disponibilizam publicações de pesquisas odontológicas (LILACS, MEDLINE, Periódicos da CAPES). O período destas publicações foi de janeiro de 1979 a março de 2012, utilizando as seguintes palavras-chave: Português - periodontite crônica, biofilme, células inflamatórias, citocinas, imunoglobulinas, ou em Inglês - chronic periodontitis, biofilm, inflammatory cells, cytokines, immunoglobulins.

Vale ressaltar que não foram encontradas referências nos meses de janeiro a março de 2012 sobre imunologia da periodontite crônica.

3. Revisão de literatura

O epitélio bucal é uma barreira física que interage com micro-organismos periodontais e promove mecanismos de defesa iniciais por meio de peptídeos antimicrobianos (CHUNG et al., 2004; SHELBURNE et al., 2005). Os patógenos que conseguem ultrapassar esta barreira, em condições normais de imunocompetência do organismo, são extensamente combatidos pelo sistema imune por meio de diferentes estratégias de defesa, como aquela mediada por células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) (DEAS, MACKAY e MCDONNELL, 2003; KANTARCI, OYAIZU e VAN-DYKE, 2003).

De acordo com Socransky e colaboradores (1998) as bactérias que geralmente estão associadas à doença periodontal são, em sua maioria, gram-negativas anaeróbias estritas ou facultativas:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans,
Porphyromonas gingivalis,
Tannerella forsythia,
Prevotella intermedia,
Prevotella nigrescens,
Fusobacterium



nucleatum, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola*, *Selenomonas sputigena*, *Eubacterium* sp., e algumas espécies de espiroquetas.

Em 2002, Mombelli, Casagni e Madianos fizeram uma revisão sistemática onde avaliaram 33 estudos que forneciam dados microbiológicos tanto de indivíduos portadores de periodontite agressiva como de periodontite crônica. Os autores concluíram que a presença ou não dos patógenos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Campylobacter rectus* não poderiam servir como forma de distinção entre indivíduos com periodontite crônica ou agressiva.

A resposta imunológica primária na periodontite ocorre após a colonização do sulco gengival por patógenos periodontais. Os periodontopatógenos estimulam, dentre outros mediadores inflamatórios, a produção de citocinas (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) e quimiocinas (CXCL-1, CXCL-8, CCL-5) pelo epitélio gengival, que resulta na expressão de moléculas de adesão, aumento na permeabilidade dos capilares gengivais e quimiotaxia de neutrófilos do epitélio juncional para o sulco gengival. Esta resposta inicial, com a produção de citocinas e quimiocinas específicas, promove a migração de um infiltrado inflamatório composto por células T perivasculares e monócitos para o tecido conjuntivo (FORD, GAMONAL e SEYMOUR, 2010).

Caso a resposta imunológica celular não consiga controlar a infecção, ocorre o recrutamento de células B que se diferenciam em plasmócitos. Os plasmócitos produzem imunoglobulinas (anticorpos) que podem conferir proteção aos tecidos periodontais, controlando o processo infeccioso, ou ainda, induzir efeitos deletérios, que levam à destruição do tecido conjuntivo, promovendo reabsorção do osso alveolar. A efetividade dessa resposta varia entre indivíduos e demonstra importância na determinação da susceptibilidade à doença (FORD, GAMONAL e SEYMOUR, 2010).

Atualmente está bem estabelecida a relação entre a progressão da periodontite e diversos fatores, como: a presença do patógeno periodontal, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), MMP e PGE₂,

além de baixos níveis de citocinas inibitórias do processo inflamatório (IL-10), TGF- β e inibidores teciduais das MMP (TIMP) (FORD, GAMONAL e SEYMOUR, 2010; ANDRUKHOV et al., 2011).

A rede de citocinas na periodontite ainda não está completamente estabelecida. Numerosas citocinas estão envolvidas nessa rede e participam da fisiopatologia dessa doença. A evidência mais consistente de rede de citocina na periodontite é a da existência daquela formada pela IL-1 β , TNF- α , IL-6 e RANK-L. Estudos mais recentes elucidam a participação da citocina anti-inflamatória IL-10, na periodontite (PRESHAW e TAYLOR, 2011). Há evidências de que citocinas como IL-32, 33 e 37 também atuam no processo da doença (ANDRUKHOV et al., 2011).

A susceptibilidade e extensão da destruição tissular parecem ser determinadas pelo complexo equilíbrio das citocinas produzidas pela presença de inúmeras associações entre micro-organismos periodontais (FORD, GAMONAL e SEYMOUR, 2010).

Quando a resposta do hospedeiro se exacerba, pode levar ao dano tecidual, causando perda de suporte periodontal. O estudo dos mediadores inflamatórios associados à doença periodontal, pelos métodos imunológicos ou bioquímicos, permite a avaliação da resposta do hospedeiro frente a essa doença (KINNEY, RAMSEIER e GIANNIBILE, 2007).

Fontes de amostras potenciais incluem saliva, fluido crevicular gengival (FCG), células do sulco gengival, soro sanguíneo e células sanguíneas. Geralmente a fonte mais utilizada é o fluido gengival e, em menor grau, a saliva. No fluido gengival é possível caracterizar os mediadores de inflamação de forma localizada (por sítio) e na saliva de forma generalizada (PAGE, 1992).

3.1. Participação das diferentes linhagens de células da Imunidade Inata na Periodontite

As células epiteliais participam do início das respostas imunológicas adaptativas pela produção de citocinas e quimiocinas, induzindo a ativação e diferenciação das células dendríticas (DC) e dos linfócitos B e T (SCHLEIMER et al., 2007). As células de Langerhans são as células dendríticas imaturas melhor caracterizadas, localizadas acima da camada basal das células epiteliais na mucosa



bucal (GIROLOMONI et. al., 2002). No seu estado imaturo, as células dendríticas são eficientes células capturadoras de antígenos, porém, quando migram para órgãos linfoides secundários, tornam-se maduras e passam a expressar moléculas coestimuladoras e de MHC de classe II as quais propiciam a apresentação de peptídeos, oriundos desses antígenos, às células T-naïve (T_H0) diferenciando-as em células efetoras (STEINMAN, PACK e INABA, 1997).

Jotwani e colaboradores (2001) demonstraram que o número de células dendríticas imaturas ($CD1a^+$) ou células captadoras de antígenos aumenta significativamente no epitélio com periodontite quando comparado ao epitélio sem inflamação e, o número de células dendríticas maduras ($CD83^+$) ou células apresentadoras de antígenos aumenta na lâmina própria do tecido gengival, de pacientes com periodontite em relação à pacientes periodontalmente saudáveis.

O número de neutrófilos e a concentração de mediadores da inflamação também são maiores em sítios de periodontite, quando comparado aos sítios saudáveis. A relação entre o número de neutrófilos no fluido crevicular gengival e o diagnóstico de doença periodontal ativa foi reconhecida desde meados da década de 80 do século XX (MILLER, LAMSTER e CHASENS, 1984). No sulco gengival os neutrófilos formam uma barreira entre o epitélio e o biofilme (ATTSTRÖM e SCHROEDER, 1979) protegendo da invasão bacteriana o epitélio e o tecido conjuntivo subjacente (HEMMERLE e FRANK, 1991).

Os neutrófilos são conhecidos como células de proteção ao periodonto. Desordens genéticas que levam a defeitos de adesão dos neutrófilos estão associadas à destruição periodontal localizada, rápida e progressiva (PAGE, 1992). Segundo Nussbaum e Shapira (2011) a neutropenia e deficiências relacionadas à quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos (PMN), geralmente resultam em aumento no índice e gravidade de destruição periodontal. Deficiências quantitativas em geral são acompanhadas por destruição periodontal generalizada, enquanto os defeitos qualitativos frequentemente associam-se a periodontite localizada. Por outro lado, os neutrófilos também liberam produtos tóxicos (como colagenase ou citocinas pró-inflamatórias) que contribuem para a destruição dos tecidos de

suporte dos dentes (KANTARCI, OYAZU e VAN-DYKE, 2003). O conhecimento e a compreensão da atividade dos neutrófilos no processo inflamatório e destruição tecidual na periodontite é essencial no reconhecimento de pacientes que apresentam números aumentados de PMN, demonstrando a correlação deste perfil celular com a presença e gravidade de doença periodontal ativa (BENDER, THANG e GLOGAUER, 2006).

A lesão periodontal precoce ou estável é constituída, principalmente, por macrófagos e células T, sugerindo que as citocinas T_H1 (principalmente $INF-\gamma$) são importantes no desenvolvimento dessa resposta, enquanto, a lesão periodontal avançada ou progressiva é caracterizada por células B e plasmócitos e dependentes de citocinas T_H2 (principalmente IL-4). O $INF-\gamma$ produzido pelas células T_H1 na lesão inicial pode participar da limitação da infecção, aumentando a atividade fagocítica dos neutrófilos e macrófagos. Quando há persistência do patógeno ou de seus antígenos no biofilme dental, a lesão não é contida (GEMMELL e SEYMOUR, 1994).

Os monócitos e macrófagos podem ser ativados por bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, estimulando a secreção de mediadores pró-inflamatórios e de destruição tecidual (ZADEH, NICHOLS e MIYASAKI, 1999). Ao mesmo tempo, outro estudo propõe que *P. gingivalis* pode afetar a quimiotaxia e ativação de macrófagos pela inibição da proteína 1 (MCP-1, atualmente denominada de quimiocina CCL-2) (GEMMELL, MARSHALL e SEYMOUR, 1997). Isto sugere que os macrófagos promovem efeito protetor na lesão estável que acaba na lesão destrutiva avançada. *Porphyromonas gingivalis*, também demonstrou induzir a produção de IL-1 β preferencialmente pelas células B que por monócitos de pacientes com doença periodontal, sugerindo que a maior parte de IL-1 produzida na doença periodontal é de origem linfocítica e não macrófágica (GEMMELL et al., 1998).

3.2 Participação das diferentes linhagens de células da Imunidade Adaptativa na Periodontite

Após o início da lesão periodontal, com o predomínio de células da imunidade inata como neutrófilos e fagócitos mononucleares, a doença



torna-se caracterizada por lesões compostas por células da imunidade adaptativa como linfócitos B e plasmócitos nos tecidos gengivais. Enquanto as células T são normalmente consideradas células T reguladoras na doença periodontal, está claro que as células B são responsáveis por funções além da produção de anticorpos. As células B também são células apresentadoras de antígenos que expressam antígenos em moléculas de MHC classe II e secretam uma variedade de citocinas (VAN DYKE, 2007). Berglundh, Donati e Zitzmann (2007) demonstraram evidências que subtipos de células B, incluindo as células B-1a (produtoras de imunoglobulinas naturais e ou autorreativas) e B-2 são encontradas na forma funcional nas lesões periodontais.

As células T reguladoras (T_{reg}) têm importante função imunorregulatória na patogênese da doença periodontal. Gemmell, Yamazaki e Seymour (2007) sugerem que essas células possuem relevante papel na homeostasia dos tecidos periodontais e estão envolvidas tanto nos processos de destruição quanto de reparo nos tecidos gengivais durante a periodontite crônica.

Alguns estudos indicam que a resposta imunológica celular mediada por células T, também tem importante papel na progressão da doença periodontal e destruição tecidual. As células T e seus produtos têm demonstrado ocasionar perda do tecido de suporte dentário durante diferentes estágios da progressão do processo inflamatório, em diversos estudos utilizando animais (GEMMELL, YAMAZAKI e SEYMOUR, 2002; GAFFEN e HAJISHENGALLIS, 2008).

Acreditava-se que a resposta imunológica na doença periodontal era controlada pelo efeito em rede das células T auxiliares (T_H1 e T_H2). As citocinas T_H1 (IL-2 e IFN- γ) promovem a imunidade mediada por células, enquanto, a citocina T_H2 (IL-4) suprime as respostas mediadas por células e aumenta a imunidade humoral. Recentemente, um novo subtipo de célula T auxiliar, a célula T_H17 , caracterizada pela produção de IL-17 (IL-17A e IL-17F), foi descrita. As células T_H17 podem ter efeito destrutivo ou protetor nos tecidos com doença periodontal (FORD, GAMONAL e SEYMOUR, 2010). Segundo Cardoso e colaboradores (2009) e Ford, Gamonal e Seymour (2010), a doença periodontal é causada por uma resposta imunológica exagerada do hospedeiro contra

bactérias peridontopatogênicas. Estas bactérias são capazes de ativar, em análises de fluido crevicular gengival além de biópsias ósseas e gengivais, populações de células T_H1 , e principalmente, T_H17 , produzindo IL-17 (que parece estar relacionada com o receptor ativador de NF κ B ligante, RANK-L, que promove a reabsorção óssea). As T_H17 são populações celulares com potencial extremamente inflamatório. A diferenciação das células T_H17 ainda gera dúvidas no meio científico, mas sugere-se que há presença de TGF- β , em conjugação com citocinas inflamatórias como a IL-6, gerando este padrão celular. Além disso, as células T_H17 expressam em suas superfícies o receptor para IL-23 (citocina produzida pelos monócitos) que, ao se ligar a seu receptor, também auxilia na proliferação, manutenção e expansão das células T_H17 . Essas células podem ser estimuladas a produzir IL-17A, IL-17F, TNF, IL-6, dentre outras citocinas inflamatórias.

Foi recentemente demonstrado que as células T_H17 podem ser convertidas em células T_H1 ou T_H2 sob influência de IL-12 ou IL-4, respectivamente (LEXBERG et al., 2008).

As células T_{reg} são capazes de regular a resposta imunológica por produzirem e secretarem IL-10 e TGF- β , citocinas anti-inflamatórias. Tais células podem controlar o aparecimento de doenças inflamatórias e também a resposta imunológica antipatógenas. As células T_{reg} ($CD4^+$, $CD25^+$, Foxp3 $^+$) podem ser convertidas em células produtoras de IL-17 quando cocultivadas com células dendríticas seletivamente ativadas via dectina-1 (OSORIO et al., 2008).

Quando células T_{reg} (in vitro) surgem antes da diferenciação das células T_H0 em T_H17 , há inibição da diferenciação em T_H17 frente às bactérias da periodontite, sugerindo que o momento de chegada das células T_{reg} nos diferentes estágios da doença periodontal pode interferir na gravidade e controle da doença (ROSSOMANDO; KENNEDY et al., 1990; WEAVER; HARRINGTON et al., 2006).

3.3 Citocinas na Periodontite

As citocinas são potentes mediadores locais de inflamação que são produzidas por diversas células. As citocinas encontradas no FCG como potenciais marcadores de diagnóstico incluem



fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que atua na reabsorção óssea, interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) que agem na destruição e reparo da matriz extracelular, e a quimiocina CXCL-8 (anteriormente IL-8) que promove o recrutamento de leucócitos (ROSSOMANDO, KENNEDY e HADJIMICHAEL, 1990; STASHENKO, FUJIYOSHI e OBERNESSER, 1991; NUSSBAUM e SHAPIRA, 2011).

A evolução de uma lesão de periodontite estável para progressiva é caracterizada por mudança na natureza do infiltrado inflamatório e no aumento do número de células B e plasmócitos. Isto provavelmente se deve à contínua presença dos patógenos e à resposta T_H1 ineficiente. A produção de IL-4, possivelmente como resultado da estimulação de mastócitos e liberação de IL-4, dá origem à resposta T_H2 , com a ativação de células B e a produção de imunoglobulinas. Anticorpos protetores são efetivos em conter a infecção, mas anticorpos não protetores ou autoanticorpos (anticolágeno) secretados por B1a podem levar à persistência da doença e a altos níveis de IL-1 como resultado da destruição tecidual (GEMMELL e SEYMOUR, 1994; GEMMELL, MARSHALL e SEYMOUR, 1997).

A expressão de IL-17 é maior na periodontite crônica do que em tecidos sem evidência de doença periodontal (OHYAMA et al., 2009) e, em associação com a IL-1 β e TNF- α , a IL-17 tem induzido a produção das MMP 1 e 3 por fibroblastos gengivais (BEKLEN et al., 2007).

A IL-10 tem sido associada à patogênese da periodontite crônica. A função da IL-10 nas infecções crônicas humanas é complexa e crítica. Presume-se que a IL-10 está associada ao estímulo de células B e, ao mesmo tempo, à supressão da imunidade inata e respostas de células T antígeno-específicas, em particular, as respostas mediadas por células T_H1 . Além disso, a IL-10 pode ser crítica para o controle do balanço entre células T_H1 e T_H2 na periodontite crônica, onde o excesso desta citocina pode levar à inibição da resposta T_H1 o que pode favorecer o desenvolvimento da resposta T_H2 com menor destruição tecidual (FORD; GAMONAL e SEYMOUR, 2010).

Os estudos a respeito das citocinas dosadas na saliva são contraditórios em relação à

periodontite. Alguns autores observaram um aumento nas concentrações de algumas citocinas (IL-1 β e MMP-8) (MILLER et al., 2006), na saliva de indivíduos com periodontite em relação a pacientes periodontalmente saudáveis, e também a redução significativa nos níveis destas mesmas citocinas em resposta à terapia periodontal, em pacientes com periodontite crônica (SEXTON et al., 2011). Teles e colaboradores (2009) não encontraram associação entre os níveis de citocinas salivares e os parâmetros clínicos de doença periodontal.

3.4 Imunoglobulinas na Periodontite

Em se tratando de imunidade humoral e periodontia, as imunoglobulinas (Ig) são importantes fatores de defesa presentes na saliva e, conseqüentemente, promovem proteção ao periodonto.

Das diferentes classes de imunoglobulinas, três influenciam na microbiota bucal interferindo na aderência microbiana ou inibindo o metabolismo celular do patógeno. Essas classes são as imunoglobulinas A, G e M (IgA, IgG e IgM). A IgA secretora é a imunoglobulina mais predominante na saliva. Os pacientes com doenças periodontais demonstram altas concentrações dessas imunoglobulinas quando comparados a indivíduos com o periodonto saudável (SEEMANN et al., 2004). As concentrações salivares de imunoglobulinas reduzem consideravelmente após a terapia periodontal (REIFF, 1984).

Como em outras doenças infecciosas, a imunidade humoral no periodonto mediada por IgA, IgM e IgG é primariamente protetora (EBERSOLE e TAUBMAN, 1994; KINANE, MOONEY e EBERSOLE, 1999; EBERSOLE, CAPPELLI e HOLT, 2001; EBERSOLE, 2003). No entanto, nem todas as respostas imunes humorais geradas são protetoras e podem até mesmo ter efeitos deletérios ao periodonto. Além do efeito clássico de ligação à toxina bacteriana para neutralização, os anticorpos podem dar início a atividades indiretas como internalização mediada por FcR (opsonização) e ativação da via Clássica do Sistema Complemento (SAITO et al., 1999).

O sistema imunológico humoral, controlado primariamente por plasmócitos, é considerado por



alguns autores como fator predominante na progressão da doença periodontal (KINANE, MOONEY e EBERSOLE, 1999). Foi demonstrado que a concentração sérica de IgG surge como uma reação à presença específica de bactérias periodontais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (EBERSOLE; CAPPELLI e HOLT, 2001). Além disso, também foi evidenciado que o nível sérico de IgG está diretamente relacionado à gravidade da doença medida por meio de parâmetros clínicos como profundidade de sondagem e a extensão e gravidade do sangramento à sondagem (OFFENBACHER et al., 2007).

4. Conclusões

A saliva, embora pouco investigada, e o fluido crevicular gengival constituem eficientes fontes de avaliação não invasiva da saúde periodontal, pois são constituídos de biomarcadores que refletem o estado de saúde bucal. Mesmo que se tenha uma definição dos principais micro-organismos desencadeadores das periodontites, não é incomum observamos mudanças do perfil microbiológico nas doenças periodontais, em diferentes regiões geográficas. Apesar do consenso de que a resposta T_H2 é predominante na periodontite crônica, o papel das respostas T_H1 , T_H17 , T_{reg} ou de outra linhagem de linfócitos T, permanece confuso e mais estudos precisam ser conduzidos para elucidar o perfil celular envolvido na doença. As imunoglobulinas são proteínas capazes de promover proteção ou induzir a destruição dos tecidos periodontais dependendo do patógeno e da resposta do hospedeiro envolvidos. Além da pesquisa microbiana, o conhecimento das células de defesa, citocinas, as classes e subclasses de imunoglobulinas e outros marcadores presentes na saliva e no fluido crevicular gengival, de pacientes na fase ativa de infecção periodontal, poderão contribuir para diagnóstico mais preciso, bem como prever o prognóstico da doença e identificar indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento dessas enfermidades. Além disso, seria possível avaliar a efetividade da terapia periodontal, não somente por aspectos clínicos, mas também laboratoriais e de maior exatidão.

5. Agradecimentos

As autoras são gratas às Professoras Doutoras: Luciana Leomil, Maria do Carmo Machado Guimarães e Tatiana Nayara Libório dos Santos, que compuseram a Banca de Dissertação de Mestrado de Priscilla Farias Naiff, por suas sugestões à forma final deste texto.

Divulgação

Este artigo é inédito e, portanto, não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ANDRUKHOV, O; ULM, C; REISCHL, H; NGUYEN, P; MATEJKA, M; RAUSCH-FAN, X. Serum Cytokine Levels in Periodontitis Patients in Relation to the Bacterial Load. *J Periodontol.* v. 82, p. 885-892, 2011.
- ATTSTRÖM, R; SCHROEDER, H.E. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. *Scand J Dent Res.* v. 87, p.7-23, 1979.
- BEKLEN, A; AINOLA, M; HUKKANEN, M; GURGAN, C; SORSA, T; KONTTINEN, Y.T. MMPs, IL-1, and tumor necrosis factor are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.* v. 86, p. 347-351, 2007.
- BENDER, J.S; THANG, H; GLOGAUER, M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontal Res.* v. 3, p. 214-220, 2006.
- BERGLUNGH, T; DONATI, M; ZITZMANN, N. B cells in periodontitis - friends or enemies? *Periodontology 2000.* v. 45, p. 51-66, 2007.
- CARDOSO, C.R; GARLET, G.P; GRIPPA, G.E; ROSA, A.L; JÚNIOR, W.M; ROSSI, M.A. et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Bucal Microbiol Immunol.* v. 24, p. 1-6, 2009.
- CHUNG, W.O; HANSEN, S.R; RAO, D; DALE, B.A. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J Immunol.* v. 173, p. 5165-5170, 2004.
- DEAS D.E; MACKEY, S.A; MCDONNELL, H.T. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000.* v. 32, p. 82-104, 2003.



- EBERSOLE, J.L. **Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications.** *Periodontology* 2000. v. 31, p. 135-166, 2003.
- EBERSOLE, J.L.; CAPPELLI, D.; HOLT, S.C. **Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question?** *Acta Odontol Scand.* v. 59, p. 161-166, 2001.
- EBERSOLE, J.L.; TAUBMAN, M.A. **The protective nature of host responses in periodontal diseases.** *Periodontology* 2000. v. 5, p. 112-141, 1994.
- FORD, P.J.; GAMONAL, J.; SEYMOUR, G. **Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis.** *Periodontology* 2000. v. 53, p.111-123, 2010.
- GAFFEN, S.L.; HAJISHENGALLIS, G. **A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17.** *J Dent Res.* v. 87, p. 817-828, 2008.
- GEMMELL, E.; WINNING, T.A.; BIRD, P.S.; SEYMOUR, G.J. **Cytokine profiles of lesional and splenic T cells in *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model.** *J Periodontol.* v. 69, p. 1131-1138, 1998.
- GEMMELL, E.; MARSHALL, R.; SEYMOUR, G.J. **Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction.** *Periodontology* 2000. v. 14, p. 112-143, 1997.
- GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. **Modulation of immune responses to periodontal bacteria.** *Curr Opin Periodont.* v. 94, p. 28-38, 1994.
- GEMMELL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G.J. **Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response.** *Crit Rev Oral Biol Med.* v. 13, p. 17-34, 2002.
- GEMMELL, E.; YAMAZAKI, K.; SEYMOUR, G.J. **The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity.** *Periodontology* 2000. v. 43, p. 14-40, 2007.
- GIROLOMONI, G.; CAUX, C.; LEBECQUE, S.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. **Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells.** *Trends Immunol.* v. 23, p. 6-8, 2002.
- HEMMERLE, J.; FRANK, R.M. **Bacterial invasion of periodontal tissues after experimental immunosuppression in rats.** *J Biol Buccale.* v. 19, p. 271-282, 1991.
- JOTWANI R.; PALUCKA, A.K.; AL-QUOTUB, M.; NOURI-SHIRAZI, M.; KIM, J.; BELL, D. et al. **Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: In situ, in vivo and in vitro studies.** *J Immunol.* v. 167, p. 4693-4700, 2001.
- KANTARCI, A.; OYAZU, K.; VAN-DYKE, T.E. **Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis.** *J Periodontol.* v. 74, p. 66-75, 2003.
- KINANE, D.F.; MOONEY, J.; EBERSOLE, J.L. **Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease.** *Periodontology* 2000. v. 20, p. 289-340, 1999.
- KINNEY, J.; RAMSEIER, C.; GIANNOBILE, W. **Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis.** *Annals of New York Academy of Sciences.* v. 1098, p. 230-251, 2007.
- LEXBERG, M.H.; TAUBNER, A.; FORSTER, A.; ALBRECHT, I.; RICHTER, A.; KAMRADT, T. et al. **Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo.** *Eur J Immunol.* v. 38, p. 2654-2664, 2008.
- MILLER, C.S.; KING, C.P. JR; LANGUB, M.C.; KRYSZCIO, R.J.; THOMAS, M.V. **Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study.** *J Am Dent Assoc.* v. 137, p. 322-329, 2006.
- MILLER, D.R.; LAMSTER, I.B.; CHASENS, A.I. **Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease.** *J Clin Periodontol.* v. 11, p. 1-15, 1984.
- MOMBELLI, A.; CASAGNI, F.; MADIANOS, P.N. **Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review.** *J Clin Periodontol.* v. 29, p. 10-21, 2002.
- NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L. **How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis.** *J. Clin. Periodontol.*, v. 38, p. 49-59, 2011.
- OFFENBACHER, S.; BARROS, S.P.; SINGER, R.E.; MOSS, K.; WILLIAMS, R.C.; BECK, J.D. **Periodontal disease at the biofilm-gingival interface.** *J Periodontol.* v. 78, p. 1911-1925, 2007.
- OHYAMA, H.; KATO-KOGOE, N.; KUHARA, A.; NISHIMURA, F.; AKASHI, K.; YAMANEGI, K. et al. **The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis.** *J Dent Res.* v. 88, p. 633-638, 2009.
- OSORIO, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; LOCHNER, M.; LAHL, K.; SPARWASSER, T.; EBERL, G. et al. **DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers.** *Eur J Immunol.* v. 38, p. 3274-3281, 2008.



PAGE, R.C: Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol*, p. 356-366, 1992.

PRESHAW, P; TAYLOR, J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*. v. 38, p. 60-84, 2011.

REIFF, R.L. Serum and salivary IgG and IgA response to initial preparation therapy. *J Periodontol*. v. 55, p. 299-305, 1984.

ROSSOMANDO, E.F; KENNEDY, J.E; HADJIMICHAEL, J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol*. v. 35, p. 431-434, 1990.

SAITO, S; HAYAKAWA, M; TAKIGUCHI, H; ABIKO, Y. Opsonophagocytic effect of antibody against recombinant conserved 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. v. 70, p. 610-617, 1999.

SCHLEIMER, R.P; KATO, A; KERN, R; KUPERMAN, D; AVILA, P.C. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. v. 120, p.1279-1284, 2007.

SEEMANN, R; HAGEWALD, S.J; SZTANKAY, V; DREWS, J; BIZHANG, M; KAGE, A. Levels of parotid and submandibular / sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Investig*. v. 8, p. 233-237, 2004.

SEXTON, W.M; LIN, Y; KRYSCIO, R.J; DAWSON, III D.R; EBERSOLE, J.L; MILLER, C.S. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol*. v. 38, p. 434-441, 2011.

SHELBURNE, C.E; COULTER, W.A; OLGUIN, D; LANTZ, M.S; LOPATIN, D.E. Induction of (beta) - defensin resistance in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 49, p. 183-187, 2005.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complex in supragingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, v. 25, p. 134-144, 1998.

STASHENKO, P; FUJIYOSHI, P; OBERNESSER, M.S. Levels of interleukin 1 beta in tissues from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*. v. 18, p. 548-554, 1991.

STEINMAN, R.M; PACK, M; INABA, K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. v. 156, p. 25-37, 1997.

TELES, R.P; LIKHARI, V; SOCRANSKY, S.S; HAFFAJEE, A.D. Salivary Cytokine Levels in Chronic Periodontitis and Periodontally Healthy Subjects. A cross-sectional Study. *J Periodontal Res*. v. 44(3), p. 411-417, 2009.

VAN DYKE, T.E. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontology 2000*. v. 45, p. 10-13, 2007.

WEAVER, C.T; HARRINGTON, L.E; MANGAN, P.R; GAVRIELI, M; MURPHY, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. v. 24, p. 677-688, 2006.

ZADEH, H.H; NICHOLS, F.C; MIYASAKI, K.T. The role of the cellmediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontology 2000*. v. 20, p. 239-288, 1999.

2. JUSTIFICATIVA

Até o presente, a doença periodontal tem seu diagnóstico basicamente direcionado por parâmetros tais como: profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem e mobilidade dentária. Frequentemente, esse diagnóstico só é estabelecido a partir do momento em que já há dano e perda tecidual instalada.

Uma das doenças bucais mais frequentes é a periodontite crônica. Esta doença acomete principalmente indivíduos adultos com má higiene bucal. Sua prevenção evita a perda dentária futura, além do surgimento ou agravamento de doenças sistêmicas que podem estar associadas à periodontopatias. Os microrganismos associados à periodontite podem variar dependendo de diferentes fatores, por exemplo, classificação e gravidade da doença periodontal. A identificação da microbiota responsável pela manifestação das doenças periodontais é de extrema importância, pois precede a adoção de medidas eficazes na prevenção e tratamento das doenças periodontais. Pelo uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) poderiam ser identificadas, mesmo que em níveis extremamente reduzidos, as espécies de microrganismos periodontais, podendo-se avaliar o risco futuro individual da doença.

A saliva constitui eficiente fonte de avaliação não invasiva da saúde bucal e geral, pois é constituída de biomarcadores que refletem estes indicadores. Este fluido é capaz de mostrar os aspectos fisiológicos envolvidos no processo de saúde e doença periodontal. Além da pesquisa microbiana, o conhecimento das células e de imunoglobulinas presentes na saliva de pacientes na fase ativa de infecção periodontal, poderá contribuir com o diagnóstico mais preciso, bem como prever o prognóstico da doença e identificar indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento destas doenças. Também seria possível avaliar a efetividade da terapia periodontal, não somente por aspectos clínicos, mas laboratoriais e de maior exatidão.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar o perfil microbiológico presente na saliva e no biofilme subgengival, bem como, fenotipar as células e titular as imunoglobulinas salivares, em adultos com periodontite crônica.

3.2 Específicos

3.2.1 Detectar a presença de patógenos periodontais no biofilme subgengival e saliva (*Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*).

3.2.2 Caracterizar fenotipicamente os leucócitos totais (CD45), NK (CD56), linfócitos B (CD19) e linfócitos T (CD3) presentes na saliva de indivíduos com periodontite crônica;

3.2.3 Verificar o fluxo salivar dos pacientes com periodontite crônica;

3.2.4 Titular as imunoglobulinas das classes A, G e M presentes na saliva;

3.2.5 Comparar os resultados obtidos nos itens anteriores com os dados provenientes de estudos prévios publicados na literatura científica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

O estudo incluiu a coleta de dados epidemiológicos e das amostras de saliva e biofilme subgengival, além de entrevista (idade, gênero, uso de tabaco e doenças sistêmicas) com os participantes atendidos no período de Abril a Setembro de 2011. Com a saliva e o biofilme foi realizado o protocolo de reação em cadeia polimerase (PCR), visando à detecção de bactérias periodontopatogênicas em sítios previamente identificados clínica e radiograficamente como de periodontite crônica. A saliva foi utilizada para a fenotipagem das células por Citometria de fluxo e para as titulações das imunoglobulinas das classes A, G e M por Dot-Elisa. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em 05/08/2010 (CAAE – 0330.0.115.000-10) (Anexo A) e obteve aprovação em 10/11/2010.

As amostras de saliva e biofilme foram provenientes de pacientes atendidos na clínica de Periodontia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Os experimentos com as amostras foram realizados no Laboratório de Imunologia/ ICB, da Universidade Federal do Amazonas (Dot-Elisa), no Laboratório de Biodiversidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/ Amazonas (PCR) e no Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ (Citometria de fluxo).

4.2. Universo do Estudo

4.2.1. Amostragem

A coleta das amostras foi conduzida na Clínica de Periodontia, da Policlínica Odontológica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e contou com a participação de pacientes portadores de periodontite crônica no grupo teste e de indivíduos sem evidência de doença periodontal, no grupo controle. Após consulta aos prontuários de pacientes com atendimento concluído nos períodos Junho a Dezembro de 2009 e Janeiro a Junho de 2010, verificou-se que a média semestral de portadores de periodontite (≥ 30 anos) atendidos da Clínica de Periodontia da UEA era de 30 pacientes. O cálculo amostral ($n=29$) foi baseado na média semestral de pacientes atendidos, considerando-se erro amostral de 5%, nível de confiança de 99%, e prevalência de 50% da doença na população de acordo com os dados da literatura (SUSIN et al., 2004).

Cada grupo, inicialmente, seria composto por igual número de participantes de ambos os gêneros. O número de participantes previsto era de 60 indivíduos sendo 30, para cada grupo. Contudo, no período de Abril a Setembro de 2011, foram cadastrados, na clínica de Periodontia da UEA, 97 pacientes, destes, 81 foram excluídos do grupo teste por não se adequarem aos critérios de inclusão. Portanto, o número total de participantes, que atendiam aos critérios de inclusão propostos neste estudo (item 4.2.2), foi de 16 pacientes e, para compor o estudo, foram convidados 32 indivíduos sem evidência de doença periodontal. Vale ressaltar que os dezesseis pacientes (100%) aceitaram participar e que todos (pacientes e controles) foram individualmente informados sobre o estudo proposto e concordaram com sua participação na pesquisa, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice D). Após a coleta das amostras, todos os pacientes portadores de periodontite

crônica foram submetidos a tratamento periodontal e os pacientes controles, receberam profilaxia dental além de instruções sobre higiene bucal.

4.2.2 Critérios de Inclusão.

Para o grupo teste foram selecionados indivíduos baseando-se nos seguintes critérios:

- Indivíduos com presença de 15 dentes, no mínimo;
- No mínimo, seis dentes com pelo menos um sítio com profundidade de sondagem ≥ 4 mm e dois dentes com perda de inserção ≥ 3 mm com evidência radiográfica de reabsorção da crista óssea alveolar;
- Idade ≥ 30 anos.

Para o grupo controle foram selecionados indivíduos com idade ≥ 30 anos, com o periodonto saudável clínica e radiograficamente e, com presença de, no mínimo, 20 dentes.

4.2.3 Critérios de Exclusão

- Doenças bucais com exceção da periodontite crônica;
- Tratamento periodontal nos últimos seis meses;
- Uso continuado de medicamentos como antibióticos, imunomoduladores ou anti-inflamatórios nos últimos três meses;
- Doenças sistêmicas que interfiram na condição periodontal (diabetes, HIV, desordens imunológicas, etc);
- Gravidez;
- Idade < 30 anos;
- Etnias indígenas.

4.3 Procedimentos

Os procedimentos realizados foram os seguintes:

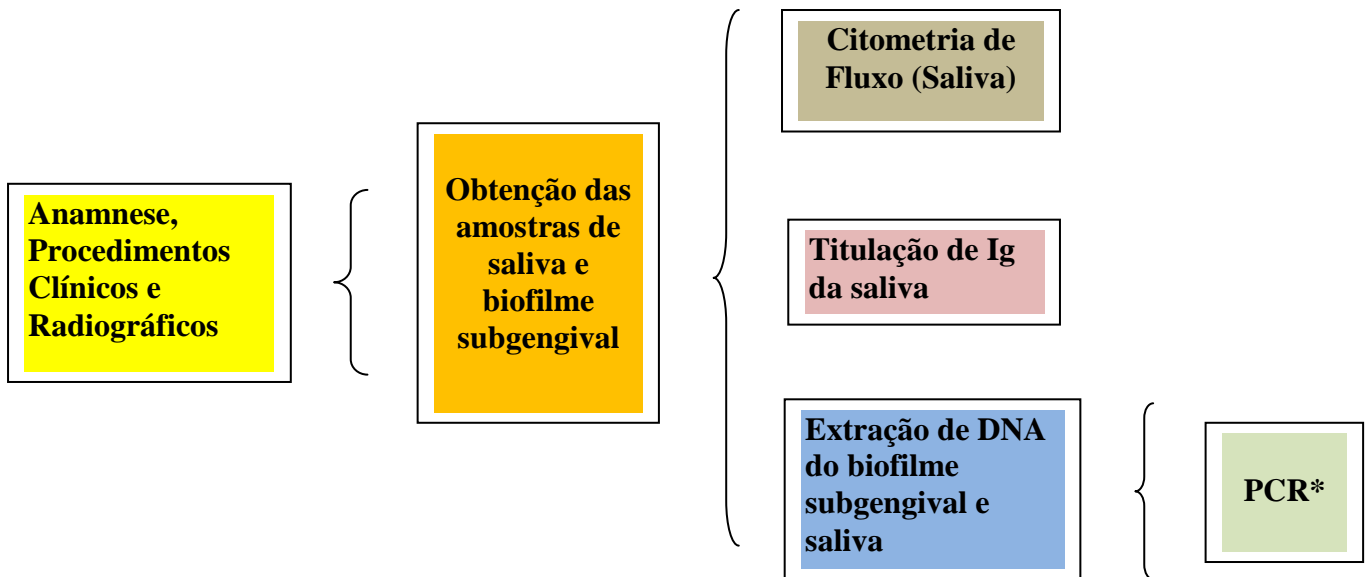


Figura 10. Resumo dos procedimentos realizados na pesquisa.*Dados preliminares.

4.3.1 Anamnese, exame clínico e radiográfico.

Inicialmente os participantes foram entrevistados (Apêndice C) para se obter informações médicas e demográficas juntamente com os dados como idade, gênero e uso de tabaco. O indivíduo foi considerado *não fumante* se nunca tivesse fumado ou se tivesse parado de fumar há mais de cinco anos.

No exame clínico (Apêndice B) foram registrados seis sítios por dente (vestibular, méso-vestibular, disto-vestibular, lingual, méso-lingual e disto-lingual) com o auxílio de uma sonda periodontal de Williams (HU-FRIEDY, Brasil). Os parâmetros observados foram profundidade de sondagem, nível de inserção clínico, índice de placa de O'Leary (1972) e índice de sangramento gengival proposto por Ainamo e Bay (1975). Optamos por utilizar esses dados, pois indicam a situação geral do periodonto de todos os dentes e não apenas de alguns dos dentes previamente escolhidos como ocorre em outros índices existentes para levantamento epidemiológico.

O exame radiográfico dos sítios estudados foi feito pela técnica do paralelismo, utilizando posicionadores radiográficos para esse fim (JON, Brasil).

Foram adotadas todas as medidas de biossegurança (uso de luvas, gorros, máscaras e aventais descartáveis, material esterilizado ou descartável, etc) exigidas para o atendimento odontológico bem como a utilização de medidas de radioproteção (filmes sensíveis, aventais de chumbo nos pacientes e biombos de chumbo para proteção dos pesquisadores) que minimizem os efeitos adversos oriundos da utilização de radiação ionizante para fins de diagnóstico.

4.3.2 Coleta de saliva

Saliva total não estimulada foi coletada de cada indivíduo e acondicionada em um tubo estéril (Falcon) de 50 mL pela manhã, antes do desjejum (entre nove e dez horas da manhã) e sem qualquer procedimento de higiene dental prévio (escovação, uso do fio ou uso de colutórios bucais). A coleta de saliva durava 5 minutos. A saliva foi rapidamente aliquotada em microtubos estéreis do tipo *Eppendorf* e armazenada em gelo, como descrito a seguir: a) Dot-ELISA – 100 µL foram adicionados em um tubo contendo cinco microlitros (5 µL) do inibidor de protease - fluoreto de metil-fenil-sulfonila (PMSF, Lot. 52K0052, SIGMA-ALDRICH CO., St. Louis, U.S.A.) a 0,2 M ressuspensionado em metanol; b) Citometria de Fluxo – 500 µL de saliva foram adicionados em tubos os quais continham 500 µL de paraformaldeído a 1%; c) 1 mL para PCR; e d) 200 µL contendo cinco microlitros (5 µL) de PMSF para posterior análise de citocinas. No mínimo foi coletado, por paciente, 2 mL de saliva. Em seguida o material foi armazenado a 4°C (as amostras para a Citometria de fluxo) ou a -80°C (as amostras para os demais experimentos).

4.3.3 Coleta de biofilme subgengival

Para obtenção de microrganismos subgengivais, após isolamento relativo da área com roletes de algodão esterilizados, cones de papel absorvente foram inseridos em quatro sulcos/ bolsas periodontais com maior profundidade de sondagem em quatro dentes diferentes, sendo transferidos, após 60s, para tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 8). Foram também obtidas amostras de biofilme subgengival por meio de raspagem delicada, de quatro sítios (os mesmos onde foram inseridos os cones de papel) com o auxílio de cureta periodontal. As amostras obtidas foram transferidas para o tubo correspondente contendo a amostra previamente colhida do mesmo paciente seguindo o protocolo de Silva (2007), com algumas modificações.

O material foi imediatamente transportado, em gelo, para o Laboratório de Microbiologia, da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AM) e mantido a -80°C até o momento de uso.

4.3.4 Avaliação do Fluxo Salivar

Após a coleta de saliva, verificou-se o volume total de saliva obtido, em mililitros, e então esse valor foi dividido por 5 (equivalente aos 5 minutos de coleta), com a finalidade de avaliar a velocidade do fluxo salivar de cada indivíduo em mL/min.

4.3.5 Quantificação de Imunoglobulinas

As titulações das Imunoglobulinas das classes A, G e M, presentes nas amostras de saliva dos participantes da pesquisa, foram realizadas por Dot-ELISA segundo a metodologia descrita por Matos-Gomes e colaboradores (2010), com algumas modificações, como descrito a seguir: dois microlitros de cada diluição seriada das salivas (1:100, 1:200, 1:400... até 1:204.800 para IgA e 1:10, 1:20, 1:40 até 1:20.480 para IgG e IgM) foram aplicados nas membranas de nitrocelulose (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA). Em seguida, as

membranas foram bloqueadas por 2 horas com leite em pó desnatado a 5% (Molico®, Nestlé, Araçatuba, SP, BR), dissolvido em Tampão Tris Salina (TBS, pH 7,5). Para a detecção das imunoglobulinas foram utilizados os seguintes conjugados marcados com peroxidase: anti-IgA (cadeia α) humana produzida em carneiro (SIGMA); anti-IgM (Fc 5 μ) humana produzida em carneiro (PIERCE, IL, USA); e anti-IgG (H+L) humana produzida em carneiro (PIERCE, IL, USA). Os conjugados foram então diluídos em TBS (pH 7,5) na proporção de 1:1000. As membranas foram colocadas em recipientes na presença dos seus respectivos conjugados durante quarenta e cinco minutos, em temperatura ambiente. Após quatro lavagens com Tampão Fosfato Salina (PBS, pH 7,2), as reações anticorpo-conjugado foram reveladas com cinco miligramas de 3,3 diaminobenzidina (DAB - BIO-RAD Laboratories, CA, USA) diluídos em 30mL de TBS pH 7,5, na presença do substrato, o peróxido de hidrogênio P.A. a 0,015%. A reação de coloração por precipitação do DAB foi interrompida com água destilada e as membranas foram secadas entre folhas de papel de filtro e as leituras visuais realizadas, para obtenção do ponto final (título) de cada reação. Para a análise estatística os títulos das imunoglobulinas foram identificados por uma escala para facilitar a análise dos dados.

4.3.6 Perfil Celular

O protocolo utilizado foi o proposto por Dos-Santos et al. (2009) com algumas modificações. Esta análise foi realizada por Citometria de Fluxo no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia da FIOCRUZ- RJ.

4.3.6.1 Marcação das amostras

Antes de submeter as amostras ao protocolo citofluorimétrico de marcação com anticorpos monoclonais foram adicionados 500 μ L de PBS, pH 7.0 à amostra, sendo então

centrifugada a 2000 rpm, por 5 minutos, a 4°C para a retirada do muco. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de PBS contendo 0,1% de azida sódica e 2% de soro fetal bovino (PBS_{Az}). A seguir, foi adicionado à suspensão 5 µL do reagente anticorpo monoclonal (mAB) acoplados a seus respectivos fluorocromos (TetraCHROME, Beckman Coulter): anti-CD45/FITC; anti-CD56/PE; anti-CD19/ECD; anti-CD3/PE-Cy5 (Quadro 1). Após incubação por 20 minutos, a 4°C, protegidas da luz, as amostras foram lavadas com 500 µL de PBS_{Az} (2000rpm, por 5 minutos a 4°C). Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de PFA 1% para a fixação da marcação. Como controles negativos de marcação foram utilizados anticorpos monoclonais isotípicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos do ensaio fenotípico e amostras não marcadas.

Quadro 1. Anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos utilizados no protocolo citofluorimétrico e a respectiva marcação fenotípica.

Anticorpo Monoclonal	Marcação Fenotípica
Anti-CD45/FITC	Leucócitos
Anti-CD56/PE	Células <i>Natural Killer</i> (NK)
Anti-CD19/ECD	Linfócitos B
Anti-CD3/PC5	Linfócitos T

4.3.6.2 Aquisição e análises

Ajuste de voltagens ideais e compensação de cores: Amostras não marcadas foram adquiridas como controle negativo de marcação e para o ajuste da voltagem ideal de forma que as células negativas ficaram representadas até grandeza de 10 (elevado a 1) no gráfico

biparamétrico de intensidade de fluorescência permitindo a delimitação pelos cursores. Foram utilizados também anticorpos monoclonais isotípicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos do ensaio fenotípico como controles de possíveis marcações inespecíficas.

Para ajustar a compensação de cores foram realizadas marcações simples, isto é, com somente um tipo de anticorpo monoclonal e, portanto um fluorocromo, por amostra, como descrito a seguir: anti-CD45/FITC, anti-CD45/PE, anti-CD45/ECD e anti-CD45/PC5 (todos da Beckman Coulter, EUA), separadamente. A compensação dos sinais interferentes de fluorescência foi baseada nos critérios de aproximação dos valores da intensidade média de fluorescência (*mean fluorescence intensity* - MFI). As quatro diferentes amostras foram adquiridas individualmente e analisadas em gráficos biparamétricos de marcação (*dot plot*) para avaliar o sinal do fluorocromo utilizado *versus* todos os outros fluorocromos utilizados nas amostras submetidas ao protocolo multiparamétrico. As compensações foram ajustadas de modo que a MFI, no eixo do x, observada no quadrante um (Q1), representando as células positivas para o anticorpo utilizado (CD45/PE, por exemplo), deveriam ter um valor igual ou mais próximo possível da MFI do quadrante três (Q3), que representa as células negativas para o mesmo anticorpo (Figura 11).

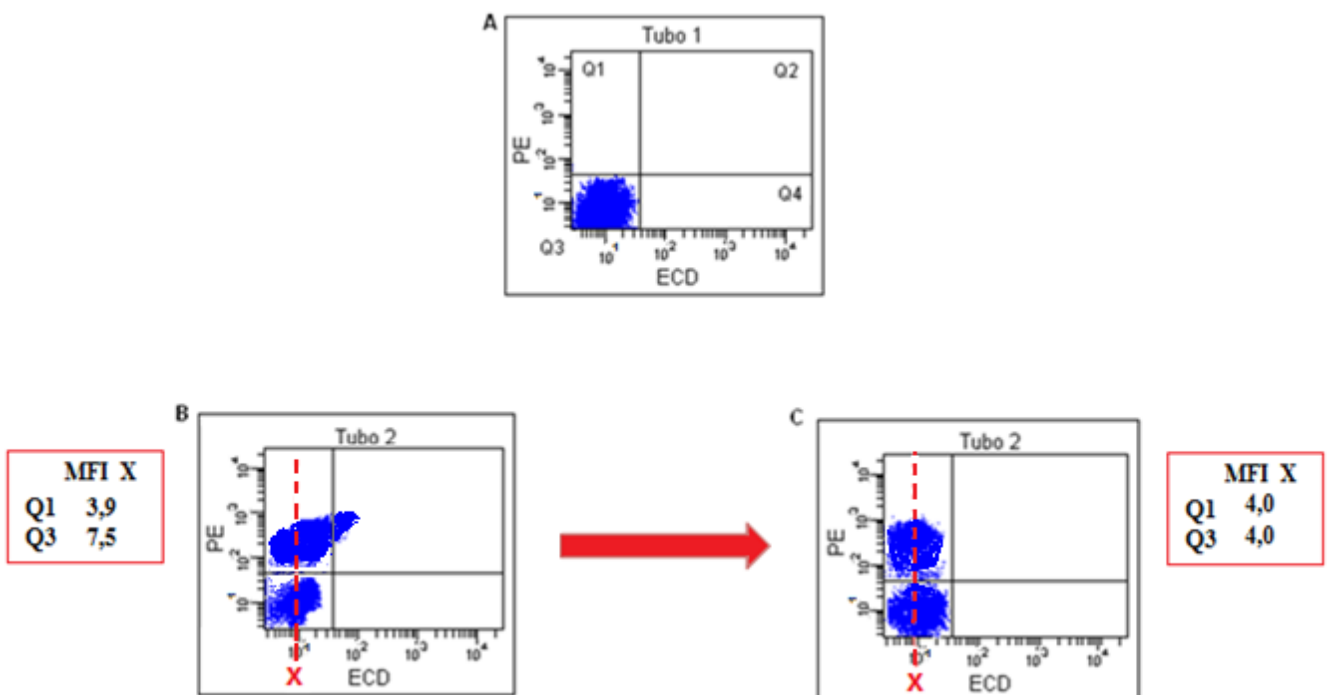


Figura 11: Compensação de cores. Quadrantes (Q) delimitados com base na amostra não marcada (Tubo 1 - A); marcação simples com anti-CD45/PE não compensada, com valores de MFI (intensidade média de fluorescência) diferentes entre o Q1 (quadrante 1) e o Q3 (Tubo 2 - B); marcação simples com anti-CD45/PE compensada com base no ajuste das MFI dos quadrantes 1 e 3 para valores semelhantes (Tubo 2 - C).

Após ajustar a compensação de cores, baseada nas quatro amostras com marcação simples, os mesmos parâmetros de ajuste foram utilizados no protocolo citofluorimétrico utilizado para adquirir e analisar as amostras marcadas simultaneamente com os quatro anticorpos monoclonais. Para a padronização do protocolo de análise das amostras de saliva foi realizada inicialmente, além dos ajustes de voltagem e compensação, aquisição de uma amostra de sangue total de um indivíduo sadio, a partir da qual *gate* foram delimitados de acordo com padrões já conhecidos, de acordo com o protocolo representado na figura 12.

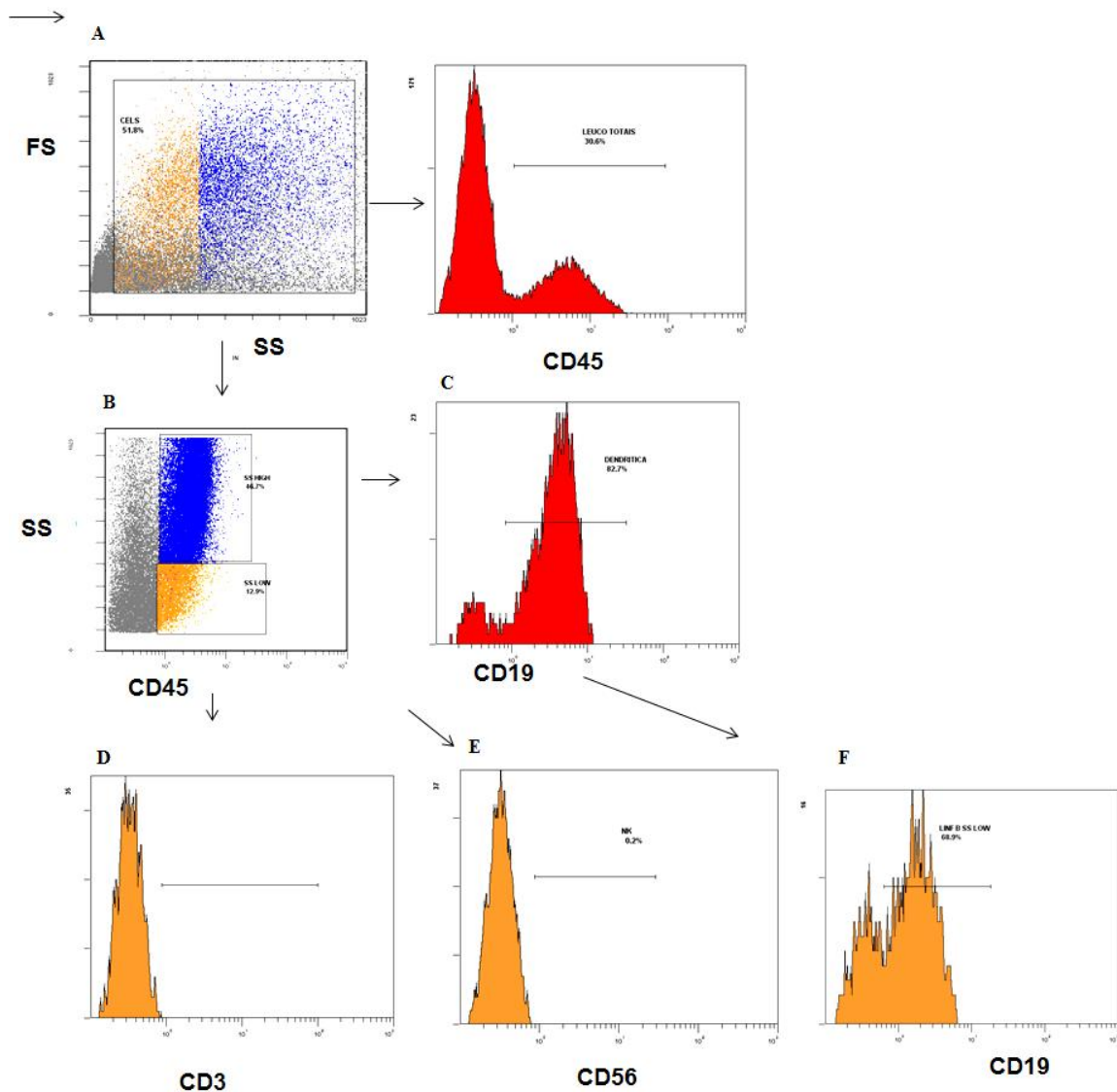


Figura 12. Protocolo de análise utilizado para avaliar a distribuição (%) de leucócitos totais, linfócitos B, linfócitos T, Células NK.

O *dot plot* A representa o perfil *scatter* de uma amostra baseado em tamanho (FSC) e na granularidade (SSC) das células. Neste *plot*, um *gate* (células) foi criado eletronicamente para cercar as células de interesse, excluindo os debris da análise. O *dot plot* B, *gated* nas células representa uma análise paramétrica dupla, de SSC vs. CD45, no qual podemos definir duas populações celulares – células mononucleares (SSC *low*/CD45⁺) e granulócitos (SSC *high*/CD45⁺). Os histogramas D, E, F e C representam a intensidade de fluorescência para mAB anti-CD3 (*gated* em SS *low*); anti-CD56 (*gated* em SS *low*); anti-CD19 (*gated* em SS *low* e *gated* em SS *high*), respectivamente. As análises das amostras de saliva foram feitas seguindo este mesmo protocolo.

As amostras foram transferidas para os tubos de citometria de fluxo (Falcom 352054 5 mL poliestireno, Becton & Dickinson, Saint Louis, EUA) e adquiridas, em um mínimo de 200 mil eventos, no Citômetro de fluxo EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, EUA) e analisadas no software EXPO32 e Kaluza (Beckman Coulter),

O ajuste de compensação dos sinais interferentes foi realizado pela aquisição de amostras marcadas com um único fluorocromo relacionado e foi baseado nos critérios de aproximação dos valores de MFI (intensidade de fluorescência média) em regiões *quadstats* de *dot plots* de dupla cor.

Os resultados foram obtidos pelos percentuais de células positivas para determinado anticorpo monoclonal.

4.3.7 Detecção de microrganismos por PCR.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade em Saúde, da FIOCRUZ- AM.

4.3.7.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi feita utilizando-se a técnica de fenol-clorofórmio (SAMBROOK ; RUSSEL, 2001), com algumas modificações, de acordo com o protocolo: as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida, centrifugadas a 12.400 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram acrescentados 150 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6) e 200 µL de NaCl. As amostras foram homogeneizadas em vortex até completa solubilização. Então, foram adicionados 150 µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% e as amostras foram novamente homogeneizadas. Após, as amostras foram incubadas em banho seco por 10 minutos a 100°C e, em seguida, foram colocadas em gelo por 10 minutos, para a realização do choque térmico. O banho seco e o choque térmico foram novamente executados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.100 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL (Eppendorf) e o *pellet*, descartado. Um mililitro de isopropanol foi adicionado na amostra e observado a formação da “nuvem” de DNA. As amostras foram novamente colocadas em gelo por 10 minutos e, logo após, centrifugadas a 12.100 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 12.100 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Este último passo foi repetido, o sobrenadante descartado e o *pellet* seco a vácuo, a 37°C, por 15 minutos. Logo após foram adicionados 60 µL de TE e as amostras armazenadas, *overnight*, a 4°C.

4.3.7.2 Verificação da qualidade da extração o DNA

Para garantir a viabilidade do material extraído, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose a 1% submerso em tampão TBE 0,5X (Tampão de Tris HCl, EDTA e ácido bórico), utilizando para visualização o brometo de etídio (10

mg/mL). Os resultados obtidos foram visualizados em transiluminador em luz ultravioleta e fotografados em seguida para serem analisados.

4.3.7.3 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os DNA extraídos dos biofilmes subgingivais e das salivas foram submetidos à técnica de PCR. Iniciadores específicos para DNA ribossomal 16S de *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram utilizados como descrito por Ashimoto e colaboradores (1996) de acordo com o quadro 2:

Quadro 2. Sequência dos iniciadores específicos utilizados na PCR.

Micro-organismo	Iniciadores espécie-específicos para PCR Senso Anti-senso	Tamanho do produto (pb)
rDNA 16S	GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	786-1,387 (602)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTAAT	889 – 911 (360)
<i>Campylobacter rectus</i>	TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT	415-1,012(598)
<i>Eikenella. corrodens</i>	CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C	169-856 (688)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	729-1,132 (404)
<i>Prevotella intermedia</i>	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	458-1,032 (575)
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	219-1,022 (804)
<i>Tanerella forsythia</i>	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA	120-760 (641)

	TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	
<i>Treponema denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	193-508 (316)

Para controle positivo procedeu-se a busca das cepas em uma amostra proveniente de um paciente com periodontite crônica grave por meio da comparação do tamanho das bandas obtidas com os dados dos controles positivos publicados no trabalho de Ashimoto e colaboradores (1996) de acordo com a figura 13.

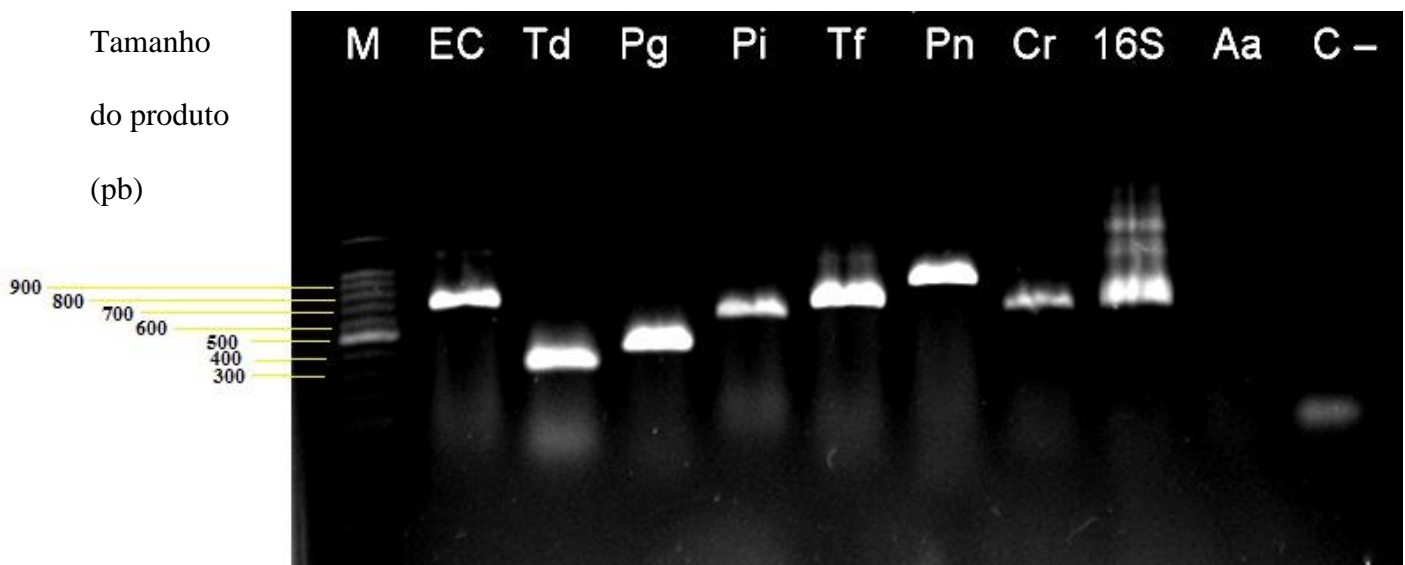


Figura 13. Controle positivo da PCR. **M:** marcador, **EC:** *E.coli*, **Td:** *T.denticola*, **Pi:** *P.intermedia*, **Tf:** *T.forsythia*, **Pn:** *P.nigrescens*, **Cr:** *Campylobacter rectus*, **16S:** DNA 16S rRNA **Aa:** *A. actinomycetencomitans*, **C-:** controle negativo.

Como controle negativo ou branco (*BCO*), em cada reação, foi incluído um tubo com água Milli-Q estéril e todos os outros reagentes, excluindo o DNA extraído. Outro controle negativo foi realizado, utilizando-se um iniciador para *E.coli* cujo alvo são os genes bacterianos 16S rRNA.

As reações foram preparadas com o volume total de 12,5 µL de acordo com o seguinte sistema:

H ₂ O	6,5 µL
Tp 10X	1,5 µL
MgCl ₂ 2,5mM	0,25 µL
dNTP 0,25 mM	1,0 µL
<i>Primer 1</i> 5mM	0,75 µL
<i>Primer 2</i> 5mM	0,75 µL
Taq DNA Polimerase (2,5U/ µL)	0,25 µL
DNA (amostra)	1,5 µL
Volume final	12,5 µl

Os ciclos a que as reações foram submetidas foram realizados de acordo com Ashimoto e colaboradores (1996), com algumas modificações:

Desnaturação inicial a 95°C – 2 minutos	} 36 ciclos
Desnaturação a 95°C – 30 segundos	
Anelamento a 54°C – 1 minuto	
Extensão a 72°C – 2 minutos	
Extensão final a 72°C – 10 minutos	

4.3.6.4 Detecção dos produtos da PCR

Após a PCR, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 0,5X, utilizando para visualização o brometo de etídio (10 mg/mL). Os resultados obtidos foram visualizados em transiluminador (LOCCUS

BIOTECNOLOGIA, RJ, Brasil) em luz ultravioleta e fotografados (sistema digital) em seguida para serem analisados.

4.3.6.5 Preparação do Gel

Para uma cuba de eletroforese foram produzidos géis de agarose a 1,5 %. Por isso, mistura de agarose e de tampão TBE 0,5X foi dissolvida sob aquecimento e resfriada aproximadamente até 45°C. A mistura foi vertida sobre o suporte de gel da cuba de eletroforese, onde foram posicionados os pentes, deixando a mistura em temperatura ambiente até completa solidificação. Após a solidificação, o suporte contendo o gel foi posicionado na cuba de eletroforese, na qual foi adicionado volume de tampão TBE 0,5X cobrindo a superfície do gel. Os pentes foram removidos do gel solidificado, com formação dos poços para aplicação das amostras (FUJIMOTO, 2004).

4.3.6.6 Preparação das amostras, aplicação do gel e eletroforese

Inicialmente, sobre parafilme, foi homogeneizada uma alíquota de 5µL de cada amplificação com 2µL de azul de bromofenol. Também foi preparada uma fração do produto de referência de tamanhos de fragmentos de DNA, denominado *ladder*, selecionado de acordo com os iniciadores utilizados. Este preparo consistiu da mistura de 5µL do tampão de amostra com 2µL da solução de estoque do *ladder*. 10 µL do “ladder” foi colocado no primeiro poço de gel. As amostras foram homogeneizadas e transferidas com auxílio de micropipeta para cada um dos poços de gel subsequentes ao do *ladder*. Foi efetuada a corrida eletroforética com programação de 100 V (voltagem), por 40 minutos.

4.3.6.7 Visualização dos produtos de PCR

Foi efetuada sob luz ultravioleta (UV). As imagens obtidas foram gravadas para documentação e posterior análise dos produtos amplificados.

A análise do gel consistiu na visualização ou não dos produtos amplificados, comparativamente com os produtos amplificados relativos aos controles positivos e negativos e ao “ladder” selecionado em cada PCR.

5. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir não foram enviados, ainda, para a publicação.

5.1. Dados Clínicos

Na tabela 1 estão expressos os dados obtidos dos pacientes com ou sem periodontite crônica.

Tabela 1. Características clínicas da população de estudo.

Características	Grupo Controle	Grupo Teste
Número de participantes	12	32
Homens % (n)	8,3% (1)	21,8% (7)
Mulheres % (n)	91,7% (11)	78,2% (25)
Fumantes %	0%	0%
Idade (anos) ± DP	42,58±8,152	39,91±8,741
Fluxo salivar (mL/min) ± DP	1,018±0,7937	0,6825±0,3273
Índice de placa (%) ± DP *	80,90±29,24	17,73±22,26
Sítios com sangramento à sondagem ± DP* (%)	45,51±32,88	5,700±6,212
Média da profundidade de sondagem dos sítios de coleta de amostra (mm) ± DP* ⁺	5,742 ± 1,254	2,906±0,2961
Média do nível de inserção dos sítios de coleta de amostra (mm) ± DP * ⁺	6,604±1,980	2,880±0,3317

* $p < 0,005$, diferença significativa entre os grupos teste e controle.

⁺Média dos sítios de coleta das amostras de biofilme com maior profundidade de sondagem por indivíduo entre os grupos teste e controle.

5.2 Microrganismos presentes na saliva

Foram analisadas apenas as amostras de saliva, pois não obtivemos sucesso na extração de DNA proveniente das amostras de biofilme subgingival.

Das 16 amostras do grupo teste, em quatro não houve sucesso na extração de DNA, sendo excluídas da análise. Assim, a frequência das bactérias detectadas nas 12 amostras

analisadas foram as seguintes: 100% (12) foram positivas para *Tanerella forsythia*, 91,7% (11) foram positivas para *Phorphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella nigrecens* e *Campylobacter rectus*, 75% (9) foram positivas para *Prevotella intermedia*, e 66,6% (8) foram positivas para *Eikenella corrodens*. No grupo controle, das 32 amostras analisadas 18,8% (6) foram positivas para *Campylobacter rectus*, 12,5% (4) foram positivas para *Tanerella forsythia* e *Prevotella nigrecens*, 9,4% (3) foram positivas para *Prevotella intermedia*, 6,3% (2) foram positivas para *Treponema denticola*, e *Eikenella corrodens* e 3,2% (1) foi positiva para *Phorphyromonas gingivalis* (FIG. 14).

Do total de amostras do grupo teste (12), 50% (6) apresentavam associação de 7 patógenos (como exemplo, na figura 15), seguidas 25% (3) com 6 patógenos, 16,7% (2) com 5 patógenos e 8,4% (1) amostra com 3 patógenos. No grupo controle, das 32 amostras, 59,4% (19) não apresentavam periodontopatógenos, seguidas por 3,1% (1) com 6 patógenos, 6,2% (2) com 5 patógenos, e 3,1% (1) com 3, 2 e 1 patógenos, cada. Na tabela 2 encontram-se detalhadas as associações encontradas entre os patógenos investigados nos testes e controles.

Frequência (%)

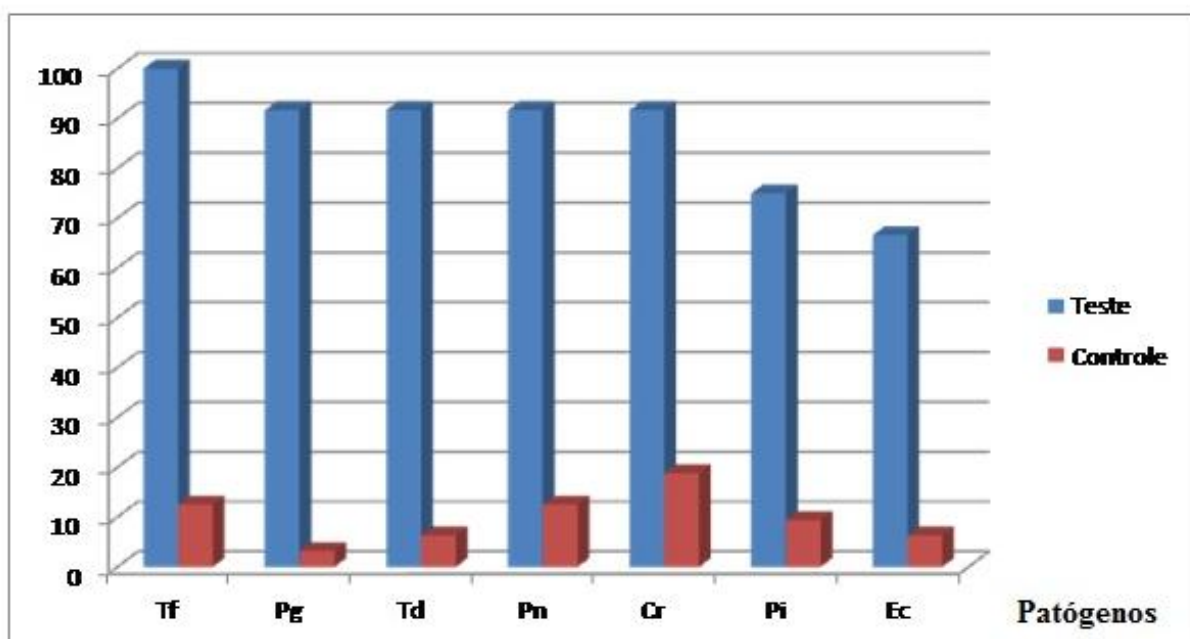


Figura 14. Frequência de patógenos periodontais em indivíduos com periodontite crônica (teste) e indivíduos saudáveis (controle). Eixo y (%), eixo x: periodontopatógenos: Tf: *Tannerella forsythia*, Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Td: *Treponema denticola*, Pn: *Prevotella nigrescens*, Cr: *Campylobacter rectus*, Pi: *Prevotella intermedia*, Ec: *Eikenella corrodens*

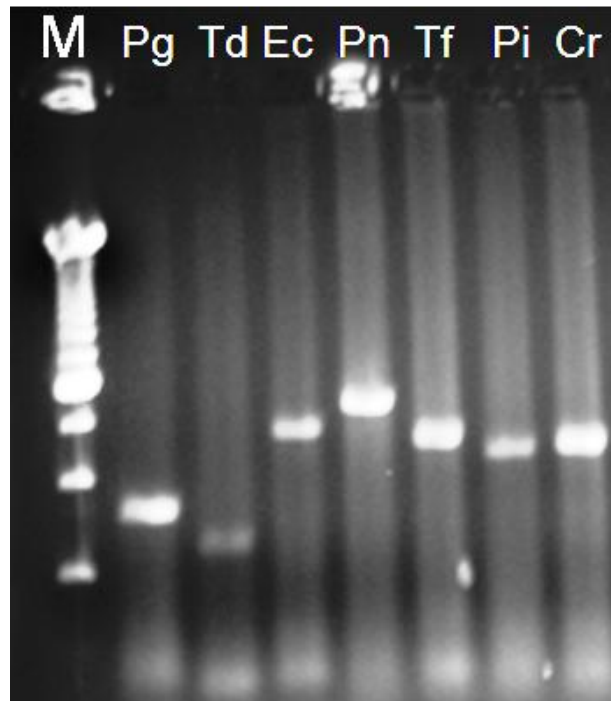


Figura 15. Eletroforese da PCR para detecção de periodontopatógenos na saliva. M = marcador ladder 100 kb. Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Td: *Treponema denticola*, Ec: *Eikenella corrodens*, Pn: *Prevotella nigrescens*, Tf: *Tannerella forsythia*, Pi: *Prevotella intermedia*, Cr: *Campylobacter rectus*.

Tabela 2. Frequência e distribuição dos patógenos periodontais isolados ou associados nas amostras de saliva nos grupos teste e controle.

Prevalência bacteriana	Teste % (n)	Controle % (n)
<i>Tannerella forsythia</i> (Tf)	100 (12)	12,5 (4)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)	91,7 (11)	3,2 (1)
<i>Treponema denticola</i> (Td)	91,7 (11)	6,3 (2)
<i>Prevotella nigrescens</i> (Pn)	91,7 (11)	12,5 (4)
<i>Campylobacter rectus</i> (Cr)	91,7 (11)	18,8 (6)
<i>Prevotella intermedia</i> (Pi)	75 (9)	9,4 (3)
<i>Eikenella corrodens</i> (Ec)	66,6 (8)	6,3 (2)
Bactérias isoladas		
<i>C. rectus</i> (Cr)	0 (0)	3,2 (1)
Associações microbianas		
Sete	50 (6)	0 (0)
Seis		
Tf + Pg + Td + Pn + Pi + Cr	16,6 (2)	0 (0)
Tf + Pg + Td + Pn + Pi + Ec	8,33 (1)	0 (0)
Tf + Td + Pn + Pi + Cr + Ec	0 (0)	3,2 (1)
Cinco		

Tf + Pg + Td + Pn + Cr	8,33 (1)	0 (0)
Tf + Td + Pn + Cr + Ec	8,33 (1)	0 (0)
Tf + Pn + Pi + Cr + Ec	0 (0)	3,2 (1)
Tf + Pg + Td + Pi + Cr	0 (0)	3,2 (1)
Três		
Tf + Pg + Cr	8,33 (1)	0 (0)
Tf + Pn + Cr	0 (0)	3,2 (1)
Dois		
Pn, Cr	0 (0)	3,2 (1)

6 DISCUSSÃO

Embora o fluido crevicular gengival seja frequentemente escolhido como amostragem para detecção de patógenos periodontais, a saliva é um fluido de fácil obtenção que permite o rastreo microbiológico em populações de grandes dimensões (MALAMUD et al. 2005; TABA JR et al 2005) e por isso, seu uso tem sido avaliado por alguns estudos para auxílio no diagnóstico em periodontia (RUDNEY; STAIKOV, 2002; MAGER et al., 2003; CORTELLI et al., 2005). Testa e colaboradores (1999) concluíram que amostras de saliva mostraram-se efetivas para detectar microrganismos periodontais tanto quanto amostras de biofilmes subgengivais em pacientes com doença periodontal. Umeda e colaboradores (1998) observaram que amostras de saliva são mais precisas que o biofilme subgengival para a detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola*. Contudo, os autores sugeriram que para detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é prudente associar a coleta de saliva à coleta de biofilme subgengival. No presente trabalho, primeiramente, foi planejado tanto a coleta de biofilme subgengival quanto a da saliva proveniente de pacientes teste e controles, contudo pouco sucesso foi obtido nas extrações de DNA e nas detecções de patógenos periodontais por PCR nas amostras de biofilme subgengival. Além disso, mesmo nas amostras de saliva, não foi possível detectar a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, ainda, foi constatado que houve troca de uma base nitrogenada, na sequência do iniciador específico para o patógeno, pela empresa responsável na produção e venda do *primer*. Então, optamos por excluir este patógeno das análises preliminares até que novos ensaios com o iniciador correto sejam realizados.

Durante os ensaios de padronização para cada patógeno, foi observada que a temperatura de 54°C foi ideal para o anelamento de sete dos oito periodontopatógenos investigados (Figura 13). Inicialmente houve a tentativa de padronizar o ensaio de detecção

por PCR multiplex, já que houve coincidência na temperatura de anelamento. No entanto, após realização do anelamento e visualização dos produtos do PCR, havia superposição de bandas de diferentes patógenos, subestimando o resultado obtido (Dados não mostrados). Então, optamos por descartar esse tipo de ensaio e realizar o PCR simplex para as amostras positivas para os microrganismos detectados no multiplex.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com outros estudos que evidenciam que a periodontite crônica tem, como um de seus fatores etiológicos, a associação de bactérias periodontopatogênicas (ASHIMOTO et al., 1996; SOCRANSCKY et al., 1998; LOPEZ et al, 2004; LUBA, 2006). Em nosso estudo, todas as amostras de saliva positivas para periodontopatógenos, no PCR, apresentavam associação de duas ou mais bactérias em ambos os grupos (teste e controle), com exceção de uma amostra no grupo controle, onde *Campylobacter rectus* foi detectado isoladamente. Isso sugere que dificilmente um patógeno periodontal pode atuar isoladamente e que necessita da cooperação de outros microrganismos para dar início ou progressão à periodontite crônica.

Estudos têm demonstrado também que alguns indivíduos periodontalmente saudáveis apresentam periodontopatógenos como parte do seu biofilme supra ou subgingival. (ASIKAINEN et al., 1986; DAHLE'N et al., 1992; GMU'R, 1994; DI MURRO et al., 1997; ELLWOOD et al.,1997; DOGAN et al., 1999; GMU'R et al., 1999; KAMMA et al., 2000; LI et al., 2004; HAYASHI et al., 2006; PAPAIOANNOU et al., 2009). Quando presentes em sítios saudáveis, estes microrganismos são encontrados frequentemente em pequeno número e lá ficam por muito tempo sem, necessariamente, levar à doença periodontal. Alguns autores sugerem que a manutenção desses patógenos periodontais como parte da microbiota normal é provavelmente benéfica visto que isto seria necessário para o desenvolvimento e maturação da imunidade inata e adquirida no hospedeiro (DIXON et al., 2004; TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2004; DARVEAU, 2009; SLACK et al., 2009).

Frequentemente algumas espécies de periodontopatógenos (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*) têm sido identificadas como prováveis agentes etiológicos na periodontite crônica (SANZ et al., 2000; KIBAYASHI et al., 2007). Socransky e colaboradores (1998) em um estudo envolvendo 13.261 amostras de biofilme subgingival de indivíduos saudáveis ou com doença periodontal demonstrou que espécies de microrganismos periodontais podem ser classificadas em cinco maiores complexos bacterianos. O complexo composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* foi fortemente relacionado a parâmetros clínicos de periodontite como maiores profundidades de bolsa e sangramento à sondagem. Este complexo bacteriano foi denominado de complexo vermelho e, desde então, têm sido fortemente associado à periodontite crônica (HAFFAJEE et al., 1998; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; PAPAPANOU et al., 2002; SOCRANSKY et al., 2002). Outro estudo recente realizado com adultos, na Finlândia, por Kononen et al. (2007) também mostrou associação positiva da presença de bolsas profundas com a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Outro complexo também foi associado à periodontite crônica, descrito por Socransky e colaboradores, em 1998, o então denominado complexo laranja, inclui espécies como *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. Os autores sugeriram que uma sucessão ecológica de espécies bacterianas devem estar envolvidas com o início e progressão da periodontite crônica até a colonização pelo complexo laranja, como já descrito anteriormente na revisão de literatura deste trabalho.

Um estudo realizado por Luba, em 2006, caracterizou microbiologicamente indivíduos portadores de periodontite crônica e periodontite agressiva generalizada. Neste estudo, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* estavam em

concentração, proporções e prevalência mais elevados em indivíduos do grupo com periodontite crônica do que em pacientes periodontalmente saudáveis (grupo controle). Os complexos laranja e vermelho representaram as maiores proporções no grupo com periodontite crônica (30,6% e 24,9%, respectivamente) que no grupo controle que apresentou apenas 4,3% de complexo vermelho. Estes dados corroboram com os reportados por Lopez e seus colaboradores (2004) e Colombo e colaboradores (2002), que buscaram avaliar 40 espécies subgingivais em 26 chilenos e 25 brasileiros com periodontite crônica, respectivamente. No estudo de Lopez e colaboradores (2004) encontraram as espécies do complexo vermelho além de *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus* em mais de 90% dos sítios estudados. Além disso, as espécies relacionadas aos demais complexos foram encontradas em mais de 75% dos sítios analisados, com exceção de *Prevotella intermedia* que foi encontrada em apenas 60% dos sítios.

Estes estudos, no entanto, divergem dos resultados obtidos em pesquisa realizada com indivíduos norte-americanos, suecos (HAFFAJEE et al., 2004) e mexicanos (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006a,b) que apresentaram proporções e níveis mais reduzidos destes patógenos. Essas divergências podem refletir as diferenças na microbiota específica das populações das diferentes regiões geográficas.

Ashimoto (1996) encontrou prevalência de 86% para *Tannerella. forsythia*, 80% para *Eikenella corrodens*, 74% para *Campylobacter rectus*, 70% para *Porphyromonas gingivalis*, 58% para *Prevotella intermedia*, 54% para *Treponema denticola* e 52% para *Prevotella nigrescens* em pacientes com periodontite avançada, num estudo investigando a pesquisa de oito patógenos periodontais por PCR.

Lafaurie e colaboradores (2007), na Colômbia, encontraram em pacientes com periodontite crônica ou pacientes periodontalmente saudáveis as seguintes frequências,

respectivamente: *Porphyromonas gingivalis* de 76% e 14,5%, *Tannerella forsythia* aproximadamente 62% e 3,1% e *Campylobacter rectus* aproximadamente 38% e 22,7%.

Byrne et al. (2009), após análise de 108 amostras subgingivais, observou que *Porphyromonas gingivalis* foi encontrada em todas as amostras associada à presença de *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. No entanto, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* foram frequentemente encontradas na ausência de *Porphyromonas gingivalis*. Isto pode sugerir que *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* podem facilitar a emergência de *Porphyromonas gingivalis* pela produção de um ambiente propício à colonização e proliferação deste patógeno. Um estudo demonstrou a sinergia positiva entre *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilme (YAMADA et al, 2005). Contudo, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* tem demonstrado coagregar (ONAGAWA et al, 1994) e exibir aprimoramento mutualístico de crescimento in vitro onde cada espécie produzia um ácido graxo que estimulava o crescimento da outra (GRENIER, 1992).

A interação entre *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* na progressão da doença periodontal em sítios afetados foi evidente no estudo de Chalabi e colaboradores (2010). Análise de regressão logística revelou que *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* foram estatisticamente associadas a lesões com periodontite crônica com profundidades de bolsa ≥ 6 mm, mas não com sítios periodontais com profundidades ≤ 3 mm. *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* foram detectadas em, respectivamente, 95 e 75% de sítios com profundidade de sondagem ≥ 6 mm .

No estudo de Choi e colaboradores (2000), *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema* sp. e *Tannerella forsythia* foram detectados em aproximadamente 96% dos sítios avaliados com periodontite crônica, enquanto que *Prevotella intermedia* foi diagnosticada em 71% dos sítios pesquisados. Em sítios periodontalmente saudáveis, no grupo controle, a frequência

encontrada dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema* sp., *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia* foi de 18, 22, 18 e 2%, respectivamente.

Em um estudo realizado por Fernandes e colaboradores (2007) com indivíduos periodontalmente saudáveis com idades entre 2-18 anos, a prevalência geral, independente de idade, sexo ou local da amostra, encontrada para as bactérias foi: *Campylobacter rectus* (94%), *Tannerella forsythia* (40%), *Prevotella intermedia* (23%), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (15%), *Porphyromonas gingivalis* (2%). Este último patógeno foi encontrado apenas no sulco gengival de dois indivíduos do grupo entre 13 e 18 anos.

Os dados preliminares obtidos no presente estudo, bem como em outros citados acima, demonstram que a periodontite crônica está relacionada, principalmente com patógenos que fazem parte do complexo vermelho e laranja, descritos por Socansckry, em 1998, e que a progressão da doença e a proporção limiar de uma espécie bacteriana, que está associada com um risco significativamente aumentado de doença futura, em um determinado local, podem ser dependentes dos níveis de outras espécies de bactérias presentes nesse local.

7 ARTIGO ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO

IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR E PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS NA SALIVA EM ADULTOS COM OU SEM PERIODONTITE CRÔNICA

NAIFF, P.F.^{1,2*}; FERRAZ, R.^{3,4}; CUNHA, C.F.⁴; ORLANDI, P.P.⁶; BERTHO, A.L.^{3,4,5**}; DOS-SANTOS, M.C.¹

¹ Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

² Professora do Curso de Odontologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

³ Plataforma de Citometria de Fluxo – Núcleo de Análise e *Sorting*, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁴ Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁵ Curso de Biomedicina, Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ, Brasil;

⁶ Coordenação de Biodiversidade em Saúde, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manaus, AM, Brasil.

* estes resultados fazem parte do trabalho exigido para a obtenção do título de Mestre.

** Autor correspondente: Álvaro Luiz Bertho, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 21045-900 email:bert@ioc.fiocruz.br

KEY WORDS: Citometria de fluxo, células, imunoglobulina secretória A, imunoglobulina G, imunoglobulina M, saliva, periodontite crônica.

RESUMO

Até o presente, a imunofenotipagem por citometria de fluxo não havia sido utilizada para investigar padrões imunológicos em amostras de saliva provenientes de indivíduos com processos bucais inflamatórios. Pelo fato da periodontite ser uma doença inflamatória e infecciosa, a resposta imune pode resultar em uma mudança na população leucocitária presente na saliva, quando comparada a resposta de indivíduos periodontalmente saudáveis. A análise da saliva pode ser um método não invasivo para avaliação da saúde bucal. O objetivo do presente estudo foi avaliar, pela técnica de citometria de fluxo, a frequência de linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer* bem como a frequência da população de leucócitos na saliva de indivíduos com ou sem periodontite crônica. Paralelamente, foram determinados, por Dot-ELISA, os títulos das imunoglobulinas totais das classes A, G e M presentes na saliva destes indivíduos. Por meio da imunofenotipagem foi observado que os pacientes com periodontite crônica apresentaram maior frequência de leucócitos ($50,43 \pm 5,1$) e de linfócitos B ($50,93 \pm 6,1$) em relação aos indivíduos sem patologias bucais ($22,69 \pm 0,19$ e $13,9 \pm 2,6$, respectivamente). Quanto às imunoglobulinas, pôde-se observar, apenas, o aumento não significativo dos títulos de IgG nos indivíduos com periodontite crônica. Os resultados obtidos demonstram que a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta eficaz para determinação do perfil leucocitário, proveniente de amostras de saliva de pacientes com periodontite crônica.

INTRODUÇÃO

A presença local de um sistema imunológico eficiente tem significativa importância na resposta do hospedeiro, principalmente se considerarmos que os fluidos orais contêm imunoglobulinas (Ig) específicas capazes de neutralizar ou de facilitar a fagocitose e, conseqüentemente, a destruição de patógenos (CHALLACOMBE, 1995).

As imunoglobulinas IgA, IgG e IgM são importantes fatores de defesa da saliva. Elas influenciam na microbiota oral interferindo na sua aderência ou inibindo o seu metabolismo celular. Os pacientes com doenças periodontais apresentam maiores concentrações destas imunoglobulinas na saliva quando comparados a indivíduos com o periodonto saudável. Estes níveis salivares de imunoglobulinas reduzem consideravelmente após a terapia periodontal (SEEMAN et al. 2004; REIFF, 1984 APUD GIANNOBILE ET al., 2009). Segundo Ford e colaboradores (2010), a resposta imunológica primária, na periodontite crônica, ocorre após a colonização do sulco gengival por patógenos periodontais. As bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* além dos demais periodontopatógenos estimulam, dentre outros mediadores inflamatórios, a produção de citocinas e quimiocinas por células do epitélio gengival, que resulta na expressão de moléculas de adesão, aumento na permeabilidade dos capilares gengivais e quimiotaxia de neutrófilos do epitélio juncional para o sulco gengival. Esta resposta inicial promove a migração de um infiltrado inflamatório composto por células T perivasculares e macrófagos no tecido conjuntivo. Caso a resposta imunológica celular não consiga controlar a infecção, ocorre o recrutamento de células B que se diferenciam em plasmócitos responsáveis pela produção de anticorpos.

Ao longo dos últimos quarenta anos, a citometria de fluxo veio ganhando espaço no cenário científico, apresentando-se como a principal ferramenta utilizada para a caracterização fenotípica e funcional simultânea de diversas populações celulares bem como de unidades celulares, tendo um importante papel no avanço dos conhecimentos em Imunologia. Na Odontologia, a citometria de fluxo tem sido recentemente utilizada como uma ferramenta para avaliar a distribuição da população de leucócitos em amostras de saliva de indivíduos saudáveis (VIDOVIC A. et al. 2011) e naqueles submetidos a situações de *stress* psicológico (DOS-SANTOS et al. 2009). Neste cenário, o objetivo do presente estudo foi avaliar, pela técnica de citometria de fluxo, a frequência de linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer* (NK) bem como a frequência total da população de leucócitos na saliva de indivíduos com ou sem periodontite crônica. Paralelamente, foi realizada ainda a titulação das imunoglobulinas totais das classes A, G e M destes indivíduos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com parecer de número CAAE – 0330.0.115.000-10.

As amostras de saliva foram obtidas de pacientes portadores de periodontite crônica (grupo teste; n=12), atendidos na Clínica de Periodontia, da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil, no período de Abril a Setembro de 2011. Participaram ainda do estudo pacientes sem evidência clínica e radiográfica de periodontite, (grupo controle; n= 27). Todos os indivíduos de ambos os grupos foram, individualmente, informados sobre o estudo proposto e concordaram com sua participação na pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido. Para o grupo teste foram selecionados indivíduos com idade ≥ 30 anos, com o diagnóstico clínico e radiográfico de periodontite crônica (no mínimo 6 sítios com evidência radiográfica de perda óssea, e profundidade de sondagem ≥ 4 mm além de perda de inserção ≥ 3 mm). Para o grupo controle foram selecionados indivíduos com idade ≥ 30 anos, sem periodontite (com sangramento à sondagem $< 20\%$, perda de inserção < 3 mm, profundidade de sondagem ≤ 3 mm). Neste

estudo foram excluídos os indivíduos que: a) apresentassem outras patologias bucais; b) tivessem passado por tratamento periodontal nos últimos seis meses, c) tivessem feito uso continuado de medicamentos como antibióticos, imunomoduladores ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses, d) apresentassem doenças sistêmicas que interferissem na condição periodontal (diabetes, HIV e, desordens imunológicas e) estivessem grávidas ou f) pertencessem à etnias indígenas.

Obtenção de Amostra

Foram utilizadas amostras de saliva, sem qualquer tipo de estímulo, coletadas de cada indivíduo pela manhã, antes do desjejum (entre nove e dez horas da manhã) e sem qualquer procedimento de higiene dental prévio. Os participantes permaneciam cinco minutos com a boca fechada e com a ponta da língua no palato duro. Em seguida eram orientados a despejar a saliva em tubos coletores de 50 mL (Falcon) previamente esterilizados. Para a fenotipagem das células, 500 µL de cada amostra de saliva foram transferidos para microtubo de 1,5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) contendo paraformaldeído a 1% (PFA) (na proporção 1:1) e armazenadas em geladeira a 4°C por até 7 meses. Para a titulação das imunoglobulinas, 100 µL de saliva foram alíquotados em microtubo estéril contendo 5 µL do inibidor de protease - fluoreto de metil-fenil-sulfonila (PMSF) e armazenados a -80°C, até o momento do uso.

Dot-ELISA

A titulação das Imunoglobulinas das classes A, G e M, presentes nas amostras de saliva dos participantes da pesquisa, foi realizada por Dot-ELISA (MATOS-GOMES et al., 2010) com algumas modificações. Dois microlitros de cada diluição seriada das salivas (1:100, 1:200, 1:400 até 1:204.800 para IgA e 1:10, 1:20, 1:40 até 1:20.480 para IgG e IgM) foram aplicados nas membranas de nitrocelulose (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 2 horas com leite em pó desnatado a 5% (Molico®, Nestlé, Araçatuba, SP, BR), dissolvido em Tampão Tris Salina (TBS, pH 7,5). As membranas foram incubadas durante quarenta e cinco minutos em temperatura ambiente com os seguintes conjugados marcados com peroxidase: anti-IgA humano (cadeia α); anti-IgM humano (Fc 5µ); e anti-IgG humano (H+L) (PIERCE, IL, USA), todos provenientes de camundongo. Os conjugados foram então diluídos em TBS (pH 7,5) na proporção de 1:1000. Após quatro lavagens com Tampão Fosfato Salina (PBS, pH 7,2), as reações anticorpo-conjugado foram reveladas com cinco miligramas de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (BIO-RAD Laboratories, CA, USA) diluídos em 30mL de TBS pH 7,5, na presença de peróxido de hidrogênio P.A. a 0,015%. A reação de coloração por precipitação do DAB foi interrompida com água destilada e as membranas foram secas entre folhas de papel de filtro e as leituras realizadas, para obtenção do ponto final (título) de cada reação. Para a análise estatística os títulos das imunoglobulinas foram identificados por uma escala para facilitar a análise dos dados.

Citometria de fluxo (FCM)

Marcação das amostras

Antes de submeter as amostras ao protocolo citofluorimétrico de marcação com anticorpos monoclonais foram adicionados 500 µL de PBS pH 7.0 à amostra, sendo então

centrifugada a 2000 rpm, por 5 minutos, a 4°C para a retirada do muco. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de PBS contendo 0,1% de azida sódica e 2% de soro fetal bovino (PBS_{Az}). A seguir, foi adicionado à suspensão 5 µL de reagente de anticorpo monoclonal (mABs) de quatro cores (TetraCHROME, Beckman Coulter): anti-CD45/FITC; anti-CD56/PE; anti-CD19/ECD; anti-CD3/PE-Cy5. Após incubação por 20 minutos, a 4°C, protegidas da luz, as amostras foram lavadas com 500 µL de PBS_{Az} (2000 rpm, por 5 minutos a 4°C). Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de PFA para a fixação da marcação. Como controles negativos de marcação foram utilizados anticorpos monoclonais isotípicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos do ensaio fenotípico e amostras não marcadas.

Aquisição e análises

As amostras foram adquiridas, em um mínimo de 200 mil eventos, no citômetro de fluxo EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, EUA) e analisadas nos softwares EXPO32 e Kaluza (Beckman Coulter) na plataforma de Citometria de Fluxo no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Inicialmente, para a padronização do protocolo de análise das amostras de saliva foi realizada a aquisição de uma amostra de sangue total de um indivíduo sadio, a partir da qual *gates* foram delimitados de acordo com padrões já conhecidos (dados não mostrados).

A figura 1 mostra o protocolo de FCM utilizado na análise das amostras de saliva. O *dot plot* A representa o perfil *scatter* de uma amostra baseado em tamanho (FSC) e granularidade (SSC) das células. Neste *plot*, um *gate* (células) foi criado eletronicamente para cercar as células de interesse, excluindo os debris da análise. O *dot plot* B, *gated* nas células representa uma análise paramétrica dupla, de SSC vs. CD45, no qual podemos definir duas populações celulares – células mononucleares (SSC low/CD45+) e granulócitos (SSC high/CD45⁺). Os histogramas C, D, E, F representam a intensidade de fluorescência para as células marcadas com mABs anti-CD3 (*gated* em SS low); anti-CD56 (*gated* em SS low); anti-CD19 (*gated* em SS low e SS high), respectivamente.

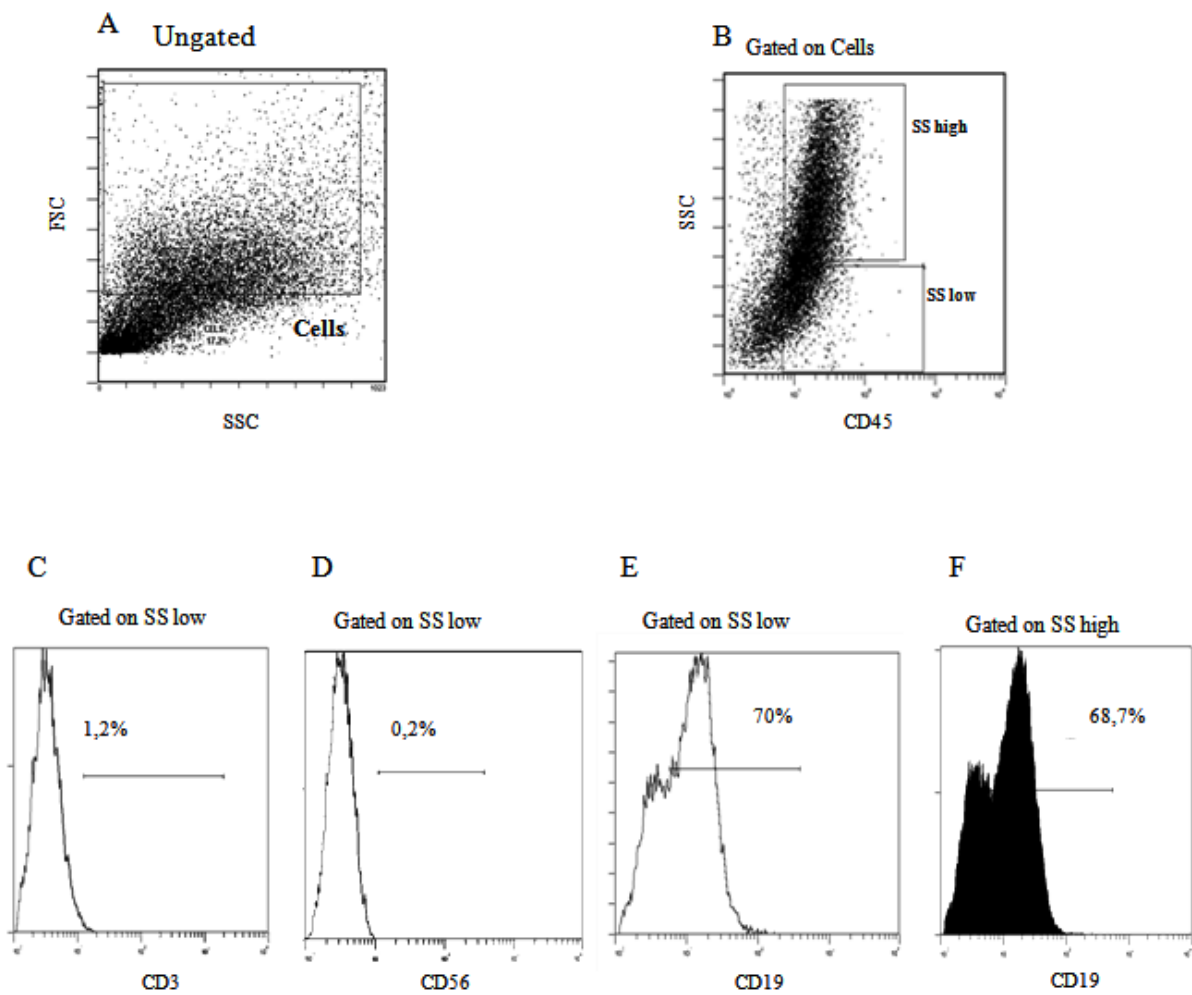


Figura 1. Protocolo de FCM utilizado.

O ajuste de compensação dos sinais interferentes foi realizado pela aquisição de amostras marcadas com um único fluorocromo relacionado e foi baseado nos critérios de aproximação dos valores de MFI (mean fluorescence intensity) em regiões quad-stats de dot plots de dupla cor.

Os resultados foram baseados nos percentuais de células positivas para uma marcação específica de anticorpo monoclonal.

Análise estatística

Os valores de p foram obtidos pelo teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de p foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Dot ELISA

Os resultados obtidos estão expressos na figura 2. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na titulação de IgA ($p=0,4603$), IgG ($p=0,1113$) ou IgM ($p=6,052$) entres os grupos teste e controle.

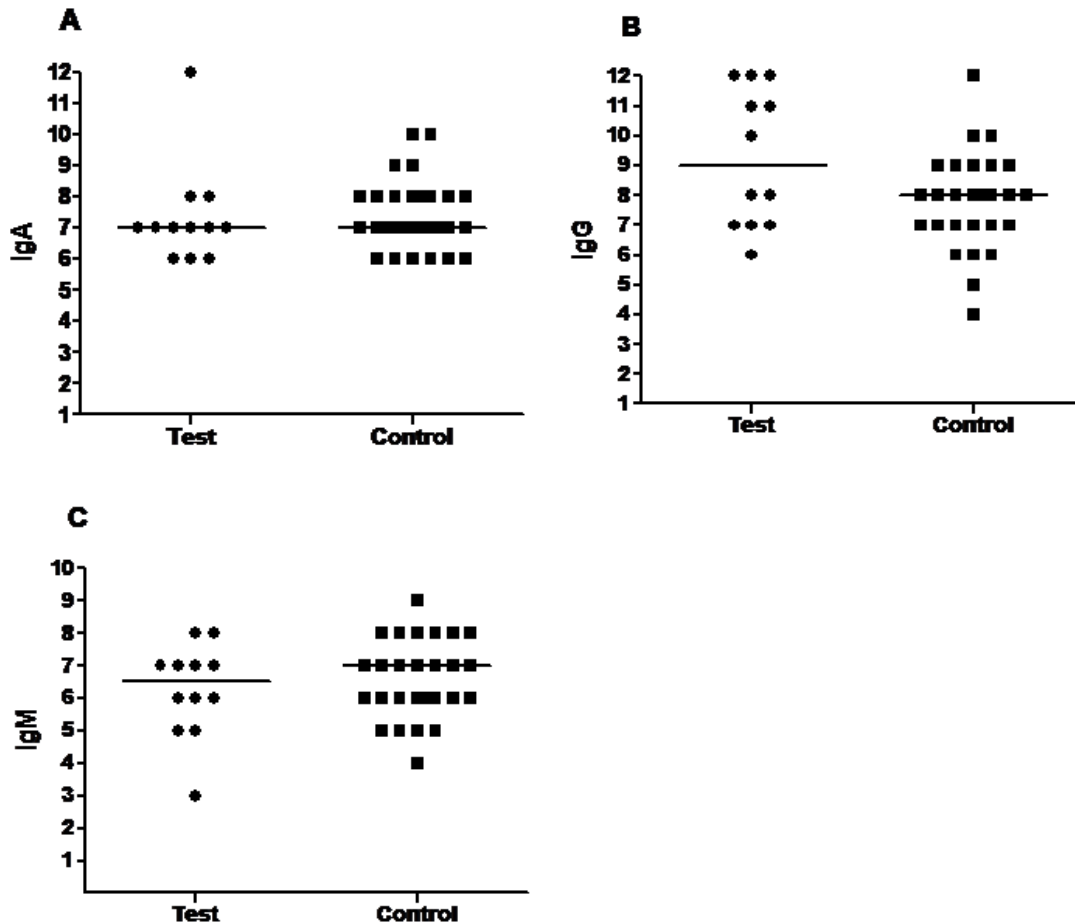


Figura 2. Resultado da análise da titulação de imunoglobulinas provenientes das amostras de saliva. A figura mostra a escala de titulação de IgA em A (1-1:100; 2-1:200; 3-1:400; 4 - 1:800; 5-1:1.600; 6-1:3.200; 7-1: 6.400; 8-1:12.800; 9-1:25.600; 10-1:51.200; 11-1:102.400; 12-1:204.800); IgG e IgM em B e C, respectivamente (1-1:10; 2-1:20; 3-1:40 ; 4-1:80; 5-1:160; 6-1:320; 7-1:640; 8-1:1.280; 9-1:2.560; 10-1:5.120; 11-1:10.240; 12-1:20.480). Foram avaliados pacientes com periodontite crônica (testes) (n=12) e indivíduos periodontalmente saudáveis (controles) (n=27). * $P < 0.05$. Os valores de p foram obtidos pelo teste t de Mann-Whitney. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. A mediana foi representada por barras horizontais. Em A não houve diferença na mediana entre os grupos (1:6.400). A média com desvio padrão na titulação de anticorpos foi de um ligeiro aumento para o grupo teste ($1:23.200 \pm 1:57.280$) comparada ao grupo controle ($1:12.330 \pm 1:12.700$). Em B houve pequena diferença entre a mediana de testes e controles, respectivamente (1:3.200 e 1:1.280). A média com desvio padrão na titulação de anticorpos foi de um ligeiro aumento para o grupo teste ($1:5.947 \pm 1:6.363$) comparada ao grupo controle ($1:2262 \pm 1:3871$). Em C também houve pequena diferença entre as medianas de testes e controles, respectivamente (1:480 and 1:640). A média com desvio padrão na titulação de

anticorpos foi de um ligeiro aumento para o grupo controle ($1:666 \pm 1:560$) em relação ao grupo teste ($1:536 \pm 1:406$).

Citometria de fluxo

A partir dos dados obtidos por meio das análises citofluorimétricas, foi observado que o grupo teste apresentou uma maior frequência de leucócitos totais ($50,43\% \pm 5,1$) em relação ao grupo controle ($22,69\% \pm 0,19$) (Figura 3A). A frequência de linfócitos T ($0,48\% \pm 0,22$) e de NK ($0,09\% \pm 0,04$) nos indivíduos do grupo teste foram similares àquela encontrada para o grupo controle ($0,89\% \pm 0,19$ e $0,01\% \pm 0,03$, respectivamente) (Figura 3B e 3C). Em relação aos linfócitos B pôde ser observado que o grupo teste apresentou uma maior frequência ($50,93\% \pm 6,1$) quando comparado ao grupo controle ($13,9\% \pm 2,6$) (Figura 3D). Não foram encontradas células T $CD8^+$ na saliva desses indivíduos (Dados não mostrados).

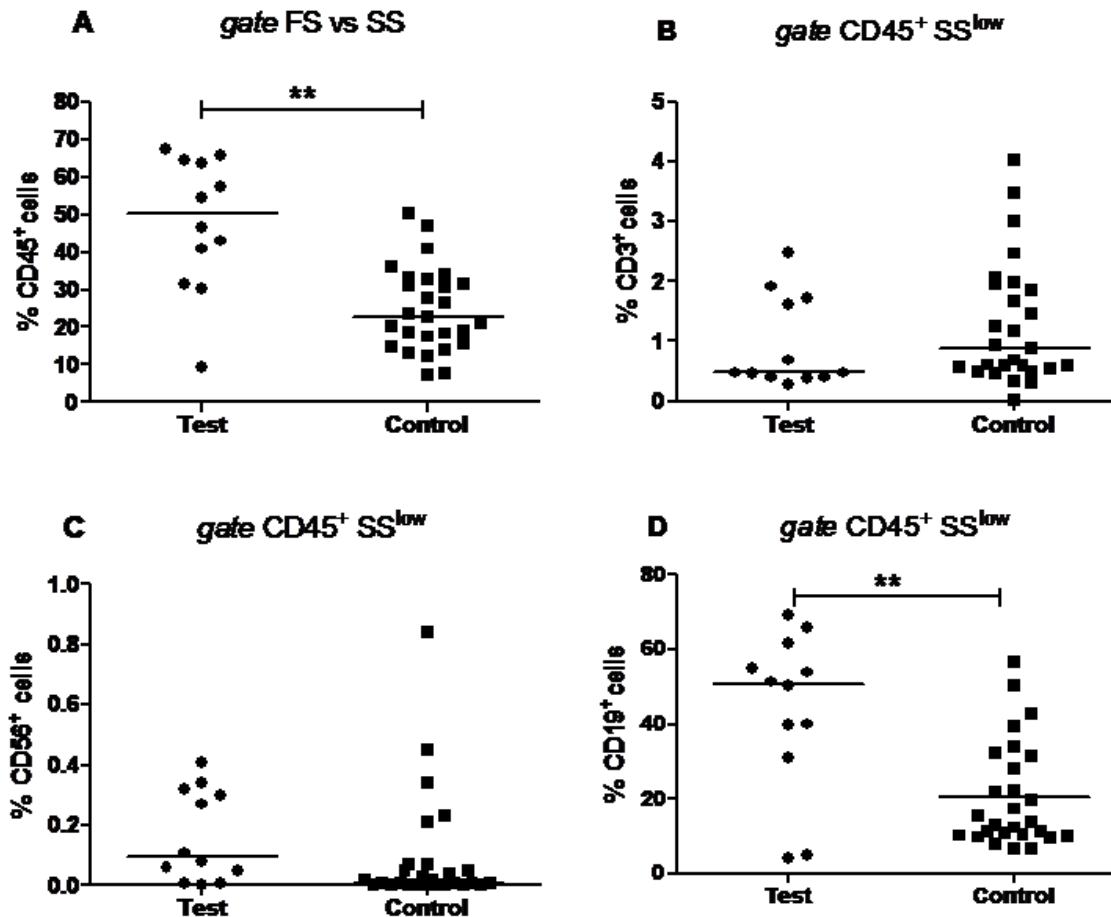


Figura 3. Resultado da análise fenotípica celular das amostras de saliva. A figura mostra a frequência das células encontradas na análise por citometria de fluxo. As medianas encontram-se representadas por barras horizontais.

DISCUSSÃO

O papel das imunoglobulinas produzidas nos quadros de periodontite avançada ou progressiva ainda não está bem estabelecido. No entanto, há evidências de que essas proteínas poderiam neutralizar os patógenos periodontais (anticorpos protetores) ou induzir à persistência da infecção (anticorpos não protetores), estimulando maior produção de interleucina-1 (IL-1) e, conseqüentemente, maior dano tecidual (SEYMOUR; GEMMELL; REINHARDT; EASTCOTT; TAUBMAN, 1993, GEMMEL; SEYMOUR, 1994, GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997, GEMMELL; BIRD; CARTER; DRYSDALE; SEYMOUR, 2002, GEMMELL; YAMAZAKI; SEYMOUR, 2002).

De acordo com Albandar et al. (2001), os anticorpos específicos para microrganismos associados à doença periodontal podem ser utilizados para um melhor entendimento desta patologia. Nieminen et al. (1993) observaram que a concentração de IgA e IgG específica para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva de pacientes com periodontite avançada apresentava correlação positiva e estatisticamente significativa com os níveis séricos destes anticorpos. Os autores concluíram que as amostras salivares poderiam ser utilizadas para avaliar a resposta humoral para esta espécie de bactéria com a mesma eficácia da avaliação sérica, em pacientes adultos com periodontite severa.

Os resultados do presente trabalho mostraram que os títulos de imunoglobulinas totais presentes na saliva dos grupos teste e controle não variaram ($p > 0,05$). Estes dados confirmam os achados de Graswinckel et al. (2004), que observaram, no soro de pacientes, níveis de IgA, IgG e IgM totais similares nos pacientes com periodontite e sem a patologia. No entanto, no mesmo trabalho, ao analisar os níveis de IgG1 e IgG2, os autores identificaram que os indivíduos com periodontite apresentaram maiores concentrações dessas imunoglobulinas em relação ao grupo controle e que os níveis de IgG total e IgG2 encontram-se reduzidos em pacientes fumantes com periodontite.

A citometria de fluxo tem demonstrado ser uma ferramenta útil para o estudo de células em amostras de saliva (APS et al, 2002; DOS-SANTOS et al., 2009; VIDOVIC A. et al., 2011). Pelo fato de ser um método não invasivo de avaliação imunológica, diversas condições patológicas da cavidade bucal, que podem interferir na distribuição dos leucócitos, podem ser avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. Neste trabalho, observou-se um maior percentual no número total de leucócitos nos pacientes com periodontite crônica, fato que é consistente com dados oriundos de estudos prévios, que demonstram que os leucócitos presentes na saliva apresentam uma frequência aumentada quando na presença clínica de gengivite (SCHIOTT; LOE, 1970; APS et al, 2002) ou periodontite (RAESTE; AURA, 1978; BENDER et al, 2006) quando analisados por microscopia (SCHIOTT; LOE, 1970; RAESTE; AURA, 1978; BENDER et al, 2006) ou por citometria de fluxo (APS et al, 2002). No presente estudo também foi encontrado um maior percentual de linfócitos B em pacientes com periodontite crônica em relação aos controles. Este dado corrobora com os descritos em diversos trabalhos que relatam, que as lesões de periodontite avançada ou progressiva, são dependentes de citocinas secretadas por linfócitos Th2 e por plasmócitos (REINHARDT; BOLTON; MCDONAL; DUBOIS; KALDAHL, 1988, SEYMOUR; GEMMELL; REINHARDT; EASTCOTT; TAUBMAN, 1993, GEMMEL; SEYMOUR, 1994, YAMAZAKI; NAKAJIMA; AOYAGI; HARA; 1994, GEMMEL; WINNING; GRIECO; BIRD; SEYMOUR, 2000, GEMMEL et al. 2001; BERGLUNDH; LILJENBERG; TARKOWSKI; LINDHE, 2002, BERGLUNDH; DONATI; ZITZMANN, 2007). Embora haja esta tendência de afirmar que a periodontite avançada ou progressiva esteja relacionada com o perfil Th2, o papel das citocinas dos perfis Th1, Th2 ou Th17 na periodontite ainda não foram completamente esclarecidos (SALVI et al., 1998, BERGLUNDH; DONATI, 2005, KINANE; BARTOLD, 2007, TSAI et al., 2007, DUTZAN et al, 2009, FORD et al., 2010).

A maior parte das IgG presentes na saliva, são oriundas do soro e, atingem a cavidade oral, via sulco crevicular (RANTONEN, 2003). Provavelmente, o discreto aumento nos títulos

de IgG, nos indivíduos com periodontite crônica, está relacionado ao aumento no número de linfócitos B. No entanto, como citado anteriormente, estes títulos mais altos de IgG encontrados não foram estatisticamente significativos, possivelmente em decorrência de nosso reduzido número amostral. Por isso optou-se por considerar os valores das medianas obtidas nas titulações de imunoglobulinas ao invés das médias, pois grandes variações individuais poderiam interferir na análise dos resultados.

Em relação à frequência de células T em indivíduos saudáveis, no presente trabalho, o resultado observado foi diferente daquele encontrado nos trabalhos de DOS-SANTOS et al (2009) e de VIDOVIC A. et al (2011), que demonstraram maiores percentuais desta população. Isto provavelmente se deve à diferença de idade dos participantes entre os diferentes estudos e principalmente aos diferentes métodos de coleta e processamento da amostra de saliva. Neste sentido, a estimulação da secreção de saliva; a forma de coleta; a inclusão ou retirada de células epiteliais e muco na amostra; poderiam influenciar na avaliação da distribuição das populações celulares.

Desta forma, além da pesquisa microbiana, o conhecimento das células e das diferentes classes de Ig na saliva de pacientes com infecção periodontal ativa pode auxiliar no estabelecimento de um diagnóstico preciso além de prever o prognóstico dos pacientes nesta condição e identificar indivíduos com maior predisposição ao desenvolvimento destas patologias. Também seria possível realizar uma terapia periodontal mais efetiva por meio de parâmetros laboratoriais, complementares aos parâmetros clínicos.

Em conclusão, faz-se necessária a padronização dos procedimentos de coleta de saliva além do processamento deste fluido para aquisição e análise por citometria de fluxo. A citometria de fluxo representa uma ferramenta promissora para o auxílio no diagnóstico da periodontite crônica pela saliva e, quando a técnica for padronizada para esse fim, poderíamos, por meio de sua utilização, prever com maior precisão, o prognóstico da doença mediante a análise do perfil celular e de outros parâmetros como o perfil de citocinas presentes na saliva destes indivíduos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEAM, CAPES, IOC-FIOCRUZ, UEA e Beckman Coulter Brazil.

REFERÊNCIAS

1. CHALLACOMBE SJ (1995). Assessing mucosal humoral immunity. *Clin Exp Immunol* 100:181-2.
2. SEEMANN R, HAGEWALD SJ, SZTANKAY V, DREWS J, BIZHANG M, KAGE A (2004). Levels of parotid and submandibular / sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Investig* 8:233–237.
3. GIANNOBILE WV, BEIKLER T, KINNEY JS, RAMSEIER CA, MORELLI T, WONG DT (2009). Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2000 50: 52–64.
4. FORD PJ, GAMONAL J, SEYMOUR G (2010). Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53:111-123.

5. VIDOVIC A, JURAS DV, BORAS VV, LUKAC J, GRUBISIC-ILIC M, RAK D *et al.*(2011). Determination of leucocyte subsets in human saliva by flow cytometry. *Archives of oral biology*: 1-7.
6. DOS-SANTOS MC, GOMES NM, MAKIMOTO FH, KATSURAYAMA M, SANTANA LLO, BECKER MAD, GARCIA EP, BERTHO AL (2009). Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cellular Immunology* 260: 39-43p.
7. MATOS-GOMES N, KATSURAYAMA M, MAKIMOTO FH, SANTANA LLO, PAREDES-GARCIA E, BECKER MAA, DOS-SANTOS MC (2010). Psychological stress and Its influence on salivary flow rate, total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. *Neuroimmunomodulation*17: 396-404.
8. SEYMOUR GJ, GEMMELL E, REINHARDT RA, EASTCOTT JW, TAUBMAN MA (1993). Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res* 28: 478–486.
9. GEMMELL E, SEYMOUR GJ (1994). Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodont* 94: 28–38.
10. GEMMELL E, MARSHALL RI, SEYMOUR GJ (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction. *Periodontol* 2000 14: 112–143.
11. GEMMELL E, BIRD P, CARTER CL, DRYSDALE KE, SEYMOUR GJ (2002a). Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the T and B cell responses to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 128: 238–244.
12. GEMMELL E, YAMAZAKI K, SEYMOUR GJ (2002b). Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 17–34.
13. ALBANDAR JM, DENARDIN AM, ADESANYA MR, DIEHL SR, WINN DM (2001). Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol* 72:1463-1469.
14. NIEMINEN A, KARI K, SAXEN L (1993). Specific antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva of patients with advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 101(suppl 4):196-201.
15. GRASWINCKEL JE, VAN-DER-VELDEN U, VAN-WINKELHOFF AJ, HOEK FJ, LOOS BG (2004). Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol* 31(suppl 7):562-568.
16. APS JKM, MAAGDENBERG KVD, DELANGHE JR; MARTENS LC (2002). Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta* 321: 35-41.

17. SCHIOTT C, LOE H (1970). The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J Periodontal Res* 5(suppl 1):36–41.
18. RAESTE AM, AURA A (1978). Rate of migration of oral leukocytes in patients with periodontitis. *Scand J Dent Res* 86(suppl 1): 43–51.
19. BENDER JS, THANG H, GLOGAUER M (2006). Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontal Res* 41(3 suppl): 214–220.
20. REINHARDT RA, BOLTON RW, MCDONALD TL, DUBOIS LM, KALDAHL WB (1988). In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol* 59: 656-670.
21. YAMAZAKI K, NAKAJIMA T, AOYAGI T, HARA K (1994). Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodontal Res* 28: 324–334.
22. GEMMELL E, WINNING TA, GRIECO DA, BIRD P, SEYMOUR GJ (2000). The influence of genetic variation on the splenic T cell cytokine and specific serum antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol* 71: 1130–1138.
23. GEMMELL E, SERNIA C, GRIECO DA, BIRD P, ALLEN CJ, SEYMOUR GJ (2001). Genetic variations in the recognition of *Porphyromonas gingivalis* antigens in mice. *Oral Microbiol Immunol* 16: 129–135.
24. BERGLUNDH T, LILJENBERG B, TARKOWSKI A, LINDHE J (2002). The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 29: 281–286.
25. BERGLUNDH T, DONATI M, ZITZMANN N (2007). B cells in periodontitis – friends or enemies? *Periodontology 2000* 45: 51–66.
26. SALVI GE, BROWN CE, FUJIHASHI K, KIYONO H, SMITH FW, BECK JD, *et al.* (1998). Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res* 33: 212–225.
27. BERGLUNDH T, DONATI M (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol* 32 (6 suppl): 87–107.
28. KINANE DF, BARTOLD PM (2007). Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontology 2000* 43: 278–293.
29. TSAI CC, KU CH, HO YP, HO KY, WU YM, HUNG CC (2007). Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferongamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci* 23: 1–7.
30. DUTZAN N, VERNAL R, HERNANDEZ M, DEZEREGA A, RIVERA O, SILVA N, AGUILLON JC, PUENTE J, POZO P, GAMONAL J (2009). Levels of interferon-

- gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 80: 290–296.
31. RANTONEN P (2003). Salivary flow and composition in healthy and diseased adults (Dissertation). Helsinki: University of Helsinki.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J.**, 1975: v. 25, n. 4, 229-235p.
2. ALBANDAR, J.M; BRUNELLE, J.A; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988–1994. **J Periodontol.**, 1999: v.70, 13–29p.
3. ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, 1996: v.11, 266-273p.
4. ASIKAINEN, S; ALALUUSUA, S; KARI, K; KLEEMOLA-KUJALA, E. Subgingival microflora and periodontal conditions in healthy teenagers. **J Periodontol.**, 1986: v.57, 505–509p.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – SBBrasil, 2010.** Brasil: 2010.
6. BRAGD, L; DAHLEN, G; WIKSTROM, M; SLOTS, J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. **J Clin Periodontol**, 1987: v. 14, 95-99p.
7. BRETZ, W.A; LOESCHE, W.J. Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples. **J Dent Res**, 1987: v.66, 1668-1672p.
8. BROTHWELL, D; GHIABI, E. Periodontal health status of the Sandy Bay First Nation in Manitoba, Canada. **Int J Circumpolar Health**, 2009:v. 68, 23–33p.
9. BYRNE, S.J; DASHPER, S.G; DARBY, I.B; ADAMS, G.G; HOFFMANN, B; REYNOLDS, E.C. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. **Oral Microbiol Immunol.**, 2009: v. 24, 469–477p.
10. BOURGEOIS, D; BOUCHARD, D.P; MATTOUT, C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. **J Periodont Res.**, 2007: v. 42, 219-227p.
11. CARRANZA, F.A; NEWMAN, M.G; TAKEI, H. **Periodontia Clínica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
12. CHALABI, M; REZAEI, F; MOGHIM, S; MOGHAREHABED, A; REZAEI, M; MEHRABAN, B. Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. **Molecular Oral Microbiology.**, 2010: v. 25, 236–240p.

13. CHOI, B.K; PARK, S.H; YOO, Y.J; CHOI, S.H; CHAI, J.K; CHO, K.S. KIM, C.K. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. **J Periodontol**, 2000: v.71, 1387-1394p.
14. COLOMBO, A.P; TELES, R.P; TORRES, M.C; SOUTO, R; ROSALEM, W.J; MENDES, M.C; UZEDA, M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J Periodontol** 2002: v.73, 360-369p.
15. CORTELLI, J.R; CORTELLI, S.C; JORDAN, S; HARASZTHY, V.I; ZAMBON, J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, 2005a: v.32, 860-866p.
16. CORTELLI, S.C; FERES, M; FERES, M; RODRIGUES, A.A; AQUINO, D.R; SHIBLI, J.A; CORTELLI, J.R. Detection os Actinobacillus actinomycetemcomitans in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. **J Periodontol.**, 2005b: 76, 204-209p.
17. D'AIUTO, F; PARKAR, M; NIBALI, L; SUVAN, J; LESSEM, J; TONETTI, M.S. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. **Am Heart J.**, 2006: v.151, 977-984p.
18. DAHLE'N, G; MANJI, F; BAELUM, V; FEJERSKOV, O. Putative periodontopathogens in diseased and non diseased persons exhibiting poor oral hygiene. **J Clin Periodontol.**, 1992: v.19, 35-42p.
19. DALLA VECCHIA, C.F; SUSIN, C; ROSING, C.K; OPPERMANN, R.V; ALBANDAR, J.M. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. **J Periodontol**, 2005: v.76, 1721-1728p.
20. DAROUT, I.A; SKAUG, N; ALBANDAR, J.M. Subgingival microbiota levels and their associations with periodontal status at the sampled sites in an adult Sudanese population using miswak or toothbrush regularly. **Acta Odontol Scand.** 2003: v.61, 115-122p.
21. DARVEAU, R.P. The oral microbial consortium_s interaction with the periodontal innate defense system. **DNA Cell Biol.**, 2009:v. 28, 389-395p.
22. DI MURRO, C; PAOLANTONIO, M; PEDRAZZOLI, V; LOPATIN, D.E; CATTABRIGA, M. Occurrence of Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, and Treponema denticola in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. **J Periodontol.**, 1997: v.68, 18-23p.
23. DIBART, S; CHAPPLE, I.L; SKOBE, Z; SHUSTERMAN, S; NEDLEMAN, H.L. Microbiological findings in prepubertal periodontitis. A case report. **J Periodontol**, 1998: v.69, 1172-1175p.

24. DIXON, D.R; REIFE, R.A; CEBRA, J.J; DARVEAU, R.P. Commensal bacteria influence innate status within gingival tissues: a pilot study. **J Periodontol.**, 2004: v.75, 1486–1492p.
25. DOGAN, B; SAARELA, M.H; JOUSIMIES-SOMER, H; ALALUUSUA, S; ASIKAINEN, S. Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype e – biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. **Oral Microbiol Immunol.**, 1999: v.14, 98–103p.
26. DOS SANTOS, M.C; GOMES, N.M; MAKIMOTO, F.H; KATSURAYAMA, M; SANTANA, L.L.O; BECKER, M.A.D; GARCIA, E.P; BERTHO, A.L. Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. **Cellular Immunology** **260**, 2009: 39-43p.
27. ELLWOOD, R; WORTHINGTON, H.V; CULLINAN, M.P; HAMLET, S; CLEREHUGH, V; DAVIES, R. Prevalence of suspected periodontal pathogens identified using ELISA in adolescents of differing ethnic origins. **J Clin Periodontol.**, 1997: v.24, 141–145p.
28. EZZO, P.J; CUTLER, C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. **Periodontology** **200.**, 2003: v. 32, 24-35p.
29. FERNANDES, C.B; AQUINO, D.R; CARVALHO FILHO, J; CORTELLI, S.C; CORTELLI, J.R. Prevalência de microrganismos periodontais intra e extra sulcular em crianças, adolescentes e adultos jovens. **Cienc Odontol Bras.**, 2007: v. 10 (3), 90-97p.
30. FORD, P.J; GAMONAL, J; SEYMOUR, G. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontol** **2000**, 2010: v.53, 111-123p.
31. FUJIMOTO, L.B.M. **Avaliação de Protocolos para PCR em tecidos parafinizados objetivando o diagnóstico da Tuberculose Cutânea.** Manaus: UFAM: 2004. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas.
32. GAJARDO, M; SILVA, N; GOMEZ, L; LEON, R; PARRA, B; CONTRERAS, A; GAMONAL, J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **J Periodontol**, 2005: v.76, 289-294p.
33. GMU'R, R; GUGGENHEIM, B. Interdental supragingival plaque – a natural habitat of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, Campylobacter rectus, and Prevotella nigrescens. **J Dent Res.**, 1994: v.73, 1421–1428p.
34. GMU'R, R; MARINELLO, C.P; GUGGESNHEIM, B. Periodontitis associated bacteria in supragingival plaque of dental hygienists: stability of carrier state and clinical development. **Eur J Oral Sci.**, 1999: v.107, 225–228p.
35. GRENIER, D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis. **Infect Immun.**, 1992: v. 60, 5298–5301p.

36. HAFFAJEE, A.D; BOGREN, A; HASTURK, H; FERES, M; LOPEZ, N.J; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J Clin Periodontol.** 2004; v.31, 996-1002p.
37. HAFFAJEE, A.D; CUGINI, M.A; TANNER, A; POLLACK, P; SMITH, C; KENT JR, R.L; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota in healthy, wellmaintained elder and periodontitis subjects. **J Clin Periodontol.**, 1998: v.25, 346–353p.
38. HAFFAJEE, A.D; TELES, R.P; SOCRANSKY, S.S. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immuno**, 2006: v.21, 269-282p.
39. HAYASHI, F; OKADA, M; SODA, Y; MIURA, K; KOZAI, K. Subgingival distribution of *Campylobacter rectus* and *Tannerella forsythensis* in healthy children with primary dentition. **Arch Oral Biol.**, 2006: v.51, 10–14p.
40. KAMMA, J.J; DIAMANTI-KIPIOTI, A; NAKOU, M; MITSIS, F. Profile of subgingival microbiota in children with mixed dentition. **Oral Microbiol Immunol.**, 2000: v.15, 103–111p.
41. KAMMA, J.J; NAKOU, M; GMUR, R; BAEHNI, P.C. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. **Oral Microbiology and Oral Immunology**, 2004: v.19, 314-321p.
42. KAZOR, C.E; MITCHELL, A.M; LEE, A.M; STOKES, L.N; LOESCHE, W.J; DEWHIRST, F.E; PASTER, B.J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J Clin Microbiol**, 2003: v.41, 558-563p.
43. KHADER, Y.S; TA'ANI, Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. **J Periodontol.**, 2005: v.76, 161–165p.
44. KIBAYASHI, M; TANAKA, M; NISHIDA, N; KUBONIWA, M; KATAOKA, K; NAGATA, H; NAKAYAMA, K; MORIMOTO, K; SHISUKUISHI, S. Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. **J Periodontol.**, 2007: v.78, 859–867p.
45. KONONEN, E; PAJ, S; PUSSINEN, P.J; HYVONEN, M; DI TELLA, P; SUOMINEN TAIPALE, L; KNUUTILA, M. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. **J Clin Microbiol.**, 2007: v.45, 2446–2451p.
46. LAFAURIE, G.I; CONTRERAS, A; BARON, A; BOTERO, J; MAYORGA-FAYAD, I; JARAMILLO, A; GIRALDO, A; GONZALEZ, F; MANTILLA, S; BOTERO, A; ARCHILA, L.H; DIAZ, A; CHACON, T; CASTILLO, D.M; BETANCOURT, M; AYA, M.D.R; ARCE, R. Demographic, clinical, and microbiological aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. **J Periodontol.**, 2007: v.78, 629–639p.

47. LEE, J.W; CHOI, B.K; YOO, Y.J; CHOI, S.H; CHO, K.S; CHAI, J.K; KIM, C.K. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. **J Periodontol**, 2003: v.74, 1329-1335p.
48. LI, J; HELMERHORST, E.J; LEONE, C.W; TROXLER, R.F; YASKELL, T; HAFFAJEE, A.D; SOCRANSKY, S.S; OPPENHEIM, F.G. Identification of early microbial colonizers in human dental plaque. **J Appl Microbiol.**, 2004: v.97, 1311–1318p.
49. LIEN, E; SELLATI, T.J; YOSHIMURA, A; FLO, T.H; RAWADI, G; FINBERG, R.W; CARROLL, J.D; ESPEVIK, T; INGALLS, R.R; RADOLF, J.D; GOLENBOCK, D.T. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognitions receptor for diverse bacterial products. **J Biol Chem**, 1999: v.247, 33419–33425p.
50. LINDHE, J; KARRING, T; LANG, N.P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
51. LOESCHE, W; BRETZ, W.A; KERCHENSTEINER, D; STOLL, J; SOCRANSKY, S.S; HUJOEL, P; LOPATIN, D.E. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide. **J Clin. Microbiol**, 1990: v.28, 1551-1559p.
52. LOPEZ, N.J. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. **J Periodontol**, 2000: v.71, 948-954p.
53. LOPEZ, N.J; SOCRANSKY, S.S; DA SILVA, I; JAPLIT, M.R; HAFFAJEE, A.D. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. **J Periodontol** 2004: v.75, 717-725p.
54. LUBA, M. **Caracterização microbiológica de indivíduos portadores de doença periodontal crônica e agressiva generalizada**. Guarulhos: UnG: 2006. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos.
55. MAGER, D.L; HAFFAJEE, A.D; SOCRANSKY, S.S. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. **J Clin Periodontol.**, 2003: v.30, 1031-1037p.
56. MALAMUD, D; BAU, H; NIEDBALA, S; CORSTJENS, P. Point detection of pathogens in oral samples. **Adv Dent Res.**, 2005: v.18, 12–16p.
57. MATOS-GOMES, N; KATSURAYAMA, M; MAKIMOTO, F.H; SANTANA, L.L.O; PAREDES-GRACIA, E; BECKER, M.A.D; DOS-SANTOS, M.C. Psychological stress and its influence on salivary flow rate, total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. **Neuroimmunomodulation**, 2010: v. 17, 396-404p.
58. MOMBELLI, A; CASAGNI, F; MADIANOS, P.N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. **J Clin Periodontol**, 2002: v.29, n.3, 10-21p.

59. NÓBREGA, P.B. **Detecção de Quimiocinas na Saliva de Pacientes com Periodontite**. Ribeirão Preto: FORP, 2008. Dissertação (Mestrado em Periodontia). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de São Paulo.
60. NUNN, M. Understanding the etiology of periodontitis: An overview of periodontal risk factors. **Periodontology** 2000., 2003: v. 32, 11-23p.
61. OFFENBACHER, S; BOGGESS, K.A; MURTHA, A.P. JARED, H.L; LIEFF, S; MCKAIG, R; MAURIELLO, S; MOSS, K; BECK, J. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. **Obstet Gynecol.**, 2006: v.107, 29–36p
62. O'LEARY, T.J; DRAKE, R.B; NAYLOR, J.E. The plaque control record. **J Periodont**, 1972: Jan; v. 43, n.1, 38-40p.
63. ONAGAWA, M; ISHIHARA, K; OKUDA, K. Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. **Bull Tokyo Dent Coll.**, 1994: v. 35, 171–181p.
64. PAPAPANOU, P.N; TEANPAISAN, R; OBIECHINA, N.S; PITHPORNCHAIYAKUL, W; PONGPAISAL, S; PISUITHANAKAN, S; BAELUM, V; FEJERSKOV, O; DAHLÉN, G. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. **Eur J Oral Sci.**, 2002: v.110, 345–352p.
65. PAPAIOANNOU, W; GIZANI, S; HAFFAJEE, A.D; QUIRYNEN, M; MAMAI-HOMATA, E; PAPAGIANNOULIS, L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. **Oral Microbiol Immunol.**, 2009: v.24, 183–189p.
66. RAMS, T.E; LISTGARTEN, M.A; SLOTS, J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. **J Clin Periodontol**, 1997: v.23, 346-354p.
67. REICH, E. Trends in caries and periodontal health epidemiology in Europe. **Int Dent J.**, 2001: v.51, 392–398p.
68. REN, L; LEUNG, W.K; DARVEAU, R; JIN, L. The expression profile of lipopolysaccharide binding protein, membrane-bound CD14, and Toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. **J Periodontol**, 2005: v.76, 1950–1959p.
69. RUDNEY, J.D; STAIKOV, R.K. Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. **Arch Oral Biol.**, 2002: v.47, 347-359p.
70. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edition, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

71. SANZ, M; VAN WINKELHOFF, A.J; HERRERA, D; DELLEMIJN-KIPPUW, N; SIMON, R; WINKEL, E.G. Differences in the composition of the subgingival Microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. **Eur J Oral Sci**, 2000: v.108, 383-392p.
72. SHIMADA, M.H; ANGELIS, L; CIESIELSKY, F.I.N; GAETTI-JARDIM, E.C; GAETTI-JARDIM JR, E. Use of saliva in the evaluation of risk for periodontal diseases: clinical and microbiological aspects. **Rev Odontol UNESP**. 2008: v. 37, n.2, 183-189p.
73. SILVA, I.G. **Avaliação da microbiota gengival e subgengival de seres humanos por PCR**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
74. SLACK, E; HAPFELMEIER, S; STECHER, B; VELYKOREDKO, Y; STOEL, M; LAWSON, M.A; GEUKING, M.B; BEUTLER, B; TEDDER, T.F; HARDT, W.D; BERCIK, P; VERDU, E.F; MCCOY, K.D; MACPHERSON, A.J. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host–microbiota mutualism. **Science.**, 2009: v.325, 617–620p.
75. SLOTS, J; ASHIMOTO, A; FLYNN, M.J; LI, G; CHEN, C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, 1995: v.20, S304–S307p.
76. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol.** **2000**, 2005: v.38, 135-187p.
77. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complex in sugengival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, 1998 v.25, 134-144p.
78. SOCRANSKY, S.S; SMITH, C; HAFFAJEE, A.D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. **J Clin Periodontol.**, 2002: v.29, 260–268p.
79. SPAHR, A; KLEIN, E; KHUSEYINOVA, N; BOECKH, C; MUCHE, R; KUNZE, M; ROTHENBACHER, D; PEZESHKI, G; HOFFMEISTER, A; KOENIG, W. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. **Arch Intern Med.**, 2006: v.166, 554–559p.
80. SUSIN, C; OPPERMAN, R.V; HAUGEJORDEN, O; ALBANDAR, J.M. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. **J Clin Periodontol**, 2004: v.31, 951–958p.
81. TABA JR, M; KINNEY, J; KIM, A.S; GIANNOBILE, W.V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. **Dent Clin North Am.**, 2005: v.49, 551–571p.
82. TAKEUCHI ,Y; UMEDA, M; ISHIZURA, M; HUANG, Y; ISHIKAWA, I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **J Periodontol**, 2003: v.74, 1060-1069p.

83. TAN, K.S; WOO, C.H; ONG, G; SONG, K.P. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. **J Clin Periodontol**, 2001: v.28, 886-890p.
84. TANNER, A; MAIDEN, M.F; MACUCH, P.J; MURRAY, L.L; KENT, R.L JR. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J Clin Periodontol**, 1998: v.25, 85-98p.
85. TESTA, M; RUIZ DE VALLADARES, R; BENITO DE CARDENAS, I.L. Correlation between bacterial counts in saliva and subgingival plaque. **Acta Odontol Latinoam.**, 1999: v. 12, 63-74.
86. TINOCO, E.M; LYNGSTADAAS, S.P; PREUS, H.R; GJERMO, P. Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, 1997: v.24, 937-944p.
87. TLASKALOVA-HOGENOVA, H; STEPHANKOVA, R; HUDCOVIC, T; TUCKOVA, L; CUKROWSKA, B; LODINOVA-ZADNIKOVA, R; KOZAKOVA, H; ROSSMANN, P; BARTOVA, J; SOKOL, D; FUNDA, D.P; BOROVSKA, D; REHAKOVA, Z; SINKORA, J; HOFMAN, J; DRASTICH, P; KOKESOVA, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunol Lett.**, 2004:v. 93, 97-108p.
88. UMEDA, M; CONTRERAS, A; CHEN, C; BAKKER, I; SLOTS, J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. **J Periodontol.**, 1998: v. 69, 828-833p.
89. VAN WINKELHOFF, A.J; HERRERA, D; OTEO, A; SANZ, M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. **J Clin Periodontol**, 2005; v.32, 893- 898p.
90. XIMENEZ-FYVIE, L.A; ALMAGUER-FLORES, A; JACOBO-SOTO, V; LARA-CORDOBA, M; SANCHEZ-VARGAS, L.O; ALCANTARA-MARURI, E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2006a: v.33, 869- 377p.
91. XIMENEZ-FYVIE, L.A; ALMAGUER-FLORES, A; JACOBO-SOTO, V; LARA-CORDOBA, M; SANCHEZ-VARGAS, L.O; ALCANTARA-MARURI, E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. **J Periodontol** 2006b: v.77, 460-471p.
92. XIMENEZ-FYVIE, L.A; HAFFAJEE, A.D; SOCRANSKY, S.S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J Clin Periodontol.**, 2000: v.27, 648-657p.
93. WOLF, H.F; HASSELL,T.M; **Manual de Periodontia: fundamentos, diagnóstico, prevenção e tratamento.** Porto Alegre: Artmed, 2008.

94. YAMADA, M; IKEGAMI, A; KURAMITSU, H.K. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. **Fems Microbiol Lett.**, 2005: v. 250, 271–277p.
95. YOSHIMURA, A; KANEKO, T; KATO, Y; GOLENBOCK, DT; HARA, Y. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. **Infect Immun**, 2002: v.70, 218–225p.
96. ZAMBON, J.J; CHISTERSSON, L.A; SLOTS, J. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J Periodontol**, 1983: v.54, 707-711p.

APÊNDICE A – Equipe Científica.

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ÓRGÃO	ATIVIDADE
Maria Cristina dos Santos	Bióloga	Doutora	UFAM - AM	Orientadora
Patrícia Puccinelli Orlandi	Bióloga	Doutora	FIOCRUZ- AM	Co-orientadora
Álvaro Luiz Bertho dos Santos	Biomédico	Doutor	FIOCRUZ - RJ	Colaborador
Priscilla Farias Naiff	Dentista	Especialista	UFAM - AM	Executora
Carolinie Nobre	Bióloga	Mestre	FIOCRUZ-AM	Colaboradora
Raquel Ferraz	Biomédica	Mestre	FIOCRUZ - RJ	Colaboradora
Clarissa Ferreira Cunha	Biomédica	Mestranda	FIOCRUZ - RJ	Colaboradora

APÊNDICE B – Modelo de Ficha Clínica.

Exame Periodontal																
Nome: _____										Data: ____ / ____ / ____						
Exame: () Inicial																
Dentes	Profundidade de Bolsa						Furca	Mobilidade	Gengivite	Periodontite			Prognóstico		Índices	
	MV	V	DV	ML	L	DL				Leve	Moderada	Grave	Bom	Duvidoso	Ruim	ISS
18															x	x
17															x	x
16															x	x
15															x	x
14															x	x
13															x	x
12															x	x
11															x	x
21															x	x
22															x	x
23															x	x
24															x	x
25															x	x
26															x	x
27															x	x
28															x	x
38															x	x
37															x	x
36															x	x
35															x	x
34															x	x
33															x	x
32															x	x
31															x	x
41															x	x
42															x	x
43															x	x
44															x	x
45															x	x
46															x	x
47															x	x
48															x	x
Obs: _____																

APÊNDICE C – Modelo de Ficha de Anamnese.

PACIENTE N° _____
ENDEREÇO _____
IDADE _____ **ESTADO CIVIL** _____ **RAÇA** _____
OCUPAÇÃO _____
OCUPAÇÃO DO (A) CÔNJUGE _____
RENDA FAMILIAR _____
MORADIA () URBANA () RURAL
ESCOLARIDADE (anos) _____

SE MULHER:

Está grávida? () sim () não
N° DE GESTAÇÕES ANTERIORES _____ **N° DE FILHOS** _____
HISTÓRIA DE ABORTO () sim () não
N° DE CONSULTAS DE PRÉ-NATAL _____
TIPO DE PARTO _____
PESO DO BEBÊ AO NASCER _____

DADOS DE SAÚDE GERAL

1. Diabetes? () sim () não
2. Hipertensão? () sim () não
3. Infecção genito-urinária? () sim () não
4. Anemia? () sim () não
5. Consome álcool? () sim () não. Com que frequência? _____
6. Usuária de drogas? () sim () não
7. Fuma? () sim () não Quantos cigarros/dia? _____
8. Ex-fumate ? () sim () não tempo que fumou _____ quando parou _____
9. Problema cardíaco? () sim () não
10. Fez uso de alguma medicação nos últimos 3 meses? () sim () não. Qual? _____
11. Já fez exame para detecção de AIDS alguma vez? () sim () não
12. Problema respiratório? () sim () não
13. Problemas renais? () sim () não
14. Problemas gastrointestinais? () sim () não
15. Hepatite? () sim () não
16. Alguma doença não mencionada aqui? () sim () não. Qual? _____
17. Fez tratamento periodontal nos últimos 6 meses? () sim () não
18. Sua gengiva sangra com facilidade? () sim () não
19. Seus dentes tem mobilidade? () sim () não
20. Tem hábito de ranger os dentes? () sim () não
21. Usa fio dental? () sim () não
22. Quantas vezes escova os dentes? _____

APÊNDICE D – Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 MESTRADO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa **“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO SUBGENGIVAL E DA SALIVA ASSOCIADO À RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR EM ADULTOS COM OU SEM PERIODONTITE CRÔNICA”**, que será realizado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende medir a quantidade de bactérias e células de defesa do corpo presentes na saliva, biofilme dental e no fluido gengival de pessoas com ou sem doença periodontal crônica (inflamação da gengiva e do osso ao redor dos dentes). A pesquisadora **PRISCILLA FARIAS NAIFF**, responsável pelo projeto, pede autorização para avaliar suas condições de saúde bucal através de um exame clínico (exame de sua boca) e radiográfico e coletar um pouquinho de sua saliva, líquido e biofilme subgengivais (de baixo da gengiva), para poder fazer esta medida. O (A) Sr.(a) foi escolhido (a) porque tem a doença ou porque não tem doença nenhuma. A coleta dessas amostras vai servir para sabermos se a doença altera o valor do que estamos medindo.

Se você autorizar esta coleta, as amostras serão utilizadas para este estudo e o que não for usado será guardado para realização de outras pesquisas, de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 347, de 13 de Janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde.

A coleta das amostras (saliva, fluido e placa subgengival) será feita pela manhã, em jejum, e antes de qualquer procedimento de higiene bucal (escovação, uso do fio dental ou bochecho).

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que sua saliva, fluido ou placa subgengival sejam usados, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta das amostras, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que irá receber. O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta doença e de como pode ser melhor diagnosticada.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. Para qualquer outra informação, o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com o(a) pesquisador(a) pelos telefones (92) 3654-4378/ 3232-4217 ou pelo e-mail: pri_naiff@yahoo.com.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____,
RG _____, CPF _____ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso retirar minha autorização quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

Manaus, _____ de _____ de _____

Assinatura do participante

PRISCILLA FARIAS NAIFF, C.D.

CRO – AM 2478

APÊNDICE E – Artigo encaminhado à revista científica.

PLoS ONE
CELL IMMUNOPHENOTYPING AND SALIVA IMMUNOGLOBULINS PROFILE IN ADULTS WITH OR WITHOUT CHRONIC PERIODONTITIS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	CELL IMMUNOPHENOTYPING AND SALIVA IMMUNOGLOBULINS PROFILE IN ADULTS WITH OR WITHOUT CHRONIC PERIODONTITIS
Short Title:	CELL PHENOTYPING AND SALIVA IG'S IN PERIODONTITIS
Corresponding Author:	Alvaro L. Bertho Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Keywords:	flow cytometry; cells; secretory immunoglobulin A; immunoglobulin G; immunoglobulin M; saliva; chronic periodontitis.
Abstract:	To date, flow cytometric immunophenotyping has not been used to investigate immune patterns in saliva samples from individuals with inflammatory processes in the oral cavity. Because periodontitis is an infectious and inflammatory oral disease, the immune response may cause the leukocyte population in saliva of individuals with this condition to be different from that of periodontally healthy individuals. Saliva analysis could be a non invasive method to evaluate oral health. The objective of this study was to use flow cytometry technique to evaluate the frequency of T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells and the total leukocyte population in the saliva of individuals with or without chronic periodontitis. In parallel, total IgA, IgG and IgM titers in saliva were determined by Dot-ELISA. Cell immunophenotyping revealed that patients with chronic periodontitis had a higher frequency of total leukocytes (50.43% ± 5.1%) and B lymphocytes (50.93% ± 6.1%) than individuals without oral pathologies (22.69% ± 0.19% and 13.9% ± 2.6%, respectively). A non-significant increase in IgG titers was also observed in subjects with chronic periodontitis. These results show that flow cytometry could be an effective tool for determining leukocyte profiles in saliva samples from patients with chronic periodontitis and from healthy subjects.
Order of Authors:	PRISCILLA FARIAS NAIFF, M.D. student RAQUEL FERRAZ CLARISSA FERREIRA CUNHA PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI Alvaro L. Bertho MARIA CRISTINA DOS-SANTOS
Suggested Reviewers:	Rachel Louise Allen, Dr. St Georges, University of London, UK rallen@sgul.ac.uk Expertise in subject Charaf Benarafa University of Bern, Switzerland benarafa@cbr.med.harvard.edu Expertise in subject
Opposed Reviewers:	

CELL IMMUNOPHENOTYPING AND SALIVA IMMUNOGLOBULINS PROFILE IN ADULTS WITH OR WITHOUT CHRONIC PERIODONTITIS

NAIFF, P.F.^{1,2*}; FERRAZ, R.^{3,4}; CUNHA, C.F.⁴; ORLANDI, P.P.⁵; BERTHO, A.L.^{3,4**}; DOS-SANTOS, M.C.¹

¹ Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

² Professora do Curso de Odontologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

³ Plataforma de Citometria de Fluxo – Núcleo de Análise e *Sorting*, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁴ Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

⁵ Coordenação de Biodiversidade em Saúde, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Manaus, AM, Brazil.

* The results presented here are part of the work required for P F Naiff's masters degree.

** Corresponding author: Álvaro Luiz Bertho, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; 21045-900 email:bertho@ioc.fiocruz.br

KEYWORDS: Flow cytometry, cells, secretory immunoglobulin A, immunoglobulin G, immunoglobulin M, saliva, chronic periodontitis.

ABSTRACT

To date, flow cytometric immunophenotyping has not been used to investigate immune patterns in saliva samples from individuals with inflammatory processes in the oral cavity. Because periodontitis is an infectious and inflammatory oral disease, the immune response may cause the leukocyte population in saliva of individuals with this condition to be different from that of periodontally healthy individuals. Saliva analysis could be a non invasive method to evaluate oral health. The objective of this study was to use flow cytometry technique to evaluate the frequency of T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells and the total leukocyte population in the saliva of individuals with or without chronic periodontitis. In parallel, total IgA, IgG and IgM titers in saliva were determined by Dot-ELISA. Cell immunophenotyping revealed that patients with chronic periodontitis had a higher frequency of total leukocytes ($50.43\% \pm 5.1\%$) and B lymphocytes ($50.93\% \pm 6.1\%$) than individuals without oral pathologies ($22.69\% \pm 0.19\%$ and $13.9\% \pm 2.6\%$, respectively). A non-significant increase in IgG titers was also observed in subjects with chronic periodontitis. These results show that flow cytometry could be an effective tool for determining leukocyte profiles in saliva samples from patients with chronic periodontitis and from healthy subjects.

INTRODUCTION

An effective mucosal immune system plays an important role in host response, especially as oral fluids contain specific immunoglobulins (Ig) that can neutralize pathogens or facilitate their destruction by phagocytosis [1].

The immunoglobulins IgA, IgG and IgM are important defense factors present in saliva. They affect the oral microbiota by interfering with its adhesion or inhibiting its cellular metabolism. Patients with periodontal diseases have higher concentrations of these immunoglobulins in their saliva than individuals with healthy periodontium. These levels decrease significantly after periodontal therapy [2,3]. The primary immune response in chronic periodontitis occurs after colonization of the gingival sulcus by periodontal pathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and others) that stimulate the production of—among other inflammatory mediators—cytokines and chemokines by gingival epithelial cells. This results in expression of adhesion molecules, an increase in gingival capillary permeability and neutrophil chemotaxis and migration from the junctional epithelium to the gingival sulcus. This initial response promotes the migration of T cells and macrophages to the perivascular tissue. If the cellular immune response does not control the infection, B cells are recruited and differentiate into plasma cells, which are responsible for antibody production [4].

Over the last forty years, flow cytometry has become increasingly important and has helped to advance knowledge in the field of immunology. It has been used as the main tool for the phenotypic and functional characterization of different individual cells and cell populations and has also recently been used in dentistry as a tool to assess the leukocyte population distribution in saliva samples from healthy individuals [5] and individuals submitted to psychological stress [6]. The objective of the present study was to use flow cytometry to evaluate the frequency of T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer (NK) cells and the total leukocyte population in the saliva of individuals with or without chronic periodontitis. In parallel, we determined the saliva titers of total IgA, IgG and IgM in these individuals.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by the Committee for Ethics in Research with Humans, Federal University of Amazonas (UFAM), reference number CAAE – 0330.0.115.000-10.

Saliva samples were obtained from patients with chronic periodontitis (test group, n=12) seen at the Periodontal Clinic, State University of Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil, between April and September 2011. The control group consisted of patients without clinical and radiographic evidence of periodontitis (n = 27). All subjects in both groups were individually informed about the proposed study and agreed to participate by signing a written informed consent form. For the test group we selected individuals aged ≥ 30 years with a clinical and radiographic diagnosis of chronic periodontitis (at least six sites with radiographic evidence of bone loss, probing depth ≥ 4 mm and clinical attachment loss ≥ 3 mm). For the control group we selected individuals aged ≥ 30 years without periodontitis (bleeding upon probing $< 20\%$, clinical attachment loss < 3 mm and probing depth ≤ 3 mm). Exclusion criteria were as follows: a) having had other oral pathologies; b) having undergone periodontal treatment in the last six months; c) having made continuous use of medications such as antibiotics, immunomodulators or anti-inflammatory drugs in the previous 3 months, d) presenting with systemic diseases that interfere with the condition of the periodontium

(diabetes, HIV and immune disorders); e) being pregnant; and f) belonging to an indigenous group.

Sample Collection

Saliva samples were collected from each individual between nine and ten o'clock in the morning (before breakfast) without any stimulus or prior dental hygiene. Participants remained with their mouths closed and the tips of their tongues on the hard palate for five minutes. They were then asked to spit saliva into previously sterilized 50 mL collecting tubes (Falcon). For cell phenotyping, 500 μ L of each sample of saliva were transferred to a 1.5 mL microtube (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) containing 1% paraformaldehyde (PFA) (1:1) and stored at 4°C for up to seven months. To titrate immunoglobulins, 100 μ L of saliva were aliquoted into a sterile microtube containing 5 μ L of PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) and stored at -80°C for later use.

Dot-ELISA

Titration of IgA, IgG and IgM in saliva samples was performed by Dot-ELISA [7] with some modifications. Two microliters of each dilution of saliva (serially diluted 2-fold from 1:100 to 1:204,800 for IgA and from 1:10 to 1:20,489 for IgG and IgM) were applied to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). The membranes were blocked for two hours with powdered skim milk (5% Molico® Nestlé, Araçatuba, SP, Brazil) dissolved in Tris-buffered saline (TBS, pH 7.5). They were then incubated for forty-five minutes at room temperature with the following peroxidase conjugates: mouse anti-human IgA (α chain), mouse anti-human IgM (Fc5 μ) and mouse anti-human IgG (H + L) (PIERCE, IL, USA) (all diluted 1:1000 in TBS pH 7.5). After four washes with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) the reactions were revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) diluted in 30 mL of TBS pH 7.5 in the presence of 0.015% hydrogen peroxide p.a. The reactions were stopped with distilled water, and the membranes were dried between sheets of filter paper. Readings were then taken to obtain the final titer of each reaction. To facilitate statistical analysis, the Ig titers were obtained with the help of a scale.

Flow cytometry (FCM)

Sample staining

Five hundred microliters of PBS, pH 7.0, were added to the samples before they were stained with monoclonal antibodies for the flow cytometry analysis. The samples were then centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes at 4°C to remove mucus. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of a PBS solution containing 0.1% sodium azide and 2% fetal bovine serum (PBSAz). Then 5 μ L of four-color monoclonal antibody (mAbs) reagent (tetraCHROME, Beckman Coulter) containing anti-CD45/FITC, anti-CD56/PE, anti-CD19/ECD and anti-CD3/PE-Cy5 were added to the suspension. After incubation for 20 minutes at 4°C and protected from light, the samples were washed with 500 μ L of PBSAz (2000 rpm for 5 min at 4°C). After removing the supernatant, the pellet was resuspended in 500 μ L of PFA for fixing and staining. Anti-IgG isotype was used as a negative staining control.

Acquisition and analysis

The samples were acquired at a minimum of 200,000 events in an EPICS XL-MCL flow cytometer (Beckman Coulter, USA) and analyzed with EXPO32 and Kaluza software (Beckman Coulter) in the Flow Cytometry Facility at the Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Initially, to standardize the analysis protocol for the saliva samples, a whole blood sample from a healthy individual was acquired, so that gates could be defined according to known staining profiles (data not shown).

Figure 1 shows the FCM protocol used to analyze saliva samples, where dot plot A represents the scattering profile of a sample based on cell size (FSC) and granularity (SSC). In this plot a gate (cells) was created electronically to include cells of interest and exclude debris. Dot plot B, gated on cells, represents a dual-parametric analysis of SSC vs. CD45, in which two cell populations can be defined: mononuclear cells (low SSC /CD45⁺) and granulocytes (high SSC /CD45⁺). Histograms C, D, E and F represent the fluorescence intensity for the anti-CD3 mAb (gated as low SS), anti-CD56 (gated as low SS) and anti-CD19 (gated as low SS and high SS), respectively.

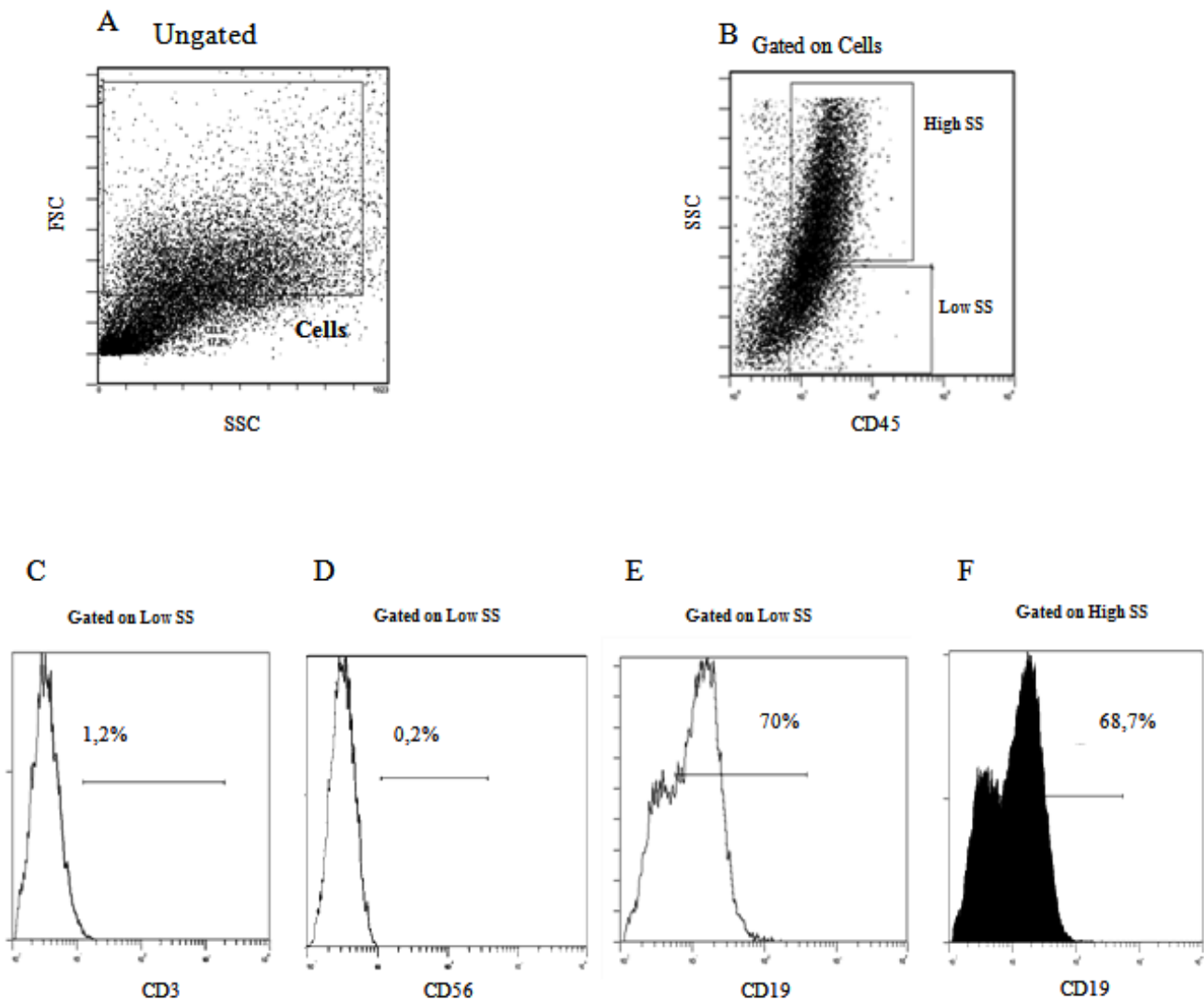


Figure 1. Cytofluorimetric protocol for phenotypic analysis of saliva samples. Dot plot **A** represents the scattering profile of a sample based on cell size (FSC) and granularity (SSC). In this plot, a gate (Cells) was electronically created to include cells of interest and exclude debris from the analysis. Dot plot **B** (gated on Cells) represents a dual parametric analysis of SSC vs. CD45, where we can identify two distinct cell populations: mononuclear cells (lowSS/CD45⁺) and granulocytes (highSS/CD45⁺). Histograms **C**, **D**, **E** and **F** represent the fluorescence intensity of the cells stained with anti-CD3 (gated on low SS), anti-CD56 (gated on low SS) and anti-CD19 (gated on low SS and on high SS) mABs, respectively. Data are presented as percentage of positive cells. FSC: forward scatter; SSC: side scatter; mAb: monoclonal antibody

Compensation adjustment for the interfering signals was performed by acquiring samples labeled with one single related fluorochrome and was based on approximation criteria for mean fluorescence intensity (MFI) values in quad-stat regions of dual-color dot plots.

The results were based on the percentages of positive cells for a specific monoclonal antibody staining.

Statistical Analysis

P-values were obtained using a non-parametric Mann-Whitney t-test. Comparisons were considered statistically significant for *p*-values less than or equal to 0.05.

RESULTS

Dot-ELISA

The results are shown in Figure 2. There were no statistically significant differences in IgA ($p = 0.4603$), IgG ($p = 0.1113$) or IgM ($p = 6.052$) titers between the test and control groups.

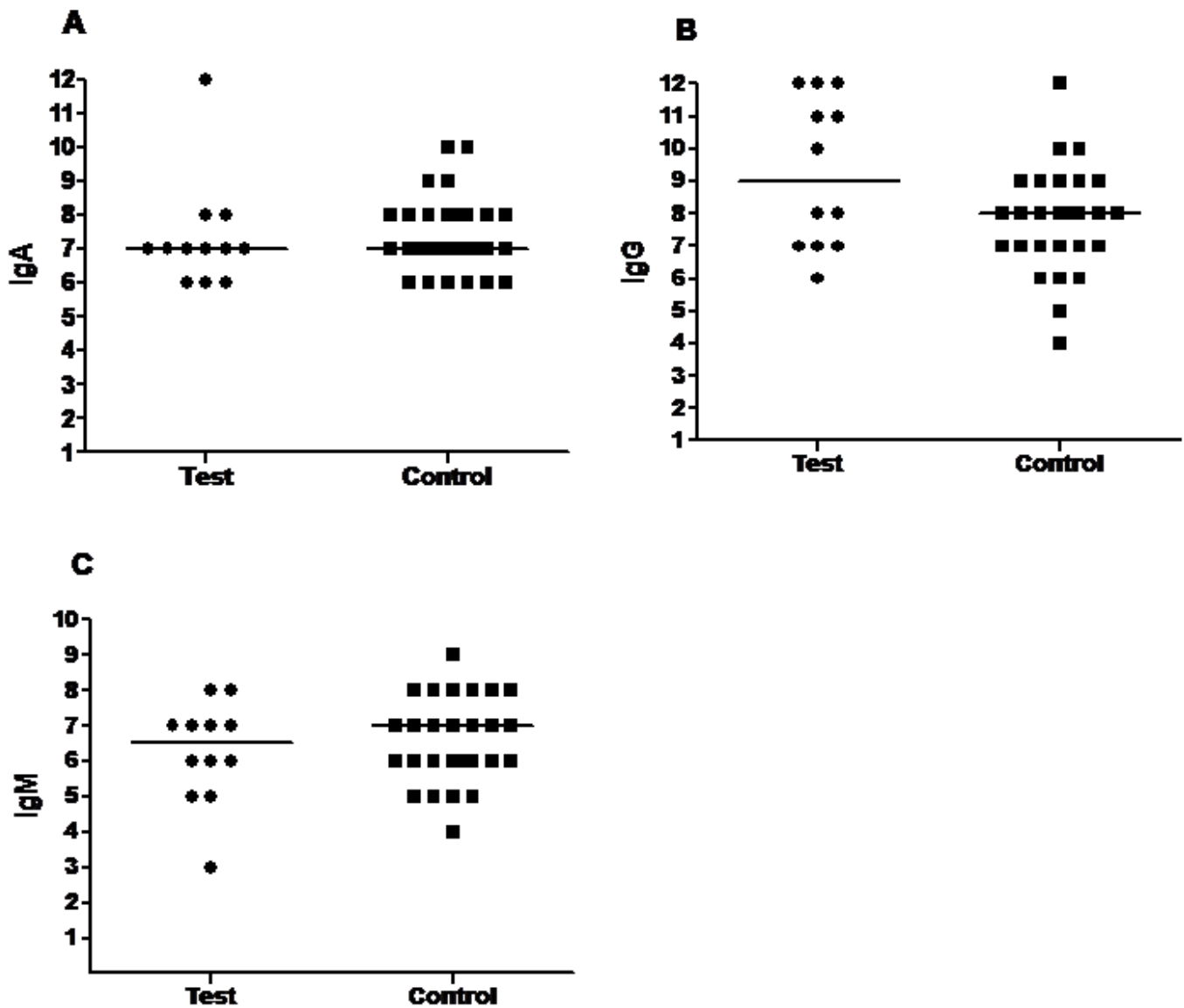


Figure 2. Results of analysis of saliva immunoglobulin titers. **A** shows the titration scale for IgA (1-1:100; 2-1:200; 3-1:400; 4-1:800; 5-1:1,600; 6-1:3,200; 7-1: 6,400; 8-1:12,800; 9-1:25,600; 10-1:51,200; 11-1:102,400; and 12-1:204,800), and **B** and **C** show the scales for IgG and IgM, respectively (1-1:10; 2-1:20; 3-1:40 ; 4-1:80; 5-1:160; 6-1:320; 7-1:640; 8-1:1,280; 9-1:2,560; 10-1:5,120; 11-1:10,240; and 12-1:20,480). We evaluated patients with periodontitis (tests) (n=12) and healthy individuals (controls) (n=27). * $P < 0.05$. P -values were obtained using a Mann-Whitney t-test. No statistically significant differences in p -values were found. The median is represented by horizontal bars. In **A** there was no difference in median between the groups (1:6,400). In **B** there was a small difference in median between tests and controls (1:3,200 and 1:1,280, respectively). The average antibody titer (\pm standard deviation) was slightly higher for the test group (1:5,947 \pm 1:6,363) than for the control group (1:2,262 \pm 1:3,871). In **C** there was also a small difference in the median titer between tests and controls (1:480 and 1:640, respectively). The average antibody titer (\pm standard deviation) was slightly higher for the control group (1:666 \pm 1:560) than for the test group (1:536 \pm 1:406).

Flow cytometry

FCM data revealed that the test group had a higher total leukocyte frequency ($50.43 \pm 5.1\%$) than the control group ($22.69\% \pm 0.19$) (Figure 3A). The frequencies of T lymphocytes and NK cells in both groups were low, and the percentages for the test group ($0.48\% \pm 0.22$ and $0.09\% \pm 0.04$, respectively) were similar to those for the control group ($0.89 \pm 0.19\%$ and $0.01\% \pm 0.03$, respectively) (Figure 3B and 3C). B lymphocyte frequency was higher in the test group ($50.93\% \pm 6.1$) than in the control group ($13.9\% \pm 2.6$). Interestingly, there were no $CD8^+$ T cells in the saliva of the subjects in either group (data not shown).

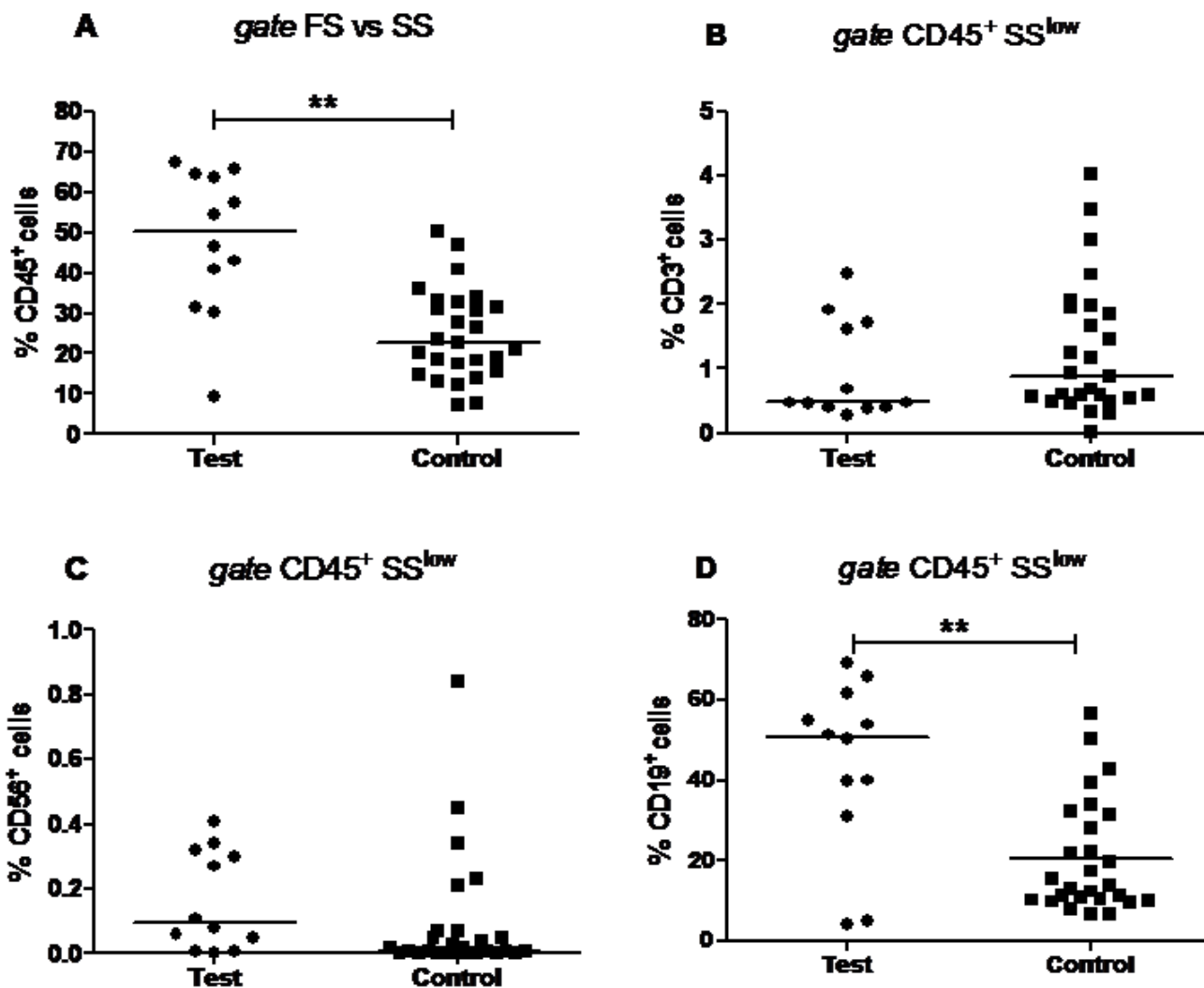


Figure 3. Results of phenotypic analysis of cells from the saliva samples. The plots show the cell frequencies determined by flow cytometry. Medians are represented by horizontal bars. * $P < 0.05$. P -values were obtained using a Mann-Whitney t-test.

DISCUSSION

The role of immunoglobulins produced in advanced or progressive periodontitis is not well established. However, there is evidence that these proteins can neutralize pathogens (neutralizing antibodies) or induce persistent infection (non-protective antibodies), stimulating increased production of interleukin-1 (IL-1) and consequently increased tissue damage [8, 9, 10, 11,12].

Specific antibodies against microorganisms associated with periodontal disease can be used to gain a better understanding of this pathology [13]. Statistically significant positive correlations between the concentrations of IgA and IgG specific for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in saliva of patients with advanced periodontitis and serum levels of these antibodies was observed [14]. They concluded that saliva samples could be used to evaluate the humoral response to this bacterial species with the same efficacy as serum assessment in adult patients with severe periodontitis.

The results of the present study showed that there was no significant difference ($p > 0.05$) between total Ig titers in saliva from the test and control groups. These data confirm the findings from a previous study [15], who observed similar total plasma IgA, IgG and IgM titers in patients with and without periodontal disease. However, in the same study, the authors found that IgG1 and IgG2 titers were higher in the control group and that total IgG and IgG2 titers were reduced in smokers with periodontitis.

Because it is a noninvasive method of immune evaluation, FCM has been shown to be a useful tool for studying cell populations in saliva samples [5,6,16]. It can therefore be used to evaluate various pathological conditions of the oral cavity that could interfere with the distribution of leukocytes. In this study we observed a greater percentage of total leukocytes in patients with chronic periodontitis, a fact consistent with data from previous studies demonstrating an increase in the frequency of leukocytes in saliva in clinical gingivitis [16,17] and periodontitis [18,19] when analyzed by microscopy [17,18,19] or flow cytometry [16]. In the present study we also found a higher percentage of B lymphocytes in patients with chronic periodontitis than in controls. This finding corroborates those of several studies reporting that lesions in advanced or progressive periodontitis are dependent on cytokines secreted by Th2 lymphocytes and plasma cells [20, 21, 22, 23, 24, 25]

Although a tendency can be observed in the literature to affirm that advanced or progressive periodontitis is related to Th2 profile, the roles of Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles in periodontitis have not been fully clarified [4, 26, 27, 28, 29, 30].

Most IgG present in saliva is derived from serum and reaches the oral cavity via crevicular fluid [31]. The slight increase in IgG titers in patients with chronic periodontitis in this study is probably related to the increase in the number of B lymphocytes. However, as previously mentioned, these higher titers of IgG were not statistically significant, possibly because of our small sample size. We therefore decided to consider the median rather than average titers because large individual variations between the participants could interfere in the analysis.

With regard to the frequency of T cells in saliva in healthy subjects, our results were different from those reported by Dos Santos *et al.* (2009) and Vidovic A. *et al.* (2011), who found a significantly higher percentage of this cell population. This is probably mainly due to

the different methods of collecting and processing saliva samples and to differences in the ages of participants, as the stimulation of saliva secretion, the collection technique used and the presence or otherwise of epithelial cells and mucus in the sample could influence the assessment of cell population distribution.

Hence, in addition to microbial research, a knowledge of the cells and different classes of Igs in saliva of patients with active periodontal infection may help to establish an accurate diagnosis, predict the prognosis of patients with this condition and identify individuals with a higher propensity to develop these pathologies. It would also allow the effectiveness of periodontal therapy to be more accurately assessed with laboratory rather than clinical parameters.

In conclusion, there is a need to standardize procedures for saliva analysis by flow cytometry, from the collection of this fluid to its acquisition and analysis. Flow cytometry represents a promising tool for the diagnosis of chronic periodontitis using saliva. When standardized for this purpose, the technique will allow a more accurate prediction of the prognosis of the disease based on analysis of the cellular profile and other parameters such as cytokine profile in the saliva of individuals with this condition.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, *Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ)*, *Universidade do Estado do Amazonas (UEA)* and *Beckman Coulter Brazil* for providing financial support.

REFERENCES

1. CHALLACOMBE SJ (1995). Assessing mucosal humoral immunity. *Clin Exp Immunol* 100:181-2.
2. SEEMANN R, HAGEWALD SJ, SZTANKAY V, DREWS J, BIZHANG M, KAGE A (2004). Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Investig* 8:233-237.
3. GIANNOBILE WV, BEIKLER T, KINNEY JS, RAMSEIER CA, MORELLI T, WONG DT (2009). Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol 2000* 50: 52-64.
4. FORD PJ, GAMONAL J, SEYMOUR G (2010). Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 53:111-123.
5. VIDOVIC A, JURAS DV, BORAS VV, LUKAC J, GRUBISIC-ILIC M, RAK D *et al.* (2011). Determination of leucocyte subsets in human saliva by flow cytometry. *Archives of oral biology*: 1-7.

6. DOS-SANTOS MC, GOMES NM, MAKIMOTO FH, KATSURAYAMA M, SANTANA LLO, BECKER MAD, GARCIA EP, BERTHO AL (2009). Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cellular Immunology* 260: 39-43p.
7. MATOS-GOMES N, KATSURAYAMA M, MAKIMOTO FH, SANTANA LLO, PAREDES-GARCIA E, BECKER MAA, DOS-SANTOS MC (2010). Psychological stress and Its influence on salivary flow rate, total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. *Neuroimmunomodulation* 17: 396-404.
8. SEYMOUR GJ, GEMMELL E, REINHARDT RA, EASTCOTT JW, TAUBMAN MA (1993). Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res* 28: 478-486.
9. GEMMELL E, SEYMOUR GJ (1994). Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodont* 94: 28-38.
10. GEMMELL E, MARSHALL RI, SEYMOUR GJ (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction. *Periodontol* 2000 14: 112-143.
11. GEMMELL E, BIRD P, CARTER CL, DRYSDALE KE, SEYMOUR GJ (2002a). Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the T and B cell responses to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 128: 238-244.
12. GEMMELL E, YAMAZAKI K, SEYMOUR GJ (2002b). Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 17-34.
13. ALBANDAR JM, DENARDIN AM, ADESANYA MR, DIEHL SR, WINN DM (2001). Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol* 72:1463-1469.
14. NIEMINEN A, KARI K, SAXEN L (1993). Specific antibodies against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in serum and saliva of patients with advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 101(suppl 4):196-201.
15. GRASWINCKEL JE, VAN-DER-VELDEN U, VAN-WINKELHOFF AJ, HOEK FJ, LOOS BG (2004). Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol* 31(suppl 7):562-568.
16. APS JKM, MAAGDENBERG KVD, DELANGHE JR; MARTENS LC (2002). Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta* 321: 35-41.
17. SCHIOTT C, LOE H (1970). The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. *J Periodontal Res* 5(suppl 1):36-41.
18. RAESTE AM, AURA A (1978). Rate of migration of oral leukocytes in patients with periodontitis. *Scand J Dent Res* 86(suppl 1): 43-51.

19. BENDER JS, THANG H, GLOGAUER M (2006). Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontol Res* 41(3 suppl): 214–220.
20. REINHARDT RA, BOLTON RW, MCDONALD TL, DUBOIS LM, KALDAHL WB (1988). In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol* 59: 656-670.
21. YAMAZAKI K, NAKAJIMA T, AOYAGI T, HARA K (1994). Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodontol Res* 28: 324–334.
22. GEMMELL E, WINNING TA, GRIECO DA, BIRD P, SEYMOUR GJ (2000). The influence of genetic variation on the splenic T cell cytokine and specific serum antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol* 71: 1130–1138.
23. GEMMELL E, SERNIA C, GRIECO DA, BIRD P, ALLEN CJ, SEYMOUR GJ (2001). Genetic variations in the recognition of *Porphyromonas gingivalis* antigens in mice. *Oral Microbiol Immunol* 16: 129–135.
24. BERGLUNDH T, LILJENBERG B, TARKOWSKI A, LINDHE J (2002). The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 29: 281–286.
25. BERGLUNDH T, DONATI M, ZITZMANN N (2007). B cells in periodontitis – friends or enemies? *Periodontology 2000* 45: 51–66.
26. SALVI GE, BROWN CE, FUJIHASHI K, KIYONO H, SMITH FW, BECK JD, *et al.* (1998). Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontol Res* 33: 212–225.
27. BERGLUNDH T, DONATI M (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol* 32 (6 suppl): 87–107.
28. KINANE DF, BARTOLD PM (2007). Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontology 2000* 43: 278–293.
29. TSAI CC, KU CH, HO YP, HO KY, WU YM, HUNG CC (2007). Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferongamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci* 23: 1–7.
30. DUTZAN N, VERNAL R, HERNANDEZ M, DEZEREGA A, RIVERA O, SILVA N, AGUILLON JC, PUENTE J, POZO P, GAMONAL J (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 80: 290–296.

31. RANTONEN P (2003). Salivary flow and composition in healthy and diseased adults (Dissertation). Helsinki: University of Helsinki.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 0330.0.115.000-10, intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO SUBGENGIVAL E DA SALIVA ASSOCIADO À RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR EM ADULTOS COM OU SEM PERIODONTITE CRÔNICA”**, tendo como Pesquisadora Responsável Priscilla Farias Naiff.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 10 de novembro 2010.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador CEP/UFAM

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo à revista científica.

From: plosone@plos.org

> To: berth@ioc.fiocruz.br

> Date: Tue, 8 May 2012 19:50:28 -0400

> Subject: Submission Confirmation for CELL IMMUNOPHENOTYPING AND SALIVA IMMUNOGLOBULINS PROFILE IN ADULTS WITH OR WITHOUT CHRONIC PERIODONTITIS

>

> Dear Dr. Bertho,

>

> Your submission entitled "CELL IMMUNOPHENOTYPING AND SALIVA IMMUNOGLOBULINS PROFILE IN ADULTS WITH OR WITHOUT CHRONIC PERIODONTITIS" has been received by PLoS ONE. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://pone.edmgr.com/>.

>

> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

>

> Thank you for submitting your work to this journal.

>

> Kind regards,

>

> PLoS ONE