



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**SALIVA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS - RELAÇÃO ENTRE
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E PERIODONTITE**

Trabalho submetido por
Marta Sofia d'Almeida Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2014



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**SALIVA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS - RELAÇÃO ENTRE
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E PERIODONTITE**

Trabalho submetido por
Marta Sofia d'Almeida Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

Setembro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este projeto final de curso aos meus Pais.
Sem eles nunca teria sido possível.
Muito obrigada por tudo, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita, que aceitou ser orientadora deste projeto sem sequer hesitar. Obrigada por toda a disponibilidade e por todo o conhecimento demonstrado. Grata por tudo.

À Doutora Ana Cristina Manso, que desde sempre apoiou este projeto. Não poderia deixar de salientar toda a ajuda e paciência demonstradas. Obrigada também por todo o entusiasmo, por todo o apoio, colaboração e empenho.

À Doutora Alexandra Bernardo e à Doutora Margarida Moncada, pela essencial colaboração no que respeita à parte laboratorial e por todo o apoio prestado.

Ao Doutor Luís Proença, pelo apoio exemplar no tratamento dos dados e na análise estatística.

À Associação de Doentes com Lúpus, que aceitou, de forma entusiasta, participar neste projeto e que sempre se mostrou disponível e colaborante.

À minha família, por estarem sempre presentes e serem peças fundamentais na minha vida.

À Sara Moço, quase uma irmã, por toda ajuda, apoio, paciência e amizade demonstrada ao longo de todos os anos.

Ao Ricardo Cachinho, por todo o apoio prestado, em todas as circunstâncias, tendo sido um excelente colega de trabalho e amigo.

À Doutora Maria João Antunes, pela sua preciosa colaboração, amizade e por todo o seu espírito positivo.

À Carolina Costa, à Ines Guerreiro e à Inês Chibeles por ao longo destes anos terem mostrado não terem sido apenas colegas, mas também amigas.

A todos os participantes, sem eles este projeto seria impossível.

Muito obrigada a todos, por tudo.

Resumo

Objetivo: Estudar a possível relação entre o Lúpus Eritematoso Sistémico e a Periodontite, através do doseamento da Interleucina-6 e do Factor de Necrose Tumoral- α na saliva.

Materiais e Métodos: Estudo observacional, analítico e transversal, realizado numa amostra de 40 indivíduos, após seleção criteriosa. A amostra apresentava quatro grupos, cada um com 10 indivíduos: Grupo A – indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistémico e Doença Periodontal; Grupo B – indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistémico; Grupo C – indivíduos com Doença Periodontal; Grupo D – indivíduos saudáveis. Foi efetuada, nos 40 indivíduos que compunham a amostra, uma avaliação clínica com o objetivo de aferir a condição periodontal. Essa avaliação foi feita recorrendo ao Índice Periodontal Comunitário e ao Índice de Perda de Inserção Periodontal. Adicionalmente foram recolhidas amostras de saliva, que serviram de meio para o doseamento dos níveis de IL-6 e de TNF- α . Os dados recolhidos foram tratados, a nível estatístico, através do Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21 para Windows.

Resultados: Os níveis de TNF- α entre os diferentes grupos foram mais baixos no grupo D e mais elevados no grupo C (20,32 vs 25,68), embora a diferença não seja estatisticamente significativa ($p = 0,663$). Relativamente aos valores de IL-6, foram mais baixos no grupo D e mais elevados no grupo C (14,22 vs 23,99), embora sem significância estatística ($p = 0,227$). No que respeita às correlações entre as variáveis IPC, PIP e Idade, e os níveis de IL-6 e de TNF- α , em cada um dos grupos, todas apresentaram coeficientes de correlação sem significância estatística, exceto uma. No grupo B, o coeficiente de correlação entre a PIP e o TNF- α foi estatisticamente significativo ($p=0,045$) e positivo.

Conclusão: Nos indivíduos portadores de Lúpus Eritematoso Sistémico, um aumento dos níveis de TNF- α é coincidente com um aumento do grau de Perda de Inserção Periodontal.

Abstract

Objective: To study the possible relation between Systemic Lupus Erythematosus and Periodontitis through the determination of the Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α resident in the saliva.

Material and method: Observational, analytic and transversal study performed on a sample of 40 individuals, after a careful selection. The sample included four groups formed by ten subjects each: Group A – Individuals with Systemic Lupus Erythematosus and Periodontal disease; Group B – Individuals with Systemic Lupus Erythematosus; Group C – Individuals with Periodontal disease; Group D – Healthy individuals. It was performed, in the 40 individuals who comprised the sample, a clinical evaluation with the aim of obtaining periodontal status. This evaluation was done using the Community Periodontal Index and the Index of Periodontal Attachment Loss. Additionally, saliva samples, which served as a means to assay levels of IL-6 and TNF- α , were collected. The collected data were treated, at a statistical level, using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21 for Windows.

Results: The levels of TNF- α detected in the different groups were lower in group D and highest in the group C (20.32 vs 25.68), although the difference is not statistically significant ($p = 0.663$). For the values of IL-6, they were lower in group D and higher in group C (14.22 vs 23.99), although without statistical significance ($p = 0.227$). Regarding the correlations between IPC, PIP and Age variables, and levels of IL-6 and TNF- α in each group, all showed a correlation coefficient not statistically significant, except one. In group B, the correlation coefficient between the PIP and TNF- α was statistically significant ($p = 0.045$) and positive.

Conclusion: In individuals with Systemic Lupus Erythematosus, increased levels of TNF- α is coincident with an increase in the degree of Periodontal Attachment Loss.

Índice

I – INTRODUÇÃO	13
1 – Enquadramento Teórico.....	13
2 – Objetivos.....	21
3 – Hipóteses.....	21
II – MATERIAIS E MÉTODOS	23
1 – Considerações Éticas	23
2 – Tipo de Estudo	23
3 – Local do estudo.....	23
4 – Estudo clínico	24
4.1) Amostra.....	24
4.2) Seleção da amostra.....	24
4.3) Calibração dos examinadores (para todos os índices)	29
4.4) Determinação da taxa de fluxo salivar não-estimulado (em todos os grupos)	29
4.5) Determinação da taxa de fluxo salivar estimulado (em todos os grupos).....	29
4.6) Doença Periodontal.....	30
5 – Conservação das amostras salivares recolhidas.....	31
6 – Medição dos níveis de IL-6 e TNF- α nas amostras salivares	32
7 – Base de dados para registo.....	33
8 – Análise estatística	33
III – RESULTADOS	35
1 – Caraterização da amostra	35
1.1 – Grupos	35
1.2 – Género	35
1.3 – Idade	35
1.4 – Índice Periodontal Comunitário (IPC)	37
1.5 – Índice de Perda de Inserção Periodontal (PIP).....	37
1.6 – Taxa de fluxo salivar não-estimulado	38
2 – Análise estatística dos mediadores inflamatórios	38
2.1 – Estatística descritiva das variáveis TNF- α e IL-6	39
2.2 – Comparação dos níveis de TNF- α entre os grupos da amostra.....	40
2.3 – Comparação dos níveis de IL-6 entre os grupos da amostra.....	40

2.4 – Correlação das variáveis TNF- α , IL-6, IPC, PIP e idade	41
IV – DISCUSSÃO.....	49
V – CONCLUSÃO.....	55
VI – BIBLIOGRAFIA.....	57
VII – ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico 1 – Género.....	35
Gráfico 2 – TNF- α	39
Gráfico 3 – IL-6.....	39
Gráfico 4 – TNF- α	40
Gráfico 5 – IL-6.....	41
Gráfico 6 – TNF- α e género, grupo A.....	43
Gráfico 7 – IL-6 e género, grupo A.....	43
Gráfico 8 – TNF- α e género, grupo B.....	44
Gráfico 9 – IL-6 e género, grupo B.....	44
Gráfico 10 – TNF- α , IL-6 e género, grupo C.....	45
Gráfico 11 – TNF- α e género, grupo C.....	46
Gráfico 12 – IL-6 e género, grupo C.....	46
Gráfico 13 – TNF- α , IL-6 e género, grupo D.....	47
Gráfico 14 – TNF- α e género, grupo D.....	47
Gráfico 15 – IL-6 e género, grupo D.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos.....	35
Tabela 2 – Idade.....	36
Tabela 3 – Idade.....	36
Tabela 4 – Índice Periodontal Comunitário.....	37
Tabela 5 – Perda de Inserção.....	38
Tabela 6 – Taxa de fluxo salivar na totalidade da amostra.....	38
Tabela 7 – Taxa de fluxo salivar em cada grupo.....	38
Tabela 8 – Estatísticas descritivas TNF- α e IL-6.....	39
Tabela 9 – TNF- α	40
Tabela 10 – IL-6.....	40
Tabela 11 – Correlações grupo A.....	41
Tabela 12 – Correlações grupo B.....	41
Tabela 13 – Correlações grupo C.....	42
Tabela 14 – Correlações grupo D.....	42
Tabela 15 – TNF- α e IL-6, grupo C.....	45
Tabela 16 – TNF- α e IL-6, grupo D.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides

DP – Doença Periodontal

EGOHID - *European Global Oral Health Indicators Development*

IgG – Imunoglobulina G

IL-6 – Interleucina-6

IPC – Índice Periodontal Comunitário

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

LES – Lúpus Eritematoso Sistémico

MIMD – Mestrado Integrado em Medicina Dentária

min – Minuto

ml – Mililitro

MMPs – Metaloproteinases

PIP – Índice de Perda de Inserção Periodontal

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

Th0 – *T helper 0*

Th1 – *T helper 1*

Th2 – *T helper 2*

TNF- α – Factor de Necrose Tumoral

UV – Ultravioleta

°C – Grau Celsius

I – INTRODUÇÃO

1 – Enquadramento Teórico

Este estudo tem como objetivo relacionar o Lúpus Eritematoso Sistémico com a Doença Periodontal, relação essa que será feita através dos mediadores inflamatórios, nomeadamente através das citocinas Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral ($\text{TNF-}\alpha$).

As citocinas possuem um papel importante na regulação da inflamação sistémica, nos danos tecidulares locais e na modulação da imunidade (Jacob & Stohl, 2011). São mediadores peptídicos de baixo peso molecular, que regulam a resposta imunitária inflamatória (Lins *et al.*, 2010), e que, quando se ligam aos seus recetores, induzem uma cascata de eventos que pode causar tanto a inibição como a ativação da transcrição de genes controlados pelas mesmas. A partir dessa ligação, as células alvo podem responder à ação das citocinas de várias formas: proliferação e diferenciação, inibição do crescimento, apoptose, quimiotaxia, resistência à infeção viral, promoção de adesão intercelular e regulação da adesão à matriz extracelular (Marques, 2009). As citocinas têm extrema importância no sistema imunitário, não só na fase efetora de uma doença autoimune, cuja auto-tolerância se encontra comprometida, mas também na fase de iniciação da autoimunidade, onde é gerada uma resposta imunitária contra os próprios antígenos (Kariuki & Niewold, 2010). Os marcadores inflamatórios são caracterizados segundo o fenótipo da célula T que lhe deu origem, sendo que esse fenótipo varia entre Th1, Th2 e Th0. Em resposta à estimulação antigénica, as células Th1 vão produzir, entre outras, o $\text{TNF-}\alpha$, que vai promover a imunidade mediada por células; e as células Th2 vão secretar, entre outras, a IL-6, que vai favorecer a imunidade humoral e induzir a produção de anticorpos (Toro *et al.*, 2000; Marques, 2009).

O $\text{TNF-}\alpha$ é uma citocina produzida por uma larga variedade de tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos e células não-imunológicas na resposta a inflamações, infeções e outros desafios ambientais (Jacob & McDevitt, 1988; Urra & Torre, 2012). Este contribui para evitar o desenvolvimento da autoimunidade e a produção de anticorpos, possuindo duas funções *major*: funcionar como uma citocina imunorreguladora e ser um potente mediador inflamatório (Aringer *et al.*, 2007; Urra & Torre, 2012). Por sua vez, a IL-6 é também produzida por uma vasta gama de tipos

celulares, incluindo monócitos, células T, fibroblastos, células endoteliais e sinoviócitos (Ishihara & Hirano, 2002; Urra & Torre, 2012), e apresenta uma vasta atividade biológica em várias células alvo (Ohl & Tenbrock, 2011). Esta citocina serve como fator de diferenciação para várias células hematopoiéticas (Ohl & Tenbrock, 2011), diferenciação de células B em células do plasma, indução da produção de IgG (Muraguchi *et al.*, 1988; Ohl & Tenbrock, 2011), diferenciação e proliferação de células T (Lotz, Jirik & Kabouridis, 1988; Ohl & Tenbrock, 2011) e macrófagos (Sachs, Lotem & Shabo, 1989; Ohl & Tenbrock, 2011), maturação das células estaminais da medula óssea, ativação dos neutrófilos, estimulação da produção de plaquetas através dos megacariócitos, diferenciação dos osteoclastos (Tackey, Lipsky & Illei, 2004; Ohl & Tenbrock, 2011), sendo ainda o maior fator de estimulação hepática e induzindo a libertação de proteínas de fase aguda (Heinrich, Castell & Andus, 1990; Ohl & Tenbrock, 2011).

Estudos realizados defendem que polimorfismos genéticos das citocinas, existentes tanto no Lúpus Eritematoso Sistémico como na Doença Periodontal, tornam os doentes lúpicos mais suscetíveis à Doença Periodontal, devido a uma disfunção das suas respostas imunitárias (Meyer *et al.*, 2000; Júnior, Cantisano, Klumb, Dias & Silva, 2010).

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença sistémica autoimune, de carácter reumático, caracterizada por uma resposta imunitária contra os auto-antígenos, maioritariamente intracelulares (Pons-Estel, Alarcón, Scofield, Reinlib & Cooper, 2008; Crispin *et al.*, 2010). A sua etiologia é desconhecida, contudo acredita-se que resulta de uma interação entre estímulos externos e uma suscetibilidade genética individual (Gordon, Li & Isenberg, 2009). Como é de realçar nas doenças autoimunes, a sua patogénese é multifatorial, sendo esta influenciada por fatores genéticos e ambientais, bem como por anormalidades imunitárias quer no sistema inato quer no sistema adaptativo (Gualtierotti, Biggioggero, Penatti & Meroni, 2010).

Esta é uma das mais variadas doenças autoimunes, na medida em que pode afetar qualquer órgão do corpo e apresentar um amplo espectro de manifestações quer clínicas quer imunológicas (Crispín *et al.*, 2010; O'Neill & Cervera, 2010; Tsokos, 2011; Liu, Kao, Manzi & Ahearn, 2013), variando entre episódios de remissão e episódios de doença ativa (Smith & Gordon, 2010). Em termos orais, dentro de um vasto leque de manifestações, destaca-se a Doença Periodontal (Júnior *et al.*, 2010). O sistema imunitário dos doentes com LES está largamente comprometido (Crispín *et al.*, 2010),

visto que estes doentes produzem grandes quantidades de anticorpos contra as suas próprias estruturas celulares (Júnior *et al.*, 2010). Bastantes esforços têm sido feitos para se conseguir compreender a etiopatogenia do LES, através do desenvolvimento de testes de diagnóstico e dos biomarcadores, e devido aos avanços relativos a esta patologia, um impressionante número de biomarcadores tem sido associado à mesma (Liu *et al.*, 2013).

O desequilíbrio nos níveis de citocinas e nos seus recetores encontrado no LES é crucial no desenvolvimento da doença, na medida em que as citocinas estão ativamente envolvidas na produção de auto-anticorpos e na promoção da inflamação nos tecidos afetados (Urrea & Torre, 2012). Uma produção desregulada de citocinas contribui para uma disfunção imunológica e medeia inflamações tecidulares e danos nos diferentes órgãos (Ohl & Tenbrock, 2011), atribuindo-lhes um papel muito importante na patogénese do LES como marcadores indiretos, culminando na desregulação das respostas imunitárias nestes doentes (Liu *et al.*, 2013). Dentro do vasto leque de citocinas inflamatórias, a IL-6 e o TNF- α têm sido identificadas como peças fundamentais no LES (Ohl & Tenbrock, 2011).

Focando concretamente a IL-6, polimorfismos genéticos ao nível do seu promotor parecem conferir suscetibilidade para o desenvolvimento de LES em diferentes populações (Yap & Lai, 2010), e os seus níveis apresentam uma relação positiva quer com a atividade da doença quer com os níveis de anti-DNA (Linker-Israeli *et al.*, 1991; Grondal *et al.*, 2000; Yap & Lai, 2010). Quando comparados com indivíduos saudáveis, os doentes com Lúpus apresentam uma quantidade aumentada de imunoglobulinas circulantes, como consequência de uma quantidade aumentada de linfócitos B (Linker-Israeli *et al.*, 1991). Foi demonstrado que os linfócitos B de pacientes com Lúpus apresentam uma produção espontânea de anti-dsDNA e que a síntese deste auto-anticorpo é predominantemente secretada por linfócitos B de baixa densidade (Kitani *et al.*, 1992), que por sua vez são diferenciados diretamente em células produtoras de imunoglobulinas através da IL-6 (Yap & Lai, 2010). Além dos efeitos sistémicos, comprovou-se que a IL-6 tem uma ligação estreita com as nefrites lúpicas (Tsai, Wu, Yu, Lu & Tsai, 2000; Yap & Lai, 2010). Um estudo de Herrera-Esparza, Barbosa-Cisneros, Villalobos-Hurtado & Avalos-Diaz (1998) demonstrou uma excreção urinária elevada de IL-6 em doentes lúpicos com nefrite proliferativa ativa, que apresentavam simultaneamente uma quantidade aumentada de anticorpos anti-dsDNA. A isto acresce um reforço na expressão *in situ* de IL-6 ao longo dos glomérulos e túbulos renais nos

doentes com nefrite lúpica (Yap & Lai, 2010), um excesso de IL-6 no líquido cefalorraquidiano de doentes que apresentam manifestações neuropsiquiátricas (Hirohata, Kanai, Mitsuo, Tokano & Hashimoto, 2009; Yap & Lai, 2010) e o envolvimento da IL-6 nas alterações articulares existentes no LES (Ohl & Tenbrock, 2011). Pensa-se também que a libertação de IL-6 pode representar um papel na exacerbação do LES causada pela fotossensibilidade, visto que o *rash* cutâneo presente nos doentes lúpicos é frequentemente provocado pela luz ultravioleta (UV), e a exposição a essa mesma luz induz as células resultantes da fração monócitos/macrófagos a produzir IL-6 (Pelton, Hylton, & Denman, 1992; Dean, Tyrrell-price, Crawley & Isenberg, 2000).

Relativamente ao TNF- α , estudos demonstram que o aumento de genótipos promotores desta citocina representa um fator de risco significativo para o LES, estando este envolvido em diversos mecanismos de indução da patologia (Marques, 2009). Esta citocina ajuda a prevenir o desenvolvimento de LES mas, uma vez que a doença esteja estabelecida, vai agravar a inflamação e a patogénese resultantes (Clark, Markham, Sloan & Poole, 2012), apresentando-se como uma citocina bastante importante no desenvolvimento de danos autoimunitários no sistema renal e nervoso central – as causas mais frequentes de morte observadas no LES –, o que demonstra que os seus níveis estão relacionados com a severidade da doença (Urra & Torre, 2012). O TNF- α é produzido a nível sistémico e atua como um fator de crescimento para as células B, células essas que, posteriormente, também estimulam a produção de IL-6 (Clark *et al.*, 2012). Além da sua produção sistémica, a produção local do TNF- α contribui para o desenvolvimento do LES (Herrera-Esparza *et al.*, 1998; Jacob & Stohl, 2011), na medida em que os imunocomplexos gerados pelos auto-anticorpos são depositados nos tecidos e nos órgãos, e esse depósito é mediado, a nível inflamatório, principalmente por esta citocina (Urra & Torre, 2012). Especula-se que os macrófagos, estimulados por complexos imunes presentes no LES, induzam a uma maior produção de TNF- α , e este, devido à sua ação pró-inflamatória, leve à existência de uma inflamação e destruição exacerbadas (Marques, 2009). O TNF- α possui um papel essencial na apoptose, e, durante este processo, induz a translocação de antigénios Ro e La intracelulares para a superfície da célula, desencadeando, assim, a autoimunidade. Com isto, ocorre o aumento do processo inflamatório e origina-se uma resposta autoimune por meio da ativação e da maturação de células dendríticas, essenciais na regulação da resposta imune e implicadas na imunidade do LES. Essa resposta imune vai estimular o

TNF- α a induzir quimiocinas e moléculas de adesão intercelulares e de adesão vascular, as quais, por sua vez, recrutam células inflamatórias, que vão potencializar ainda mais o processo inflamatório e as lesões tecidulares existentes nos doentes lúpicos (Marques, 2009).

No que respeita à patogénese, o LES e a Doença Periodontal possuem características semelhantes (Kobayashi *et al.*, 2003; Sales, Chaves & Vassalo, 2010), como a existência de influências imunológicas, com uma produção alterada de citocinas (Sales *et al.*, 2010). À semelhança do que acontece no LES, as citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- α parecem ser mediadores *major* da Doença Periodontal (Noh *et al.*, 2013).

A Doença Periodontal é uma doença crónica inflamatória de elevada prevalência, que destrói os tecidos de suporte dos dentes (Hajishengallis, 2010), destruição essa que é resultante de infeções localizadas e de condições inflamatórias (Ali, Pramod, Tahir & Ansari, 2011), que, na sua forma agressiva, pode levar à perda dentária e exercer um impacto sistémico significativo sobre a saúde (Pihlstrom, Michalowicz & Johnson, 2005; Hajishengallis, 2010). Esta patologia resulta assim da resposta inflamatória do indivíduo face ao biofilme oral existente, no entanto, é a suscetibilidade inata do doente que determina o resultado final do processo patológico, ou seja, é a natureza da resposta inflamatória que vai definir o grau de destruição da doença (Silveira & Alves, 2009). A Doença Periodontal inflamatória difere das outras infeções por não ser apenas causada por um único micro-organismo mas sim por um grupo de bactérias (Lima & Lara, 2013), na medida em que o biofilme oral causador da patologia engloba um vasto grupo de organismos anaeróbios gram-negativos (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith & Kent, 1998; Hajishengallis, 2010). As bactérias mais descritas como patogénicas e comuns são *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 (Socransky *et al.*, 1998; Naiff, Orlandi & Santos, 2012).

A suscetibilidade e a gravidade da destruição periodontal parecem ser determinadas pelo equilíbrio ao nível das citocinas, que são produzidas pelas diversas associações entre micro-organismos periodontais (Ford, Gamonal & Seymour, 2010; Naiff *et al.*, 2012). A resposta primária imunológica na Doença Periodontal acontece após a colonização do sulco gengival pelos micro-organismos periodontais, que estimulam o

epitélio gengival a produzir mediadores inflamatórios, como as citocinas, resultando numa expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade dos capilares gengivais e quimiotaxia de neutrófilos do epitélio juncional para o sulco gengival (Ford, Gamonal & Seymour, 2010; Naiff *et al.*, 2012), o que faz com que o papel exercido por algumas citocinas pró-inflamatórias na inflamação periodontal destrutiva esteja bem estabelecido (Hajishengallis, 2010).

De entre as várias citocinas encontradas no Fluido Gengival Crevicular como potenciais marcadores de diagnóstico, encontra-se o TNF- α , que atua na reabsorção óssea, e a IL-6, que atua na destruição e na reparação da matriz extracelular (Rossomando, Kennedy & Hadjimichael, 1990; Nussbaum & Shapira, 2011; Naiff *et al.*, 2012).

Estes dois mediadores participam em cascatas de proteção do hospedeiro, mas, em situações em que estas sejam produzidas de forma desordenada, vão destruir os tecidos gengivais e intensificar a reabsorção óssea (Silveira & Alves, 2009). Durante a Doença Periodontal, as células inflamatórias do hospedeiro são recrutadas, e a IL-6 e o TNF- α são libertados dos fibroblastos, dos macrófagos, do tecido conjuntivo e das células epiteliais juncionais (Kinney *et al.*, 2011), afetando a atividade dos leucócitos, osteoblastos e osteoclastos, e promovendo o processo de remodelação tecidular, quer a nível sistémico quer a nível local. As collagenases, que incluem as MMPs, são mediadas por uma variedade de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α , e são libertadas pelos fibroblastos gengivais, levando à destruição do colagénio e à reabsorção óssea (Noh *et al.*, 2013). O TNF- α é considerado a citocina *major* envolvida na patogénese da Doença Periodontal, potenciando a destruição tecidular e reações erosivas. Tem sido sugerido que os níveis de expressão proteica da IL-6 e do TNF- α deveriam ser parâmetros clínicos das alterações inflamatórias periodontais (Noh *et al.*, 2013).

A definição dos critérios de suscetibilidade individual tem uma importância cada vez maior, por isso, estudos têm sido realizados com portadores de condições sistémicas que possivelmente teriam alguma influência na saúde periodontal, como é o caso do LES (Rhodus & Johnson, 1990; Meyer *et al.*, 1997; Sales, Falabella, Falabella, Teixeira & Figueredo, 2008). O comprometimento vascular regional, a terapia com corticosteroides ou o desequilíbrio de citocinas presentes no LES podem resultar em alterações da resposta imune do hospedeiro ou numa ativação de osteoclastos, repercutindo-se, posteriormente, na condição periodontal (Nagler, Lorber, Ben-Arieh, Laufer & Pollack, 1999; Sales *et al.*, 2008).

A literatura defende que a Doença Periodontal apresenta maior prevalência em doentes com LES em comparação com doentes saudáveis (Meyer *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2003), contudo, a Doença Periodontal nestes doentes é considerada menos grave (Júnior *et al.*, 2010). Este facto pode, em parte, dever-se aos fármacos imunossupressores e anti-inflamatórios normalmente administrados nos doentes lúpicos, que podem evitar o crescimento de bactérias periodonto-patogénicas e, conseqüentemente, proteger contra a destruição periodontal (Sales, Vassalo, Chaves & Aarestrup, 2009). Segundo um estudo de Mutlu, Richards, Maddison & Scully (1993) os valores de profundidade das bolsas são significativamente menores nos portadores com LES, no entanto, num estudo de Meyer *et al.* (1997), verificam-se maiores perdas dentárias e inflamação gengival nos pacientes com LES severo e correlação da gravidade da Doença Periodontal com um padrão de imunoglobulinas (Sales *et al.*, 2008). Num estudo de Fabbri *et al.* (2014) foi demonstrado que a intervenção periodontal em doentes com LES apresenta um efeito benéfico no controlo da doença, em pacientes sujeitos a terapia imunossupressora. Contudo, suspeita-se que, em combinação com uma alteração imunitária complexa, essa mesma terapia imunossupressora empregue no tratamento do LES seja responsável pela alta taxa de lesões periodontais em portadores dessa patologia (Meyer *et al.*, 1997; Sales *et al.*, 2008), visto que a imunossupressão causada pela terapia farmacológica é um efeito desejável nas doenças autoimunes, mas pode facilitar a ocorrência de infeções (Rodrigues, Mazzoleni, Mazzilli, Pereira & Martins, 2013). Outros estudos relatam não terem sido encontradas, nos doentes com LES controlado, alterações nos dados laboratoriais ou danos periodontais significativos, quando comparados com indivíduos controlo saudáveis (Nagler, Lorber, Ben-Arieh, Laufer & Pollack, 1999; Sales *et al.*, 2008).

Devido às semelhanças entre o quadro imunológico destas duas patologias, desenvolveram-se teorias que estabelecem uma relação entre ambas (Novo, Garcia-MacGregor, Viera, Chaparro & Crozzoli, 1999; Miceli, Braga, Áreas, Figueredo & Fischer, 2005). O LES é uma patologia inflamatória crónica de natureza autoimune (Ahsan, Ali & Ali, 2003; Sales *et al.*, 2010), assim como a Doença Periodontal, que também se apresenta como uma patologia inflamatória crónica (Pihlstrom *et al.*, 2005; Hajishengallis, 2010). Atualmente, defende-se que, nas doenças inflamatórias, é o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que determina o grau

e a extensão da inflamação que posteriormente leva a efeitos clínicos *major* (Dean *et al.*, 2000). Os distúrbios imunitários responsáveis pela expressão clínica das patologias podem, em parte, ser explicados pela desregulação das citocinas, (Ripley, Goncalves, Isenberg, Latchman & Rahman, 2005), visto que, apesar de apresentarem etiologias distintas, têm em comum os mecanismos destrutivos, ocasionados por desregulações do sistema imunitário (Júnior *et al.*, 2010). Tal como dito anteriormente, tanto os níveis de TNF- α como os de IL-6 encontram-se alterados nas duas patologias em causa (Kariuki & Niewold, 2010; Naiff *et al.*, 2012). No LES, estas duas citocinas aumentam espontaneamente nas recidivas da doença (Dean *et al.*, 2000), e o sistema imunitário está, em termos gerais, comprometido, levando a que uma desregulação de um elemento simples cause repercussões em todo o sistema (Crispín *et al.*, 2010). Fatores que modifiquem a resposta imunitária às agressões bacterianas são determinantes no que respeita à suscetibilidade para o desenvolvimento da Doença Periodontal (Modéer & Wondimu, 2000). Tanto a IL-6 como o TNF- α possuem funções protetoras em situações de normalidade, no entanto, quando produzidas de forma exagerada, atuam na cavidade oral destruindo os tecidos gengivais e intensificando a reabsorção óssea (Silveira & Alves, 2009), através de alterações na atividade dos leucócitos, osteoblastos e osteoclastos (Noh *et al.*, 2013).

Os resultados dos estudos sugerem que a Doença Periodontal destrutiva e a sua progressão estão associadas a mudanças nos vários componentes causadores de respostas de fase aguda (Craig *et al.*, 2003; Sllamniku-Dalipi *et al.*, 2013), sendo que nos doentes com LES, aquando do aumento de IL-6 e de TNF- α , existe a indução de proteínas de fase aguda pelo fígado (Dean *et al.*, 2000). Doenças sistémicas podem interferir na condição periodontal e vice-versa (Naiff *et al.*, 2012), da mesma maneira que a terapia periodontal atua sobre a resposta inflamatória sistémica (Sales *et al.*, 2010). Sendo, tanto a Doença Periodontal como o LES, duas patologias de carácter inflamatório influenciadas por aspetos infecciosos, é plausível sugerir que ambas as patologias se relacionam entre si, influenciando a sua progressão (Júnior *et al.*, 2010). Apesar das semelhanças encontradas entre o LES e a Doença Periodontal apontarem para a possibilidade de existir uma relação entre as duas patologias, a literatura acerca do estado periodontal de doentes com LES é escassa, e muitos dos dados existentes são bastante contraditórios entre si (Sales *et al.*, 2010).

No entanto, a coexistência de Periodontite e LES mostra-se uma característica comum, devendo a Doença Periodontal ser considerada como uma manifestação clínica do LES,

na medida em que existem aspetos relacionados com esta patologia que podem favorecer o desenvolvimento da Periodontite (Sales *et al.*, 2008).

2 – Objetivos

Os objetivos do estudo são:

- Quantificar, na saliva, 3 medidores inflamatórios que estão presentes nas doenças Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Doença Periodontal (DP).
- Estudar a relação entre os mediadores inflamatórios quantificados, Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Doença Periodontal (DP).

3 – Hipóteses

As hipóteses do estudo são:

- Não existe relação direta entre a concentração da IL-6, o LES e a DP.
- Não existe relação direta entre a concentração do TNF- α , o LES e a DP.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Considerações Éticas

O estudo foi inicialmente autorizado pela Associação de Doentes com Lúpus e, posteriormente, submetido à Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz para realização deste projeto de investigação, tendo sido aprovado.

Todos os participantes foram esclarecidos acerca dos objetivos do estudo e informados sobre a confidencialidade dos dados, bem como sobre a possibilidade de desistirem em qualquer fase do processo. Para comprovar esta informação, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Informado, o qual esclarecia os participantes precisamente sobre as informações supramencionadas.

2 – Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo observacional, analítico e transversal, que tinha como principal objetivo avaliar uma possível relação entre o Lúpus Eritematoso Sistémico e a Doença Periodontal, através da quantificação dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α , presentes em amostras de saliva estimulada recolhidas dos participantes. Posteriormente, foi feita análise imunológica dessas mesmas amostras, pelo método ELISA. Avaliou-se também a existência de Doença Periodontal nos participantes, avaliação essa que foi feita através do Índice Periodontal Comunitário (IPC) e do Índice de Perda de Inserção Periodontal (PIP), tendo sido considerados doentes periodontais aqueles que apresentavam bolsas periodontais em que haveria necessidade de recorrer a tratamento periodontal.

3 – Local do Estudo

A componente clínica do estudo foi realizada na Clínica Universitária Egas Moniz do ISCSEM e na Associação de Doentes com Lúpus, e a componente laboratorial foi realizada no Laboratório BioquiLab – Laboratório de Bioquímica do ISCSEM.

4 – Estudo clínico

4.1) Amostra

A amostra foi constituída por doentes da Clínica Universitária Egas Moniz do ISCSEM e por membros da Associação de Doentes com Lúpus. A recolha dos dados assumiu as seguintes características: a) a recolha de dados não identificou o indivíduo; b) a recolha de dados foi feita em ambiente sigiloso; c) os dados obtidos foram apenas utilizados para este estudo; d) os testes realizados não foram prejudiciais para qualquer um dos elementos do estudo; e) todos os doentes estavam esclarecidos em relação aos procedimentos usados; f) todos os doentes participaram de forma voluntária.

4.2) Seleção da amostra

A amostra foi constituída por 40 participantes, subdividida em quatro grupos:

- Grupo A, constituído por 10 participantes diagnosticados com LES que apresentavam também Doença Periodontal;
- Grupo B, constituído por 10 participantes diagnosticados apenas com LES;
- Grupo C, constituído por 10 participantes apenas com Doença Periodontal;
- Grupo D, constituído por 10 participantes saudáveis.

A todos os 40 participantes foi realizada uma avaliação clínica, com o propósito de diagnosticar o grau de Doença Periodontal (recorrendo ao IPC) e o nível de Perda de Inserção Periodontal. Foi também realizada, em cada um dos 40 participantes, a recolha de uma amostra salivar, que serviu como meio de avaliação da quantidade de mediadores inflamatórios.

4.2.1) Critérios de Inclusão

Para cada grupo, existiam critérios de inclusão específicos:

Grupo A

- Diagnóstico confirmado de LES e, simultaneamente, ser membro da Associação de Doentes com Lúpus
- Mais de 18 anos
- Existência de perda de inserção
 - 1-2mm (Periodontite ligeira)
 - 3-4mm (Periodontite moderada)
 - 5-6mm (Periodontite severa)
- Presença de bolsas periodontais (≥ 4 mm) (Ylöstalo, Suominen-Taipale, Reunanen & Knuuttila, 2008; Kinney *et al.*, 2011)
- Medição de IPC e PIP em sextantes com dois ou mais dentes que não estejam indicados para extração (Bourgeois, Pitts, Ottolenghi, Senekola & Llodra, 2008)

Grupo B

- Diagnóstico confirmado de LES e, simultaneamente, ser membro da Associação de Doentes com Lúpus
- Mais de 18 anos
- Medição de IPC e PIP em sextantes com dois ou mais dentes que não estejam indicados para extração (Bourgeois *et al.*, 2008)

Grupo C

- Mais de 18 anos
- Existência de perda de inserção
 - 1-2mm (Periodontite ligeira)
 - 3-4mm (Periodontite moderada)
 - 5-6mm (Periodontite severa)

- Presença de bolsas periodontais (≥ 4 mm) (Ylöstalo *et al.*, 2008; Kinney *et al.*, 2011)
- Medição de IPC e PIP em sextantes com dois ou mais dentes que não estejam indicados para extração (Bourgeois *et al.*, 2008)

Grupo D

- Mais de 18 anos
- Medição de IPC e PIP em sextantes com dois ou mais dentes que não estejam indicados para extração (Bourgeois *et al.*, 2008)

4.2.2) Critérios de Exclusão

Tal como nos critérios de inclusão, existiam critérios de exclusão específicos:

Grupo A

- Gravidez (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Lactação (Kinney *et al.*, 2011)
- Doença metabólica óssea (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Diabetes (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Tratamento periodontal ou terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias, nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011)
- Valores de IPC com códigos correspondentes a 0, 1 e 2
- Valores de PIP com código correspondente a 0
- Desdentado total (Chopra, Gupta, Lakhanpal, Rao & Vashisth, 2013)
- Tabagismo (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Distúrbios hemostáticos (interfere na hemorragia gengival – altera IPC) (Bourgeois *et al.*, 2008)
- Doença oncológica (Arias, Aller, Sánchez-Patan & Arias, 2006)
- Obesidade (Duarte *et al.*, 2014)

Grupo B

- Gravidez (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Lactação (Kinney *et al.*, 2011)
- Doença metabólica óssea (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Diabetes (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Tratamento periodontal ou terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias, nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011)
- Valores de IPC com códigos correspondentes a 3 e a 4
- Valores de PIP com código correspondente a 1, 2 e 3
- Desdentado total (Chopra *et al.*, 2013)
- Tabagismo (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Distúrbios hemostáticos (interfere na hemorragia gengival – altera IPC) (Bourgeois *et al.*, 2008)
- Doença oncológica (Arias *et al.*, 2006)
- Obesidade (Duarte *et al.*, 2014)

Grupo C

- Gravidez (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Lactante (Kinney *et al.*, 2011)
- Doença sistémica (inclui hipossialia, metabólica óssea, autoimune e diabetes) (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Tratamento periodontal ou terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011)
- Valores de IPC com códigos correspondentes a 0 e a 1
- Valores de PIP com código correspondente a 0
- Desdentado total (Chopra *et al.*, 2013)
- Tabagismo (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Distúrbios hemostáticos (interfere na hemorragia gengival – altera IPC) (Bourgeois *et al.*, 2008)
- Obesidade (Duarte *et al.*, 2014)
- Doença oncológica (Arias *et al.*, 2006)
- Diagnóstico confirmado de LES

Grupo D

- Gravidez (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Lactante (Kinney *et al.*, 2011)
- Doença sistémica (inclui hipossialia, metabólica óssea, autoimune e diabetes) (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Tratamento periodontal ou terapêutica antibiótica por razões médicas ou dentárias nos últimos 3 meses (Kinney *et al.*, 2011)
- Valores de IPC com códigos correspondentes a 3 e a 4
- Valores de PIP com código correspondente a 1, 2 e 3
- Desdentado total (Chopra *et al.*, 2013)
- Tabagismo (de Araújo Navas *et al.*, 2012)
- Distúrbios hemostáticos (interfere na hemorragia gengival – altera IPC) (Bourgeois *et al.*, 2008)
- Obesidade (Duarte *et al.*, 2014)
- Doença oncológica (Arias *et al.*, 2006)
- Diagnóstico confirmado de LES

Além destes critérios, numa breve conversa acerca do historial clínico dos indivíduos participantes, foram recolhidas informações sobre a sua história clínica. Quaisquer informações relevantes para o estudo eram também anotadas e poderiam ser consideradas como critérios de exclusão, como por exemplo, outras patologias inflamatórias.

4.2.3) Estudo das variáveis

Foram estudadas as seguintes variáveis:

- Idade
- Género
- Grau de severidade da Doença Periodontal
- Perda de Inserção Periodontal
- Níveis de IL-6 presentes na saliva estimulada
- Níveis de TNF- α presentes na saliva estimulada
- Taxa de fluxo salivar não estimulado

4.3) Calibração dos examinadores (para todos os índices)

Inicialmente, e antes de qualquer observação clínica, foi efetuada a calibragem do examinador, na Clínica Universitária Egas Moniz.

Para o efeito, tanto o calibrador – um Médico Dentista experiente – como o examinador observaram 10 doentes escolhidos aleatoriamente, registando posteriormente os resultados quer do IPC quer da PIP, a duplo cego.

O grau de concordância inter-observador foi de cerca de 80% para as duas variáveis.

4.4) Determinação da taxa de fluxo salivar não-estimulado (em todos os grupos)

A saliva foi recolhida durante 5 minutos, para um tubo graduado de Falcon.

Foi explicado ao doente que deveria sentar-se numa posição confortável e relaxada, permanecendo com o tronco flexionado para a frente e com os olhos abertos, evitando qualquer movimento. No momento da recolha, a língua deveria apoiar na face palatina dos incisivos superiores, e a saliva deveria cair passivamente para o tubo.

Os resultados expressam-se em ml/min, existindo amplas variações entre pessoas.

Taxa de secreção **normal**-----**0.25-0.35ml/min**

Taxa de secreção **baixa**-----**0.1-0.25ml/min**

(Santos, Iglesias, Souza, Freitas & Galvão, 2007)

4.5) Determinação da taxa de fluxo salivar estimulado (em todos os grupos)

A saliva foi igualmente recolhida para um tubo graduado de Falcon.

Novamente, foi explicado ao doente que deveria sentar-se numa posição relaxada, com o tronco ligeiramente flexionado para a frente.

Durante 2 minutos, o doente mascou uma pastilha de parafina estéril de 1g (do teste CRT Buffer®, sem sabor e sem cor para estímulo mastigatório), desprezando a saliva acumulada durante esse tempo. A colheita salivar foi realizada nos 5 minutos seguintes.

O resultado expressa-se em ml/min, e a taxa varia também entre pessoas.

Taxa de secreção **normal**----- >1 ml/min

Taxa de secreção **baixa**----- <0.7ml/min

(Santos *et al.*, 2007)

4.6) Doença Periodontal

Para uma avaliação da condição periodontal dos indivíduos recorreu-se ao Índice Periodontal Comunitário (IPC) e ao Índice de Perda Inserção Periodontal (PIP), com base no *European Global Oral Health Indicators Development* (EGOHID) de 2008.

4.6.1) Determinação do Índice Periodontal Comunitário – IPC (em todos os grupos)

O Índice Periodontal Comunitário foi determinado através de uma sonda periodontal comunitária. Este índice permite avaliar três critérios periodontais: o sangramento gengival, a presença de cálculo e a presença de bolsas periodontais.

No que respeita à realização do exame, foi seguido um protocolo rígido. A boca foi dividida em sextantes (18-14, 13-23, 24-28, 38-34, 33-43, 44-48), sendo que apenas se avalia um sextante se estiverem presentes dois ou mais dentes que não estejam indicados para extração. No entanto, só foram sondados alguns dentes índice (17, 16, 11, 26, 27, 37, 36, 31, 46, 47). Na ausência dos dentes índice, todos os dentes do sextante foram examinados, e o terceiro molar apenas foi incluído caso estivesse a exercer a função de outro molar. Cada dente foi analisado em seis localizações, sendo elas Mesio-Vestibular, Centro-Vestibular, Disto-Vestibular, Disto-Palatino, Centro-Palatino e Mesio-Palatino.

Consoante as condições clínicas encontradas nas faces examinadas, através da sondagem, o dente foi classificado por códigos que variavam de zero a quatro. O resultado do exame foi registado num quadro, no qual um código único foi atribuído para cada um dos sextantes, de acordo com o dente que apresentava maior gravidade.

Critérios:

- 0 – Saúde gengival;
 - 1 – Hemorragia gengival;
 - 2 – Presença de cálculo;
 - 3 – Bolsa (4-5 mm);
 - 4 – Bolsa (6 mm ou mais);
 - 9 – Impossível de determinar;
 - X – Sextante excluído;
- (Bourgeois *et al.*, 2008)

4.6.2) Determinação do Índice de Perda de Inserção Periodontal – PIP (em todos os grupos)

Através de uma sonda periodontal comunitária, mediu-se a migração apical da margem gengival, em relação à junção amelo-cimentária.

Os valores foram registados segundo uma codificação, tendo sido registado o valor mais elevado de cada sextante.

Critérios:

- 0 – Saudável (0 mm);
- 1 – Leve (1 ou 2 mm);
- 2 – Moderada (3 ou 4 mm);
- 3 – Severa (5 mm)

(Bourgeois *et al.*, 2008)

5 – Conservação das amostras salivares recolhidas

A saliva estimulada foi recolhida em tubos graduados de Falcon e foi imediatamente congelada a uma temperatura de -80°C, até ser realizada a sua análise imunológica (Brailo *et al.*, 2012). A identificação das amostras após a recolha foi feita de um modo totalmente confidencial, respeitando o direito de privacidade do dador, de acordo com a Lei n.º12/2005, publicada em Diário da República. Cada amostra recolhida foi identificada com um código específico, garantindo, assim, a rastreabilidade da amostra e a separação de dados pessoais e clínicos.

6 – Medição dos níveis de IL-6 e TNF- α nas amostras salivares

Para se realizar a análise imunológica, todas as amostras salivares foram descongeladas cerca de uma a duas horas antes. Após as amostras estarem totalmente descongeladas, foram pipetadas para tubos específicos e, posteriormente, analisadas pelo equipamento IMMULITE, da Siemens, que, através da realização de imunoenaios de quimioluminescência automatizados, permitiu dosear os biomarcadores IL-6 e TNF- α presentes nessas mesmas amostras.

No que respeita ao funcionamento do sistema IMMULITE, são necessários vários componentes: amostras específicas, um reagente da fosfatase alcalina, um substrato quimioluminescente, e um anticorpo ou antigénio que se encontra alojado num dispositivo plástico sólido, denominado de unidade de teste. Este dispositivo serve como base para a reação imunitária, para a incubação e para o processo de lavagem, e para o desenvolvimento do sinal. O sistema IMMULITE automatiza o processo de ensaio, sendo que o operador só participa na sua parte inicial, que consiste em transferir as amostras que serão analisadas para tubos de ensaios próprios do sistema e colocá-las na plataforma de carga. Depois disso, seleciona as unidades de teste específicas para o tipo de teste que pretende realizar nas amostras, e pressiona a tecla GO do painel do sistema. As unidades de teste são assim analisadas segundo um sistema de identificação, que analisa o código de barras existente naquela unidade de teste, e depois são transferidas para o dispositivo de incubação principal. Aí, um sistema de pipetagem adiciona as amostras e o reagente de fosfatase alcalina às unidades de teste, dando-se, assim, um processo de incubação, que decorre durante cerca de 30 a 60 minutos, a uma temperatura de 37°C. Depois de ocorrer esta incubação, as unidades de teste são transportadas para um dispositivo, onde sofrem processos de centrifugação e de lavagem, e de onde resulta uma mistura líquida que contém a amostra, o anticorpo ou antigénio, o excesso de reagente e a solução de lavagem. Após estes dois processos, é incorporado um substrato quimioluminescente de díoxetano na mistura e ocorre novamente um processo de incubação, de cerca de 10 minutos, a uma temperatura de 37°C. Após essa incubação, gera-se um sinal luminoso de intensidade variável consoante os resultados presentes na amostra. Os fótons são então medidos através de tubo fotomultiplicador e são contados, sendo posteriormente convertidos em concentrações analíticas (doses), originando, desta forma, o resultado que se pretendia analisar. Os resultados são posteriormente impressos pelo computador que integra o sistema.

Os valores obtidos foram registados numa folha de laboratório, sendo posteriormente introduzidos numa base de dados.

7 – Base de dados para registo

Todos os dados recolhidos, quer da avaliação clínica quer da análise imunológica, foram introduzidos no Programa Microsoft Excel. Essa informação foi codificada, para permitir uma posterior análise estatística, através do *software* SPSS®.

8 – Análise Estatística

Os dados resultantes da análise imunológica da saliva e das observações clínicas foram tratados do ponto de vista quantitativo e submetidos a uma análise descritiva pelo *software* IBM SPSS Statistics versão 21.0 para Windows.

A análise estatística envolveu a utilização de medidas de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, médias e desvios padrão) e estatística inferencial. Nesta, utilizou-se como referência para aceitar ou rejeitar a hipótese nula um nível de significância ($\alpha \leq 0,05$).

Utilizaram-se os coeficientes de correlação de Spearman, o teste de Mann-Whitney (quando comparados dois grupos) e o teste de Kruskal-Wallis (quando comparados mais do que dois grupos), visto que as variáveis quantitativas não apresentavam uma distribuição normal. Nestes casos, para facilidade de interpretação, apresentaram-se nas estatísticas descritivas os valores das médias.

III – RESULTADOS

1 – Caracterização da amostra

1.1 – Grupos

Os indivíduos encontravam-se divididos em 4 grupos distintos: doentes com LES e Periodontite, doentes com LES, doentes com Periodontite e doentes saudáveis. A distribuição dos doentes por cada grupo era homogénea (25,0%, $n = 10$).

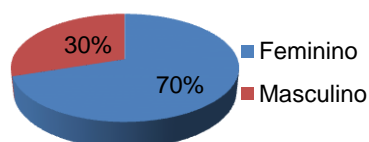
Tabela 1 – Grupos

	Frequência	Percentagem
LES e Periodontite	10	25,0
LES	10	25,0
Periodontite	10	25,0
Controlo	10	25,0
Total	40	100,0

1.2 – Género

Análise de dados: A amostra era constituída por 40 indivíduos. O género feminino foi o mais prevalente, representando cerca de 70,0% da totalidade da amostra ($n = 28$), enquanto o género masculino se encontrava representado pelos restantes 30,0% ($n = 12$).

Gráfico 1 – Género



1.2 – Idade

Análise de dados: A amostra englobava 40 indivíduos. A média de idades foi de 45,45 anos ($dp=14,07$). A idade mínima foi de 20 anos e a idade máxima foi de 70 anos.

Tabela 2 - Idade

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Idade	40	20	70	45,45	14,07

Tabela 3 – Idade

Idade	Frequência	Porcentagem	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
20	1	2,5	45,45	14,07	20	70
21	2	5				
22	1	2,5				
25	1	2,5				
27	1	2,5				
33	1	2,5				
34	3	7,5				
36	2	5				
37	2	5				
38	1	2,5				
42	1	2,5				
44	1	2,5				
45	2	5				
46	1	2,5				
47	1	2,5				
48	1	2,5				
50	1	2,5				
52	3	7,5				
53	3	7,5				
54	1	2,5				
55	1	2,5				
56	1	2,5				
57	1	2,5				
60	1	2,5				
64	1	2,5				
65	1	2,5				
66	2	5				
68	1	2,5				
70	1	2,5				

1.4 – Índice Periodontal Comunitário (IPC)

Análise de dados: Os indivíduos que compunham a amostra foram avaliados consoante a sua condição periodontal. Essa avaliação foi feita através do IPC, que atribui um código consoante a condição periodontal existente. Essa mesma condição subdividiu-os, posteriormente, em dois grupos: saúde periodontal (código IPC 0 e 1) e doença periodontal (código IPC 3 e 4). Na amostra existente, 22,5% dos indivíduos apresentou saúde gengival, 27,5% hemorragia gengival, 27,5% apresentou, pelo menos, uma bolsa periodontal de 3-4 mm e 22,5%, pelo menos, uma bolsa com mais de 5 mm.

Tabela 4 – Índice Periodontal Comunitário

	Frequência	Percentagem
Saúde periodontal	9	22,5
Hemorragia gengival	11	27,5
Bolsa periodontal	11	27,5
Bolsa periodontal + 5 mm	9	22,5
Total	40	100,0

1.5 – Índice de Perda de Inserção Periodontal (PIP)

Análise de dados: Os doentes que compunham a amostra foram avaliados consoante a severidade da doença periodontal. Essa avaliação foi feita através do PIP, que atribui um código consoante o grau de severidade existente. Após avaliação, foram subdivididos em três grupos: sem perda de inserção (código PIP 0), Periodontite ligeira (código PIP 1), Periodontite moderada (código PIP 2) e Periodontite severa (código PIP 3). Na amostra, 20% dos doentes não apresentava qualquer perda de inserção, 32,5% perda de inserção de 1 ou 2 mm (periodontite ligeira), 25% perda de inserção 3 ou 4 mm (periodontite moderada) e 22,5% perda de inserção igual ou superior a 5 mm (periodontite severa).

Tabela 5 – Perda de Inserção Periodontal

	Frequência	Porcentagem
Sem perda de inserção	8	20,0
Com perda de 1 a 2 mm	13	32,5
Com perda de 3 a 4 mm	10	25,0
Com perda de 5 mm ou mais	9	22,5
Total	40	100,0

1.6 – Taxa de fluxo salivar não-estimulado

Análise de dados: Dos 40 indivíduos que respeitaram os critérios de inclusão do estudo

Tabela 6 – Taxa de Fluxo salivar na totalidade da amostra

Taxa de Fluxo salivar	Frequência	Porcentagem	Porcentagem Cumulativa	Média	Desvio Padrão
<0,1 - 0,25 ml/min	18	45	45	0,3425	0,2546
>0,25 - 0,35 ml/min	22	55	100		

Tabela 7 – Taxa de Fluxo salivar em cada grupo

Taxa de Fluxo Salivar não estimulado				
Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
A	0,198	0,078	0,08	0,32
B	0,308	0,1967	0,06	0,7
C	0,403	0,2746	0,15	1,1
D	0,461	0,3413	0,15	1,22

2 – Análise estatística dos mediadores inflamatórios

Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para se estudar a normalidade da amostra. Através deste teste concluiu-se que não existia uma situação de normalidade em todos os grupos que compunham a amostra, o que levou a que a análise estatística fosse efetuada através de testes não paramétricos. Posteriormente, realizou-se o teste Kruskal-Wallis, e, em termos gerais, existiu uma relação entre os quatro grupos existentes.

2.1 – Estatística descritiva das variáveis TNF- α e IL-6

Na seguinte tabela são apresentados os resultados descritivos referentes aos mediadores inflamatórios na totalidade da amostra, como é o caso da média, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo.

Tabela 8 – Estatísticas descritivas do TNF- α e IL-6

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
TNF- α	40	11,90	55,50	23,07	9,94
IL-6	40	5,30	51,40	17,22	9,98

Gráfico 2 - TNF- α

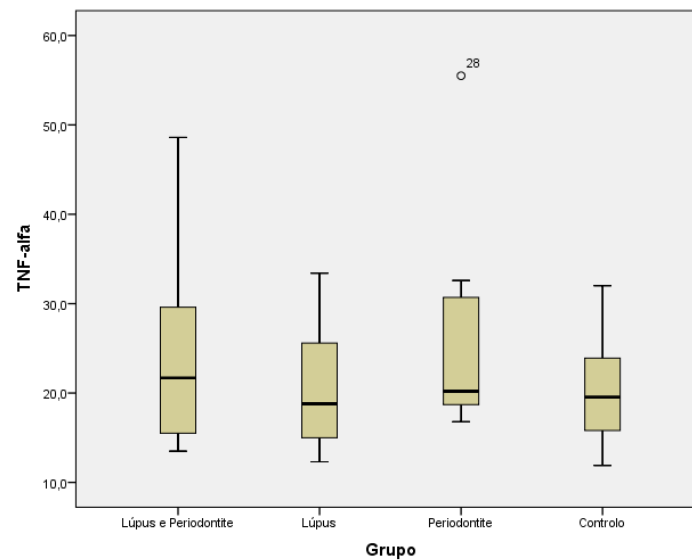
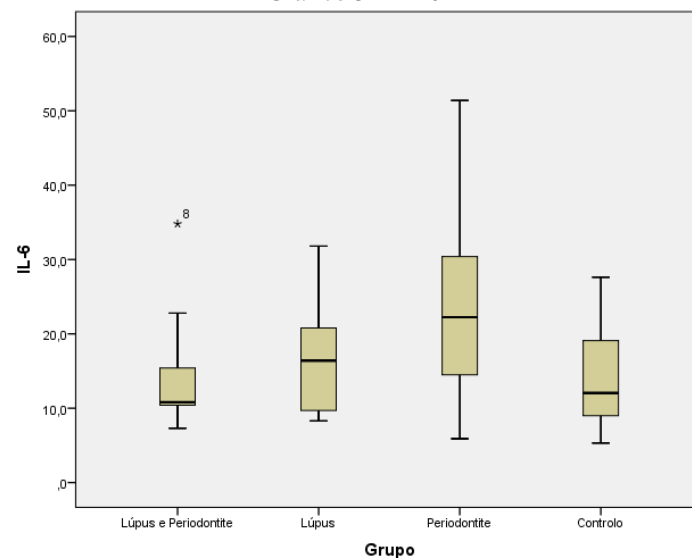


Gráfico 3 – IL-6



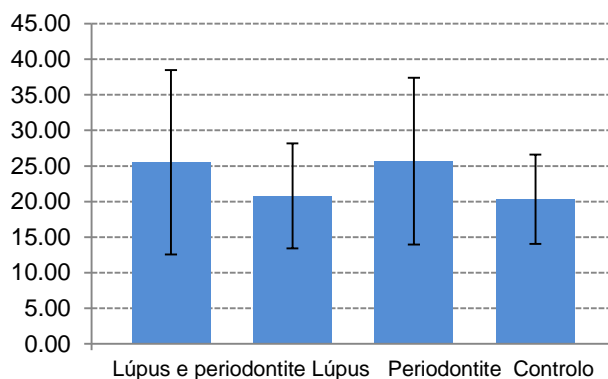
2.2 – Comparação dos níveis de TNF- α entre os grupos da amostra

Comparando os níveis de TNF- α entre os diferentes grupos podemos concluir que os mesmos são mais baixos no grupo controlo e mais elevados no grupo de Periodontite (20,32 vs 25,68), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $\chi^2_{KW}(3) = 1,584, p = 0,663$.

Tabela 9 – TNF- α

Lúpus e Periodontite		Lúpus		Periodontite		Controlo		Sig.
M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
25,51	12,96	20,79	7,39	25,68	11,74	20,32	6,29	,663

Gráfico 4 – TNF- α



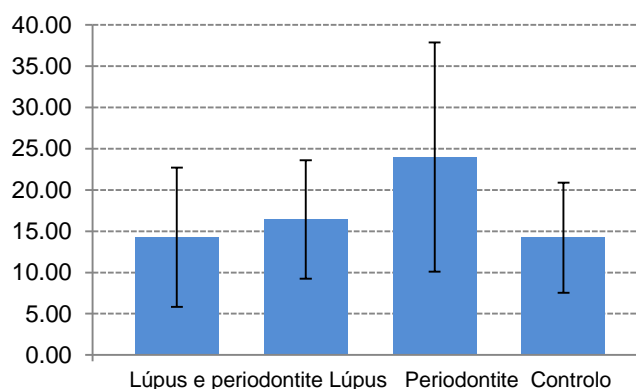
2.3 – Comparação dos níveis de IL-6 entre os grupos da amostra

Relativamente aos valores de IL-6, estes são mais baixos no grupo controlo e mais elevados no grupo de Periodontite (14,22 vs 23,99), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $\chi^2_{KW}(3) = 4,342, p = 0,227$.

Tabela 10 – IL-6

Lúpus e Periodontite		Lúpus		Periodontite		Controlo		Sig.
M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
14,27	8,44	16,43	7,19	23,99	13,90	14,22	6,67	,227

Gráfico 5 – IL-6



2.4 – Correlação das variáveis TNF- α , IL-6, IPC, PIP e idade

Para se estudar a possível existência de correlações entre as diferentes variáveis em estudo, em cada um dos grupos da amostra, recorreu-se ao teste não-paramétrico de Spearman's.

2.4.1 – Grupo A (LES e Periodontite)

No grupo de doentes com LES e Periodontite os coeficientes de correlação entre TNF- α , IL-6 e o IPC, PIP e Idade não são estatisticamente significativos.

Tabela 11 – Correlações Grupo A

	IPC	PIP	Idade
TNF-alfa	-,036	-,147	,122
IL-6	,249	-,083	,530

2.4.2 – Grupo B (LES)

No grupo de doentes com LES encontrámos os seguintes coeficientes de correlação significativos:

Tabela 12 – Correlações Grupo B

	IPC	PIP	Idade
TNF-alfa	,038	,642*	,456
IL-6	,114	,426	,529

* $p \leq 0,05$

O coeficiente de correlação entre o PIP e o TNF- α é estatisticamente significativo, positivo e moderado ($r=-,642$). Quando os níveis de TNF- α aumentam, o PIP tende a aumentar, sendo estas duas variáveis diretamente proporcionais entre si.

2.4.3 – Grupo C (Periodontite)

No grupo de doentes Periodontite os coeficientes de correlação entre TNF- α , IL-6 e o IPC, PIP e Idade não são estatisticamente significativos

Tabela 13 – Correlações Grupo C

	IPC	PIP	Idade
TNF-alfa	,174	,065	,503
IL-6	,313	,259	-,091

2.4.4 – Grupo D (controlo)

No grupo controlo os coeficientes de correlação entre TNF- α , IL-6 e o IPC, PIP e Idade não são estatisticamente significativos

Tabela 14 – Correlações Grupo D

	IPC	PIP	Idade
TNF-alfa	,174	-,267	,109
IL-6	,087	-,127	,517

2.4.5 – Associação entre os níveis de TNF- α e IL-6 e o género

2.4.5.1 – Grupo A (LES e Periodontite)

Devido a um baixo número de indivíduos do género masculino neste grupo, não foi possível associar os níveis de mediadores inflamatórios com o género.

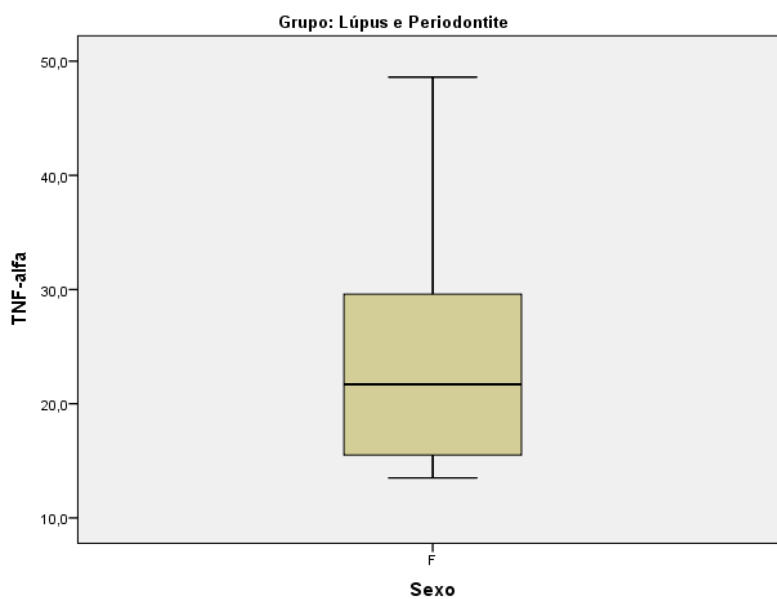
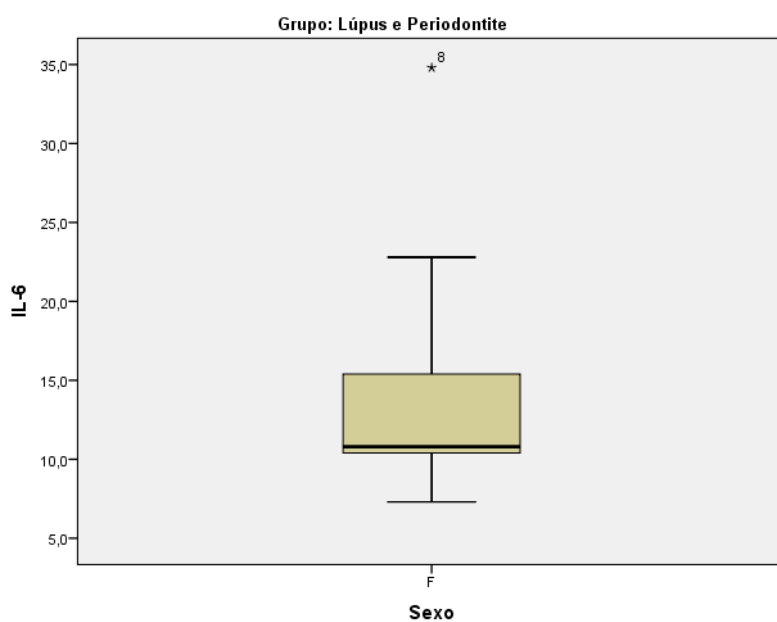
Gráfico 6 – TNF- α e género, grupo A

Gráfico 7 – IL-6 e género, grupo A



2.4.5.2 – Grupo B (LES)

Devido a um baixo número de indivíduos do género masculino neste grupo, não foi possível associar os níveis de mediadores inflamatórios com o género.

Gráfico 8 – TNF- α e género, grupo B

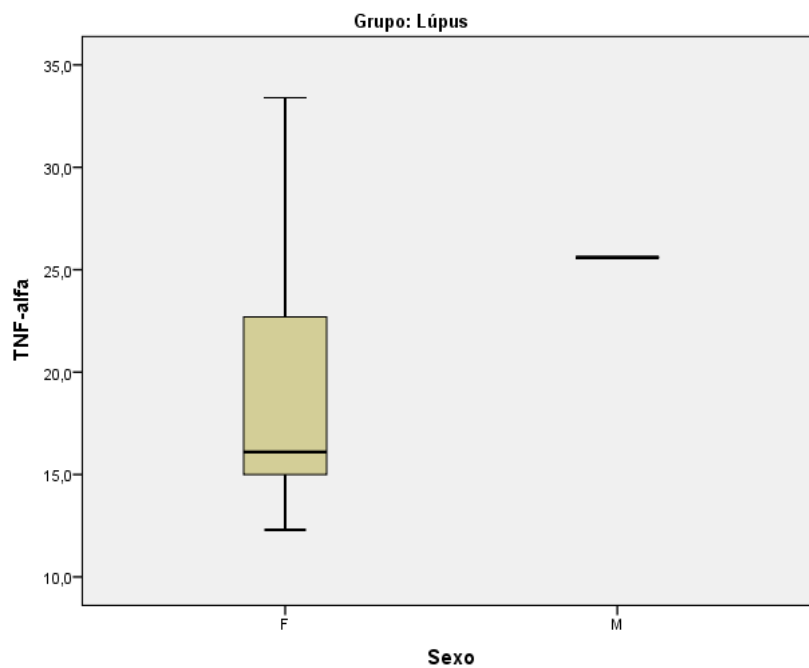
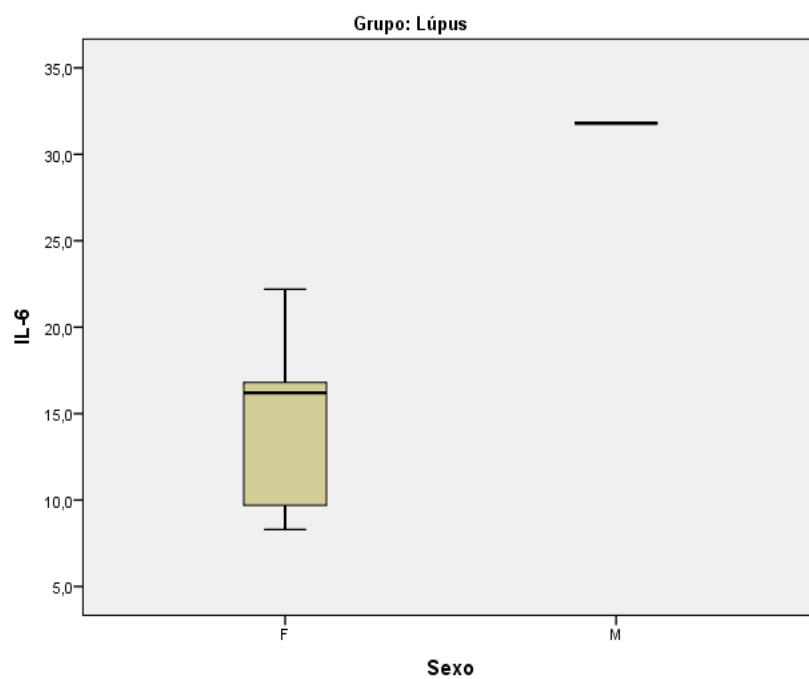


Gráfico 9 – IL-6 e género, grupo B



2.4.5.3 – Grupo C (Periodontite)

Tabela 15 – TNF- α e IL-6, Grupo C

	Feminino		Masculino		Sig.
	M	DP	M	DP	
TNF-alfa	22,95	7,13	27,50	14,41	,522
IL-6	18,30	10,26	27,78	15,53	,286

Os valores de TNF- α são mais baixos nas mulheres do que nos homens (22,95 vs 27,50), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $Z = -0,640$, $p = 0,522$.

Os valores de IL-6 são mais baixos nas mulheres do que nos homens (18,30 vs 27,78), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $Z = -1,066$, $p = 0,286$.

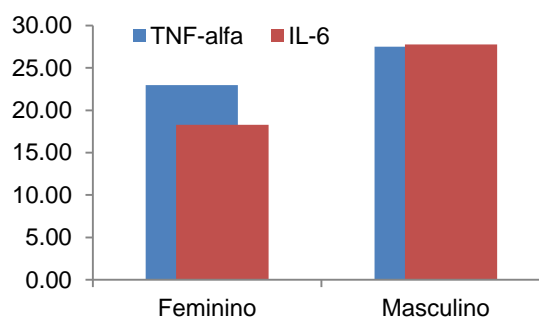
Gráfico 10 – TNF- α , IL-6e género, Grupo C

Gráfico 11 – TNF- α e gênero, Grupo C

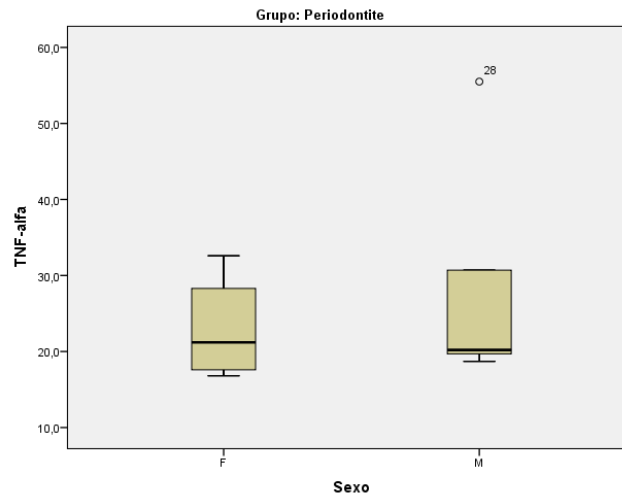
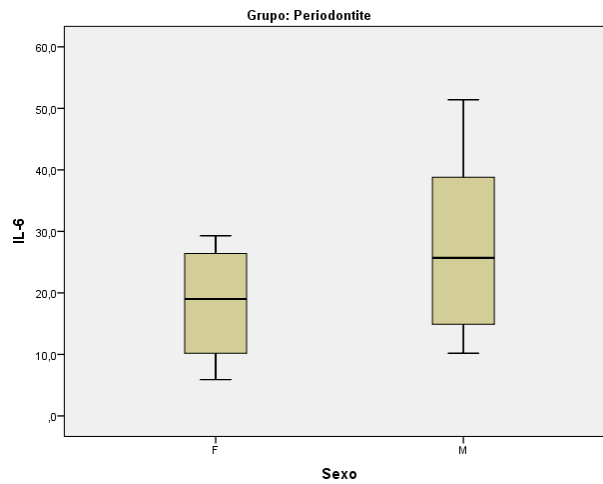


Gráfico 12 – IL-6 e gênero, Grupo C



2.4.5.4 – Grupo D (controle)

Tabela 16 – TNF- α e IL-6, Grupo D

	Feminino		Masculino		Sig.
	M	DP	M	DP	
TNF- α	18,90	5,86	21,74	7,05	,465
IL-6	17,28	7,13	11,16	5,08	,117

Os valores de TNF- α são mais baixos nas mulheres do que nos homens (18,90 vs 21,74), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $Z = -0,731, p = 0,465$.

Os valores de IL-6 são mais baixos nos homens do que nas mulheres (11,16 vs 17,28), embora a diferença não seja estatisticamente significativa, $Z = -1,567$, $p = 0,117$.

Gráfico 13 – TNF- α , IL-6 e género, Grupo D

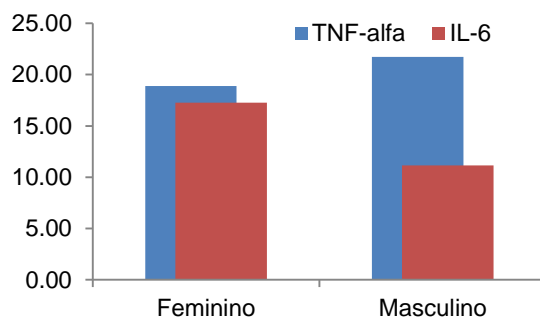


Gráfico 14 – TNF- α e género, Grupo D

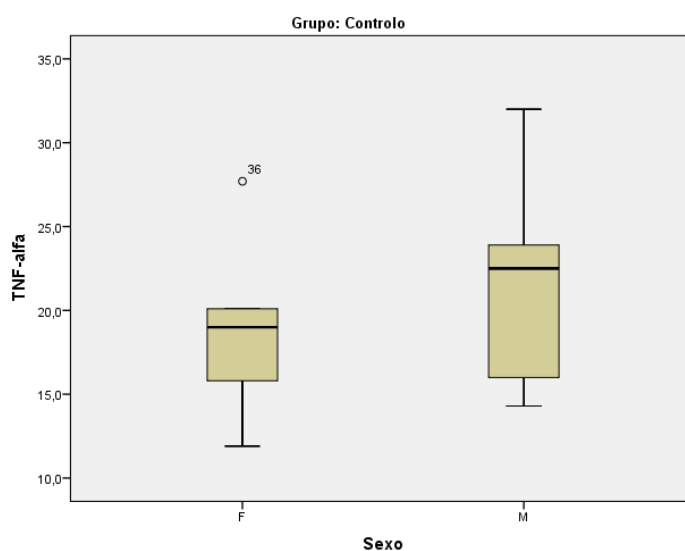
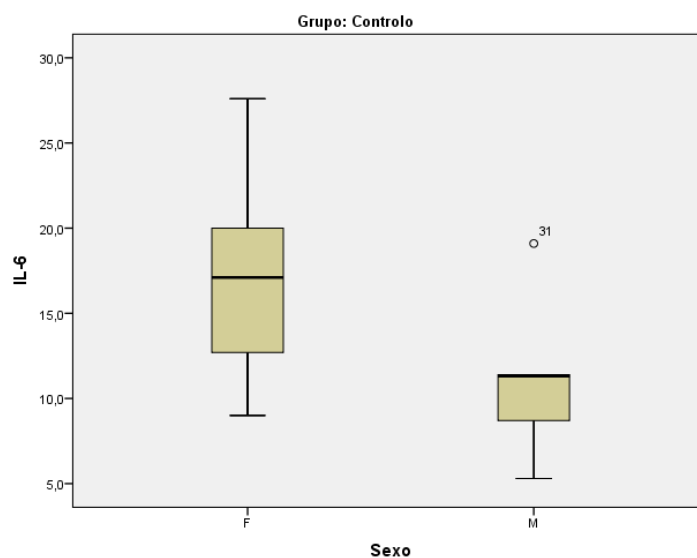


Gráfico 15 – IL-6 e género, Grupo D



IV – DISCUSSÃO

As potencialidades da análise da saliva têm sido estudadas em campos como as doenças autoimunes e as infecções bacterianas (Martí-Álamo, Mancheño-Franch, Marzal-Gamarrá & Carlos-Fabuel, 2012), visto que através da monitorização do perfil salivar e do doseamento de anticorpos, citoquinas e marcadores bioquímicos é possível avaliar o diagnóstico e/ou prognóstico de doenças de várias etiologias (Hucklebridge *et al.*, 2000; Moura, Medeiros, Costa, Moraes & Oliveira Filho, 2007; Oliveira Júnior & Guerra, 2010). A literatura defende que a determinação dos níveis dos mediadores inflamatórios nos fluidos biológicos é um bom indicador da atividade inflamatória de várias patologias (Ozmeric, 2004). Como, quer o LES quer a Doença Periodontal, são duas patologias inflamatórias crônicas (Pihlstrom *et al.*, 2005; D’Cruz, Khamashta & Hughes, 2007; Hajishengallis, 2010; Sales *et al.*, 2010; Lu, Wallace, Navarra & Weisman, 2010; Davis, Hutcheson & Mohan, 2011; Stefani *et al.*, 2013), a desregulação das citoquinas pode, em parte, ser responsável pelas manifestações clínicas de ambas as patologias (Ripley *et al.*, 2005), o que as torna potenciais marcadores de diagnóstico (Naiff *et al.*, 2012). Dentro destas citoquinas, destacam-se o TNF- α e a IL-6, que se encontram alteradas nestas duas patologias (Ford *et al.*, 2010; Kariuki & Niewold, 2010; Naiff *et al.*, 2012).

Considerando os valores obtidos do doseamento dos níveis de TNF- α , observou-se que os níveis desta citoquina foram mais elevados nos doentes periodontais e mais baixos nos indivíduos saudáveis (25,68 vs 20,32), embora a diferença não seja estatisticamente significativa ($p = 0,663$). Segundo Naiff *et al.* (2012), os dados obtidos vão ao encontro de alguns autores, que observaram um aumento nas concentrações de algumas citoquinas (Miller, King, Langub, Kryscio & Thomas, 2006), na saliva de indivíduos com periodontite em relação a pacientes periodontalmente saudáveis, bem como uma redução significativa nos níveis destas mesmas citoquinas em resposta à terapia periodontal, em pacientes com periodontite crônica (Sexton *et al.*, 2011). Também num estudo realizado por Noh *et al.* (2013), os níveis de TNF- α encontram-se elevados quer em tecidos gengivais cronicamente inflamados quer no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite.

Os indivíduos com LES e Periodontite apresentaram valores de TNF- α muito similares aos indivíduos apenas com Periodontite (25,51 vs 25,68), sendo que os indivíduos

apenas com LES apresentaram, por sua vez, um resultado muito similar aos indivíduos controlo (20,79 vs 20,32). Os resultados obtidos vão ao encontro da literatura existente. Segundo Jacob *et al.* (1990) e Dean *et al.* (2000) níveis relativamente baixos, no que diz respeito à produção de TNF- α , têm sido descritos em alguns pacientes com LES, tal como Gabay *et al.* (1997), que defende que as concentrações de TNF- α existentes em doentes com LES não são diferentes das dos grupos controlo. Esta premissa é reforçada por Gómez *et al.* (2004) e Jacob & Stohl (2011), que assumem que níveis elevados de TNF- α não estão relacionados com a atividade da doença, e por Zhu *et al.* (2010), que demonstra que os níveis de TNF- α estão aumentados em doentes com a doença inativa, sugerindo assim um papel protetor do TNF- α nos doentes com LES.

Assim, podemos concluir que o TNF- α pode ser um bom marcador inflamatório em situações em que haja Doença Periodontal estabelecida, mas que em casos isolados de LES este não é um bom marcador para aferir a atividade inflamatória da doença.

Tal como aconteceu com o TNF- α , os valores obtidos do doseamento dos níveis de IL-6 foram mais elevados nos indivíduos periodontalmente afetados e mais baixos nos indivíduos saudáveis (23,99 vs 14,22), embora a diferença não seja estatisticamente significativa ($p = 0,227$). Os dados obtidos são concordantes com a literatura.

Persson, Pettersson, Ohlsson & Renvert (2005) evidenciam que os níveis de IL-6 estão elevados na Doença Periodontal isolada ou associada a outras doenças sistémicas, em comparação com os grupos saudáveis. Também Noh *et al.* (2013), defende que os níveis de IL-6 encontram-se elevados nos tecidos gengivais cronicamente inflamados e no fluido gengival crevicular de pacientes com Periodontite.

Os doentes com LES e Periodontite apresentaram um valor praticamente igual aos indivíduos saudáveis (14,27 vs 14,22), enquanto os doentes com LES apresentaram um valor intermédio comparativamente com os valores anteriormente referidos (16,43). Estes resultados mostram-se contraditórios relativamente à literatura existente. De acordo com Linker-Israeli *et al.* (1991), a IL-6 encontra-se em níveis elevados nos pacientes lúpicos em comparação com o grupo controlo, e os seus níveis estão também aumentados em pacientes com LES com envolvimento renal quando comparados com pacientes sem este envolvimento (Brugos, Vincze, Sipka, Szegedi & Zeher, 2012). Segundo Liu *et al.* (2013) a IL-6 tem sido associada à patogénese do LES e proposta como um potencial biomarcador para avaliar a atividade da doença.

Apesar de estudos anteriores terem sugerido que os níveis de IL-6 possuem papéis patogénicos no LES, ainda não é garantido qualquer envolvimento das citocinas em manifestações clínicas específicas. Para se estabelecer uma correlação positiva e certa entre os níveis de IL-6 e a atividade do LES é essencial que exista uma avaliação destas variáveis ao longo do tempo nos pacientes (Ripley *et al.*, 2005).

Posto isto, os resultados obtidos indicam que a IL-6 pode ser um bom marcador inflamatório em situações em que se pretenda estudar apenas a Doença Periodontal, mas que em casos de patologia lúpica esta não é um bom marcador para aferir a atividade inflamatória da doença, na medida em que demonstrou ser uma citocina instável e com grandes flutuações no que respeita aos seus níveis.

Além da observação dos níveis isolados de TNF- α e de IL-6 nos quatro grupos existentes, também se estabeleceu uma correlação entre estes dois mediadores e outras variáveis em estudo, como o IPC, a PIP e a idade.

Relativamente aos doentes com LES e Periodontite, os resultados obtidos não são passíveis de discussão, na medida em que não existe na literatura nenhum estudo que relacione os níveis destes dois mediadores inflamatórios com a condição periodontal e a idade, em doentes lúpicos com Doença Periodontal.

Nos indivíduos portadores de LES, a literatura é omissa em relação aos efeitos dos mediadores inflamatórios na sua condição periodontal. Contudo, no presente estudo, estes indivíduos apresentaram um coeficiente de correlação entre a PIP e o TNF- α estatisticamente significativo, positivo e moderado, concluindo existir uma correlação entre os níveis de TNF- α e o grau de perda de inserção periodontal. Nestes doentes, estas variáveis são diretamente proporcionais entre si, ou seja, quanto maiores forem os níveis de TNF- α existentes, maior será o grau de perda de inserção periodontal. Este facto é coerente com a literatura, na medida em que os doentes lúpicos apresentam níveis elevados de TNF- α (Kariuki & Niewold, 2010), e este mediador inflamatório possui uma relação vincada com a inflamação periodontal destrutiva (Assuma, Oates, Cochran, Amar & Graves, 1998; Graves, 2008; Hajishengallis, 2010). Estudos sugerem que o envolvimento de polimorfismos ao nível do TNF- α tornam os doentes com LES mais suscetíveis à Doença Periodontal, devido a uma disfunção da resposta imunitária (Meyer *et al.*, 2000; Júnior *et al.*, 2010). Além da produção sistémica desta citocina, a sua produção local pode contribuir para o desenvolvimento do LES, mediando a inflamação local (Jacob & Stohl, 2011).

O presente estudo não demonstrou uma correlação significativa entre os mediadores inflamatórios e a idade, dado não concordante com a literatura. Montoya-Ortiz (2013) assume que a idade está relacionada com as alterações que ocorrem no sistema imunitário, potenciando o aparecimento de doenças autoimunes, na medida em que esta variável se encontra intimamente ligada com a autoimunidade e com o aumento de citocinas inflamatórias.

Relativamente aos indivíduos periodontalmente afetados, o presente estudo não apresentou qualquer correlação entre os níveis de mediadores inflamatórios e os parâmetros clínicos periodontais. O resultado obtido é assim concordante com Teles, Likhari, Socransky & Haffajee (2009), que defendem que não existe associação entre os níveis de citocinas salivares e os parâmetros clínicos de Doença Periodontal. No entanto, os dados presentes na literatura são contraditórios entre si, visto que, segundo Bretz *et al.* (2005), níveis plasmáticos elevados de TNF- α apresentam uma estreita ligação com a extensão da Doença Periodontal e com o aumento do número de dentes ausentes devido à mesma.

Adicionalmente, Sexton *et al.* (2011) defende que se verifica uma redução significativa nos níveis destas mesmas citocinas em resposta à terapia periodontal, em pacientes com Periodontite crónica. Num estudo de Fujita, Ito, Sekino & Numabe (2012) através da análise do Fluido Gengival Crevicular, foi demonstrado que tanto o TNF- α como a IL-6 apresentaram níveis mais elevados em localizações periodontalmente afetadas quando comparadas com localizações saudáveis, facto mais uma vez não concordante com o presente estudo.

Foram ainda analisados os níveis dos mediadores inflamatórios consoante o género, nos doentes com LES e Periodontite e nos doentes apenas com LES. Não foi possível realizar esta análise, na medida em que o número de indivíduos do género masculino foi insuficiente, facto que não é de estranhar, pois 90% dos doentes lúpicos são mulheres, demonstrando que o género feminino apresenta uma maior suscetibilidade para a doença que o género masculino (Urrea & Torre, 2012). Nos indivíduos apenas com Periodontite, os valores de TNF- α foram mais baixos nas mulheres do que nos homens (22,95 vs 27,50), tal como aconteceu com a IL-6, que também apresentou resultados mais baixos no género feminino do que no masculino (18,30 vs 27,78). Desta forma, os dados obtidos demonstram que, na Doença Periodontal, os níveis dos mediadores

inflamatórios apresentam níveis mais baixos no género feminino em comparação com o masculino.

É de salientar a falta de estudos realizados acerca deste tema, sendo mesmo inexistentes estudos referentes à associação do LES com a Doença Periodontal através dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-6, o que se revelou uma limitação significativa no presente estudo.

Além desta limitação, outras são de realçar. O facto de o estudo ter incidido em apenas 40 indivíduos, revelou-se limitador no que diz respeito aos resultados. A composição da amostra influenciou, em grande parte, a análise estatística, na medida em que muitos dos resultados não apresentaram significância estatística, o que leva a que os dados obtidos não possam ser considerados uma verdade absoluta. Também a gravidade da doença existente poderá ter influenciado os resultados obtidos, visto que dependendo do fenótipo da doença, o perfil de citocinas pode variar (Dean *et al.*, 2000). Existe literatura que sugere que os fármacos imunossuppressores e anti-inflamatórios usados no LES podem proteger estes doentes da destruição periodontal (Sales *et al.*, 2009), tal como foi demonstrado num estudo de Meyer *et al.* (2000), no qual os pacientes imunossuprimidos controlados não apresentaram alterações periodontais significativas. Os dados levam a crer que, tal como no estudo de Sales *et al.* (2009), a Doença Periodontal não foi severa o suficiente para produzir efeitos sistémicos relevantes. Adicionalmente, muita da literatura defende que, tanto o LES como a Doença Periodontal, apresentam aumentos significativos destas duas citocinas. Todavia, em muitos dos estudos, esses aumentos são maioritariamente relatados em concentrações plasmáticas e não em concentrações salivares, além de que a metodologia da avaliação das patologias a nível clínico também difere entre estudos, o que poderá ter influenciado os resultados obtidos (Spronk, Borg & Limburgt, 1992; Bretz *et al.*, 2005; Ripley *et al.*, 2005; Noh *et al.*, 2013; Sllamniku-Dalipi *et al.*, 2013; Prakasam & Srinivasan, 2014).

Dados presentes na literatura no que diz respeito às citocinas salivares defendem que estes mediadores existem na saliva total provenientes primariamente do fluido gengival crevicular. Como os níveis de citocinas deste fluido se encontram elevados em situações de Periodontite, quando comparados com situações de saúde periodontal, coloca-se a hipótese destas citocinas também se encontrarem elevadas na saliva total de indivíduos periodontais. A falta de associação entre os níveis de biomarcadores salivares e a Doença Periodontal pode ser explicada, em parte, por uma extensa diluição

do fluido gengival crevicular, que contém as citocinas, na saliva total (Teles *et al.*, 2009).

Outra limitação encontrada incide na complexidade ao nível da patogénese destas duas patologias inflamatórias, o que faz com que não seja possível caracterizá-las focando apenas dois mediadores inflamatórios. É essencial perceber que o LES e a Doença Periodontal estão associados a uma vasta influência imunológica e que este sistema funciona como um todo e não apenas através do TNF- α e da IL-6. Como tal, para se monitorizar um doente ou uma patologia, não é possível avaliar apenas um único biomarcador (Liu *et al.*, 2013).

Importa, ainda, referir que a possível não veracidade dos dados prestados por parte dos indivíduos que compuseram a amostra, pode constituir também uma limitação. Ainda que com uma especial atenção relativamente aos critérios de inclusão e de exclusão, os indivíduos da amostra foram selecionados com base em informações prestadas pelos próprios.

Não obstante, apesar das limitações supramencionadas, o presente estudo revela resultados favoráveis relativamente ao seu objetivo inicial, confirmando assim as hipóteses de estudo inicialmente propostas. Foi demonstrado que os doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico encontram-se mais sujeitos a desenvolverem lesões periodontais aquando do aumento dos níveis de TNF- α , aumento esse que potencia a perda de inserção periodontal. Podemos, então, referir que o mediador inflamatório TNF- α se apresenta como um elo de ligação entre as duas patologias inflamatórias em foco no presente estudo.

V – CONCLUSÃO

O presente estudo vem confirmar que em situações de patologias inflamatórias, como o LES e a Doença Periodontal, são notórias alterações ao nível dos mediadores inflamatórios. Contudo, foram comprovadas as hipóteses de estudo inicialmente propostas, que defendiam não existir uma relação entre o LES e a Doença Periodontal, na medida em que os resultados obtidos nos indivíduos lúpicos periodontalmente afetados não apresentaram significância estatística.

Na Doença Periodontal, tanto a IL-6 como o TNF- α , apresentam níveis elevados comparativamente ao grupo controlo, o que sugere que ambas as citocinas se encontram elevadas em situações de Doença Periodontal estabelecida. Contudo, estas não podem ser consideradas marcadores específicos da atividade inflamatória desta patologia, uma vez que os resultados não apresentam significância estatística.

No caso do LES, nenhum dos mediadores inflamatórios em causa se apresenta como um marcador específico do grau de inflamação existente nos doentes portadores da patologia. Tal como na Doença Periodontal, os resultados obtidos apresentam-se sem significância estatística.

É de salientar o resultado obtido nos indivíduos lúpicos. Nestes doentes, verifica-se que o TNF- α é um bom marcador para aferir a perda de inserção periodontal existente, sendo que quanto maiores forem os seus níveis, maior será o grau de perda de inserção periodontal. Em suma, através da citocina TNF- α , conclui-se existir uma relação entre o Lúpus Eritematoso Sistémico e a perda de inserção periodontal.

É fundamental a realização de estudos futuros no que respeita ao tema em causa, compostos por amostras maiores, que possibilitem uma melhor compreensão relativamente à relação do LES com a Doença Periodontal.

VI – BIBLIOGRAFIA

- Ahsan, H., Ali, A. & Ali, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 131(3), 398–404.
- Ali, J., Pramod, K., Tahir, M. A. & Ansari, S. H. (2011). Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(7), 426–431.
- Arias, J.-I., Aller, M.-A., Sánchez-Patan, F. & Arias, J. (2006). Inflammation and cancer: is trophism the link? *Surgical Oncology*, 15(4), 235–42.
- Aringer, M., Steiner, G., Graninger, W., Höfler, E., Steiner, C. & Smolen, J. (2007). Effects of short-term infliximab therapy on autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 56(1), 274–279.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (1998). IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of Immunology*, 160(1), 403–409.
- Bourgeois, D. M., Pitts, N. B., Ottolenghi, L., Senekola, E. & Llodra, J. C. (2008). Health Surveillance in Europe Oral Health Interviews and Clinical Surveys: Guidelines (pp. 69–74).
- Brailo, V., Vucicevic-Boras, V., Lukac, J., Biocina-Lukenda, D., Alajbeg-Zilic, I., Milenovic, A. & Balija, M. (2012). Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 17(1), 10–15.
- Bretz, W. A., Weyant, R. J., Corby, P. M., Ren, D., Weissfeld, L., Kritchevsky, S. B. & Newman, A. B. (2005). Systemic inflammatory markers, periodontal diseases, and periodontal infections in an elderly population. *Journal of the American Geriatrics Society*, 53(9), 1532–7.
- Brugos, B., Vincze, Z., Sipka, S., Szegedi, G. & Zeher, M. (2012). Serum and urinary cytokine levels of SLE patients. *Die Pharmazie*, 67(5), 411–3.

- Chopra, A., Gupta, N., Lakhanpal, M., Rao, N. & Vashisth, S. (2013). Association between obesity and periodontal disease: A cross-sectional study. *Saudi Journal of Obesity*, 1(2), 71–75.
- Clark, D. N., Markham, J. L., Sloan, C. S. & Poole, B. D. (2012). Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 148(3), 335–343.
- Craig, R. G., Yip, J. K., So, M. K., Boylan, R. J., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2003). Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *Journal of Periodontology*, 74(7), 1007–1016.
- Crispín, J. C., Liossis, S.-N. C., Kis-Toth, K., Lieberman, L. a, Kytтарыs, V. C., Juang, Y.-T., & Tsokos, G. C. (2010). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in Molecular Medicine*, 16(2), 47–57.
- D’Cruz, D. P., Khamashta, M. A. & Hughes, G. R. V. (2007). Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 369(9561), 587–96.
- Davis, L. S., Hutcheson, J. & Mohan, C. (2011). The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(10), 781–9.
- De Araújo Navas, E. A. F., Sato, E. I., Pereira, D. F. A., Back-Brito, G. N., Ishikawa, J. A., Jorge, A. O. C. & Koga-Ito, C. Y. (2012). Oral microbial colonization in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with treatment and disease activity. *Lupus*, 21(9), 969–977.
- Dean, G. S., Tyrrell-price, J., Crawley, E. & Isenberg, D. A. (2000). Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(4), 243–251.
- Duarte, P. M., Bezerra, J. P., Miranda, T. S., Feres, M., Chambrone, L. & Shaddox, L. M. (2014). Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(1), 11–18.

- Fabbri, C., Fuller, R., Bonfá, E., Guedes, L. K. N., D'Alleva, P. S. R. & Borba, E. F. (2014). Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clinical Rheumatology*, 33(4), 505–9.
- Ford, P. J., Gamonal, J., & Seymour, G. J. (2010). Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(28), 111–23.
- Fujita, Y., Ito, H., Sekino, S. & Numabe, Y. (2012). Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology*, 100(2), 215–21.
- Gabay, C., Cakir, N., Moral, F., Roux-Lombard, P., Meyer, O. & Dayer, J. M. (1997). Circulating levels of tumor necrosis factor soluble receptors in systemic lupus erythematosus are significantly higher than in other rheumatic diseases and correlate with disease activity. *The Journal of Rheumatology*, 24(2), 303–308.
- Gómez, D., Correa, P. A., Gómez, L. M., Cadena, J., Molina, J. F. & Anaya, J. M. (2004). Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 33(6), 404–413.
- Gordon, C., Li, C. K. & Isenberg, D. A. (2009). Systemic lupus erythematosus. *Medicine*, 38(2), 73–80.
- Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 79(8 Suppl), 1585–91.
- Grondal, G., Gunnarsson, I., Ronnelid, J., Rogberg, S., Klareskog, L. & Lundberg, I. (2000). Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 18(5), 565–570.
- Gualtierotti, R., Biggioggero, M., Penatti, A. E. & Meroni, P. L. (2010). Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*, 10(1), 3–7.

- Hajishengallis, G. (2010). Complement and periodontitis. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1992–2001.
- Heinrich, P. C., Castell, J. V. & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3), 621–636.
- Herrera-Esparza, R., Barbosa-Cisneros, O., Villalobos-Hurtado, R. & Avalos-Diaz, E. (1998). Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis. *Lupus*, 7(3), 154–158.
- Hirohata, S., Kanai, Y., Mitsuo, A., Tokano, Y. & Hashimoto, H. (2009). Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clinical Rheumatology*, 28(11), 1319–23.
- Hucklebridge, F., Lambert, S., Clow, A., Warburton, D. M., Evans, P. D. & Sherwood, N. (2000). Modulation of secretory immunoglobulin A in saliva; response to manipulation of mood. *Biological Psychology*, 53(1), 25–35.
- Ishihara, K. & Hirano, T. (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13(4-5), 357–68.
- Jacob, C. & McDevitt, H. (1988). Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune “lupus” nephritis. *Nature*, 331(6154), 356–358.
- Jacob, C. O., Fronek, Z., Lewis, G. D., Koo, M., Hansen, J. A. & McDevitt, H. O. (1990). Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), 1233–7.
- Jacob, N. & Stohl, W. (2011). Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 13(4), 228.
- Júnior, A. A., Cantisano, M., Klumb, E., Dias, E. & Silva, A. (2010). Achados bucais e laboratoriais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 46(6), 479–486.

- Kariuki, S. N. & Niewold, T. B. (2010). Genetic regulation of serum cytokines in systemic lupus erythematosus. *Translational Research*, 155(3), 109–117.
- Kinney, J. S., Morelli, T., Braun, T., Ramseier, C. A., Herr, A. E., Sugai, J. V. & Giannobile, W. V. (2011). Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of Dental Research*, 90(6), 752–758.
- Kitani, A., Hara, M., Hirose, T., Harigai, M., Suzuki, K., Kawakami, M. & Nakamura, H. (1992). Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clinical and Experimental Immunology*, 88(1), 75–83.
- Kobayashi, T., Ito, S., Yamamoto, K., Hasegawa, H., Sugita, N., Kuroda, T. & Yoshie, H. (2003). Risk of periodontitis in systemic lupus erythematosus is associated with Fcγ receptor polymorphisms. *Journal of Periodontology*, 74(3), 378–84.
- Lima, H. & Lara, V. (2013). Aspectos Imunológicos da Doença Periodontal Inflamatória: Participação dos Mastócitos. *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas E Da Saúde*, 15(3), 225–229.
- Linker-Israeli, M., Deans, R. J., Wallace, D. J., Prehn, J., Ozeri-Chen, T. & Klinenberg, J. R. (1991). Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 147(1), 117–123.
- Lins, R. D., Lucena, K. C., Ferreira, R. C., Silveira, É. J., Pinto, L. & Gomes, R. C. (2010). As citocinas e o periodonto: o papel dos factores de crescimento na saúde periodontal. *International Journal of Dentistry*, 9(1998), 38–43.
- Liu, C.-C., Kao, A. H., Manzi, S. & Ahearn, J. M. (2013). Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 5(4), 210–33.
- Lotz, M., Jirik, F. & Kabouridis. (1988). B Cell Stimulating Factor 2/Interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 167(3), 1253–1258.

- Lu, L.-J., Wallace, D. J., Navarra, S. V. & Weisman, M. H. (2010). Lupus registries: evolution and challenges. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 39(4), 224–45.
- Marques, E. (2009). *Manifestações orais do lúpus eritematoso: padrão das citocinas do infiltrado inflamatório*.
- Martí-Álamo, S., Mancheño-Franch, A., Marzal-Gamarra, C. & Carlos-Fabuel, L. (2012). Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 4(4), 237–243.
- Meyer, U., Kleinheinz, J., Graubitz, M., Schulzm, M., Weingart, D. & Joos, U. (1997). Oral manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1(2), 90–94.
- Meyer, U., Kleinheinz, J., Handschel, J., Kruse-Losler, B., Weingart, D. & Joos, U. (2000). Oral findings in three different groups of immunocompromised patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 29(4), 153–8.
- Miceli, V., Braga, F., Áreas, A., Figueredo, C. & Fischer, R. (2005). Associação entre a doença periodontal e o lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Ciências Médicas e Biológicas*, 4(2), 150–157.
- Miller, C. S., King, C. P., Langub, M. C., Kryscio, R. J. & Thomas, M. V. (2006). Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *The Journal of the American Dental Association*, 137(3), 322–329.
- Modéer, T. & Wondimu, B. (2000). Periodontal diseases in children and adolescents. *Dental Clinics of North America*, 44(3), 633–658.
- Montoya-Ortiz, G. (2013). Immunosenescence, aging, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2670–78.
- Moura, S., Medeiros, A., Costa, F., Moraes, P. & Oliveira Filho, S. (2007). Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura Diagnostic. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada*, 7(2), 187–194.

- Muraguchi, B. Y. A., Hirano, T., Tang, B. O., Matsuda, T., Horii, Y. & Nakajima, K. (1988). The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2 / IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(2), 332–344.
- Mutlu, S., Richards, A., Maddison, P. & Scully, C. (1993). Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 21(3), 158–161.
- Nagler, R., Lorber, M., Ben-Arieh, Y., Laufer, D. & Pollack, S. (1999). Generalized periodontal involvement in a young patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 8(9), 770–773.
- Naiff, P., Orlandi, P. & Santos, M. C. (2012). Imunologia da Periodontite Crônica: uma revisão de literatura. *Scientia Amazonia*, 1(2), 28–36.
- Noh, M. K., Jung, M., Kim, S. H., Lee, S. R., Park, K. H., Kim, D. H. & Park, Y. G. (2013). Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(3), 847–851.
- Novo, E., Garcia-MacGregor, E., Viera, N., Chaparro, N. & Crozzoli, Y. (1999). Periodontitis and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study. *Journal of Periodontology*, 70(2), 185–188.
- Nussbaum, G. & Shapira, L. (2011). How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *Journal of Clinical Periodontology*, 38 (Suppl 1), 49–59.
- O'Neill, S. & Cervera, R. (2010). Systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 24, 841–855.
- Ohl, K. & Tenbrock, K. (2011). Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 11.

- Oliveira Júnior, J. & Guerra, R. (2010). Biomarcadores imunológicos da saliva. *Revista de Ciências Da Saúde*, 12(2), 136–145.
- Ozmeric, N. (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta*, 343(1-2), 1–16.
- Pelton, B. K., Hylton, W. & Denman, A. M. (1992). Activation of IL-6 production by UV irradiation of blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical & Experimental Immunology*, 89(2), 251–254.
- Persson, G. R., Pettersson, T., Ohlsson, O. & Renvert, S. (2005). High-sensitivity serum C-reactive protein levels in subjects with or without myocardial infarction or periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(3), 219–24.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366 (9499), 1809–1820.
- Pons-Estel, G. J., Alarcón, G. S., Scofield, L., Reinlib, L. & Cooper, G. S. (2008). Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 39(4), 257–68.
- Prakasam, S. & Srinivasan, M. (2014). Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 20(2), 171–7.
- Rhodus, N. L. & Johnson, D. K. (1990). The prevalence of oral manifestations of systemic lupus erythematosus. *Quintessence International*, 21(6), 461–465.
- Ripley, B. J. M., Goncalves, B., Isenberg, D. A., Latchman, D. S. & Rahman, A. (2005). Raised levels of interleukin-6 in systemic lupus erythematosus correlate with anemia. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(6), 849–853.
- Rodrigues, J., Mazzoleni, L., Mazzilli, L., Pereira, M. & Martins, R. (2013). Lupus Eritematoso. *Journal of Biodentistry and Biomaterials*, 3, 39–46.

- Rossomando, E. F., Kennedy, J. E. & Hadjimichael, J. (1990). Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of Oral Biology*, 35(6), 431–434.
- Sachs, L., Lotem, J. & Shabo, Y. (1989). The molecular regulators of macrophage and granulocyte development. Role of MGI-2/IL-6. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557, 417-437.
- Sales, L., Chaves, M. das G. & Vassalo, S. (2010). Efeito do tratamento periodontal na condição do periodonto e na atividade inflamatória sistêmica em portadores de lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Interdisciplinar de Estudos Exp*, 2(3), 94–99.
- Sales, L., Falabella, M., Falabella, J., Teixeira, H. & Figueredo, M. (2008). Relação entre doença periodontal e lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Gaúcha de Odontologia*, 56(2), 189–193.
- Sales, L., Vassalo, S., Chaves, M. G. & Aarestrup, F. (2009). Periodontal disease and systemic lupus erythematosus activity. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, 1(1), 14–20.
- Santos, P. P. de A., Iglesias, D. P. P., Souza, E. L. de, Freitas, R. de A. & Galvão, H. C. (2007). Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra . *Revista Faculdade Odontologia*, 48(1/3), 95–98.
- Sexton, W. M., Lin, Y., Kryscio, R. J., Dawson, D. R., Ebersole, J. L. & Miller, C. S. (2011). Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(5), 434–41.
- Silveira, V. & Alves, A. P. (2009). Perfil celular e mediadores químicos na doença periodontal associada ao biofilme dental - Revisão de literatura. *Revista Periodontia*, 19(3), 73–79.
- Sllamniku-Dalipi, Z., Dragidella, F., Disha, M., Meqa, K., Begolli, L. & Begolli, G. (2013). Inflammatory biomarkers as a potencial mediators for the association between periodontal and sistemic disease in kosovo. *Journal of International Dental and Medical Research*, 6(1), 1–5.

- Smith, P. P. & Gordon, C. (2010). Systemic lupus erythematosus: clinical presentations. *Autoimmunity Reviews*, 10(1), 43–5.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–44.
- Spronk, P. E., Borg, E. J. T. E. R. & Limburgt, P. C. (1992). Plasma concentration of IL-6 in systemic lupus erythematosus: an indicator of disease activity? *Clinical and Experimental Immunology*, 90(1), 106–110.
- Stefani, F. A., Viana, M. B., Dupim, A. C., Brito, J. A. R., Gomez, R. S., Da Costa, J. E. & Moreira, P. R. (2013). Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology*, 218(7), 1012–1017.
- Tackey, E., Lipsky, P. & Illei, G. (2004). Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 13(5), 339–343.
- Teles, R., Likhari, V., Socransky, S. & Haffajee, A. (2009). Salivary cytokine levels in chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. A cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*, 44(3), 411–417.
- Toro, J. R., Finlay, D., Dou, X., Zheng, S. C., Leboit, P. E. & M., C. K. (2000). Detection of Type 1 Cytokines in Discoid Lupus Erythematosus. *Archives of Dermatology*, 136(12), 1497–1501.
- Tsai, C.-Y., Wu, T.-H., Yu, C.-L., Lu, J.-Y. & Tsai, Y.-Y. (2000). Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron*, 85(3), 207–214.
- Tsokos, G. (2011). Systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, 365(22), 2110–2121.
- Urra, J. M. & De La Torre, M. (2012). Cytokines and Systemic Lupus Erythematosus. In H. Almoallim (Ed.), *Systemic Lupus Erythematosus* (pp. 53-76). InTech.

- Yap, D. Y. H. & Lai, K. N. (2010). Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010(365083).
- Ylöstalo, P., Suominen-Taipale, L., Reunanen, A. & Knuutila, M. (2008). Association between body weight and periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(4), 297–304.
- Zhu, L. I., Landolt-Marticorena, C., Li, T., Yang, X., Yu, X. Q., Gladman, D. D. & Wither, J. E. (2010). Altered expression of TNF-alpha signaling pathway proteins in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*, 37(8), 1658–1666.

VII – ANEXOS



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, ___ de _____ de _____

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Dentária na Unidade Curricular de Orientação Tutorial do Projeto Final do(a) Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz, sob a orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Fernanda de Mesquita, solicita-se a sua autorização para a participação no estudo “Saliva e Mediadores inflamatórios – relação entre Lúpus Eritematoso Sistémico e Periodontite”.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios tais como estabelecer uma ligação entre o Lúpus Eritematoso Sistémico e a Doença Periodontal, ajudando assim ao progresso do conhecimento.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Protocolo – Índice Periodontal Comunitário

Para a realização do exame, a boca é dividida em sextantes (18-14, 13-23, 24-28, 38-34, 33-43, 44-48), utilizando-se a sonda periodontal desenvolvida pela OMS, toda extensão do sulco ou bolsa gengival do dente é examinada. Dez dentes-índices são utilizados no exame parcial de adultos a partir de 20 anos (17, 16, 11, 26, 27, 37, 36, 31, 46, 47).

Todos os dentes do sextante são examinados apenas na ausência dos dentes-índices e o 3º molar só é incluído caso esteja exercendo a função de outro molar

Os seguintes indicadores do estado periodontal são usados para esta avaliação:

- (0) Saúde gengival
- (1) Hemorragia gengival
- (2) Presença de cálculo
- (3) Bolsa (4- 5mm)
- (4) Bolsa (6 mm ou mais)
- (9) Impossível de determinar
- (X) Sextante excluído

(EGOHID II – 2008)

CPI				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /										
PI	V				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /									
	P				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /									
Dente	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27										
Dente	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37										
PI	L				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /									
	V				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /									
CPI				/ / / / / / / /										/ / / / / / / /										

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE FLUXO SALIVAR

É necessário tomar algumas medidas cautelares no que diz respeito à realização da colheita:

- Pacientes devem ser avisados para que não comam, bebam, mascuem pastilha, façam exercícios, fumem ou escovem os dentes até 2 horas antes da coleta;
- Durante a colheita, o ambiente deve estar bem ventilado e os indivíduos sentados de forma relaxados durante 5 minutos;
- A primeira amostra deve ser descartada e as subsequentes serão mantidas em recipientes submersos em gelo.

(Santos *et al.*, 2007)

Determinação da saliva não estimulada:

- Paciente sentado em posição relaxada;
- Evitar qualquer movimento;
- Língua deve apoiar nas superfícies linguais dos incisivos superiores;
- Permanecer com os olhos abertos e o corpo flexionado para frente, pois caso ele feche os olhos e relaxe, haverá uma redução fisiológica do fluxo salivar;
- Paciente inclina a cabeça para frente e vai deixando cair a saliva passivamente sem cuspir ou mastigar.

A saliva é recolhida num tubo graduado durante 5 minutos. Os resultados expressam-se em ml/min, existindo amplas variações entre pessoas.

Taxa de secreção **normal**-----**0.25-0.35ml/min**

Taxa de secreção **baixa**-----**0.1-0.25ml/min**

Determinação da saliva estimulada:

- Paciente deve mastigar uma pastilha de parafina estéril de aproximadamente 1gr;
- Recolher toda a saliva segregada num tubo graduado durante 5 minutos;
- Descartar a saliva produzida nos dois primeiros minutos e começar a contar a partir desse momento.

O resultado expressa-se em ml/min, e a taxa varia também entre pessoas.

Taxa de secreção **normal**----- **>1 ml/min.**

Taxa de secreção **baixa**----- **<0.7ml/min.**

Fluxo Salivar	
<u>Estimulado</u>	<u>Não-Estimulado</u>



5

Ex.ma Senhora
Marta Sofia Ribeiro

Monte de Caparica, 24 de março de 2014

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "*Saliva e Mediadores inflamatórios – relação entre Lúpus Eritematoso Sistémico e Periodontite*", foi aprovado por unanimidade.

Queira aceitar os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Prof.ª Doutora Maria Fernanda de Mesquita

c.c. - Prof.ª Doutora M. Fernanda de Mesquita

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica
