

TAKESHI KATO SEGUNDO

ESTUDO COMPARATIVO DE MASTÓCITOS E
CÉLULAS DE LANGERHANS NA DOENÇA
PERIODONTAL EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS
USUÁRIOS DE HAART E HIV-NEGATIVOS

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2009

TAKESHI KATO SEGUNDO

ESTUDO COMPARATIVO DE MASTÓCITOS E
CÉLULAS DE LANGERHANS NA DOENÇA
PERIODONTAL EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS
E NEGATIVOS

Tese apresentada ao curso de Doutorado da
Faculdade de Odontologia da UFMG, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Odontologia

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Fernando Oliveira Costa
Co-Orientador: Ricardo Alves de Mesquita

Belo Horizonte
2009

*Dedico este trabalho aos meus pais como forma de agradecimento
ao carinho, confiança e dedicação que sempre me proporcionaram.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que proporcionou saúde, fé e forças para que eu pudesse terminar este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Oliveira Costa pelos conhecimentos e pela dedicação empregada neste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Alves de Mesquita que proporcionou a minha entrada nos estudos laboratoriais, assim como o início deste projeto.

Ao Prof. José Eustáquio Costa, que acompanhou minha formação acadêmica a partir da graduação e sempre confiou na minha dedicação.

À minha mentora intelectual, Prof^a. Efigênia Ferreira e Ferreira que sempre esteve pronta a orientar, aconselhar e me nortear no difícil caminho da docência.

Às minhas colegas de laboratório Inês, Aline, Vanessa, Patrícia e Giovanna, que tanto me ajudaram nas “imunós” e estavam sempre prontas a me ensinarem as técnicas laboratoriais.

À minha família que foi minha maior fonte de inspiração. Quando tudo parecia perdido, foi em vocês que pensava e tirava forças para compreender, analisar e superar as dificuldades do percurso. Agradeço meus pais, minhas irmãs Neyli, Melissa, Daniela, Tia Zélia e Luiza.

À Michelle, que participou da parte final e mais difícil desta jornada. Obrigado pelo carinho incentivo, amor e todo apoio. Foi um grande encontro!

À Dóris, que sempre confiou no meu trabalho. Fazer parte de sua equipe de professores foi sem dúvida um grande incentivo para iniciar e dar seguimento neste projeto.

A todos os amigos que souberam compreender minha ausência e que além de tudo, tanto se orgulham com esta minha conquista.

Aos órgãos de fomento em pesquisa CNPq e FAPEMIG, que auxiliaram na condução da pesquisa.

*“O correr da vida embrulha tudo
a vida é assim;
esquenta e esfria
aperta e afrouxa
sossega e depois desinquieta
o que ela quer da gente é
CORAGEM!”*

Guimarães Rosa

“Eu disse que não seria fácil, mas compensaria!”

Rubem Alves

RESUMO

Este estudo transversal, teve como objetivo avaliar quantitativamente e comparar a densidade e a frequência dos mastócitos c-kit+ e triptase+ e das células de Langerhans S100+ por meio da técnica de imunistoquímica na gengivite e periodontite em indivíduos HIV-positivos e negativos. Adicionalmente, buscou-se avaliar a correlação entre a densidade e frequência destas células com níveis sanguíneos de linfócitos T (LT) CD4, CD8 e carga viral, nos indivíduos HIV-positivos. A amostra constou de 50 biópsias, divididos em quatro grupos: 1) 15 indivíduos com periodontite crônica moderada (PCM) HIV-positivos, 2) 15 indivíduos com PCM HIV-negativos, 3) 10 indivíduos com gengivite (G) HIV-positivos e 4) 10 indivíduos HIV-negativos com G. Todos os indivíduos HIV-positivos eram usuários de HAART (Highly Active Antiretroviral Therapies). Uma diminuição na frequência de mastócitos triptase+ com o aumento da inflamação tanto na gengivite como na periodontite foi observada em ambos os grupos. Não houve diferença na densidade e na frequência de mastócitos c-kit+ e triptase+ entre os grupos e neste caso, verificou-se uma diminuição com o aumento da inflamação apenas entre os casos de gengivite nos HIV-negativos. Na análise das células de Langerhans totais S100+, observou-se maior contagem no grupo com periodontite HIV-positivos em relação ao grupo com periodontite HIV-negativos. Ao realizar a análise por localização tecidual, não se observou diferença na contagem de células S100+. Não foi observado um aumento na contagem das células S100+ com o aumento da inflamação. Não houve correlação entre as células S100+, mastócitos c-kit+ e triptase+, com níveis sanguíneos de LT CD4, CD8 e carga viral. O uso de HAART parece ser a responsável pela manutenção de uma resposta imune eficaz nos indivíduos HIV-positivos. Desta forma, propicia densidade e frequência de mastócitos semelhantes com indivíduos HIV-negativos no tecido gengival acometido por gengivite e periodontite. Adicionalmente, o uso de HAART é um fator protetor às CL,

pois diminuem a carga viral e conseqüentemente, causam menor agressão a estas células no tecido gengival acometido por gengivite e periodontite.

Palavras chave: Células de Langerhans, mastócitos, gengivite, periodontite, resposta imune, HIV.

ABSTRACT

The goal of this sectional study was to analyze and compare the c-kit+ and tryptase+ mast cells densities, frequency and Langerhans S100+ cells densities by immunohistochemistry techniques in plaque induced human gingivitis and periodontitis samples, HIV-positive and HIV-negative subjects. Additionally, to evaluate correlation among densities and frequency of these cells with CD4+, CD8+ T cells and viral load levels in HIV-positive subjects. 50 biopsies samples were obtained and presenting in four groups: 1) 15 subjects with moderate chronic periodontitis (MCP) HIV-positive, 2) 15 subjects with moderate chronic periodontitis (MCP) HIV-negative, 3) 10 subjects with gingivitis (G) HIV-positive, 4) 10 subjects HIV-negative and G. All HIV-positive subjects were taking HAART (Highly Active Antiretroviral Therapies). No statistically significant difference of density and frequency among ckit+ and tryptase+ mast cells were observed and the groups. In the gingivitis and periodontitis HIV groups were observed a decrease of frequency of tryptase+ mast cells with infiltrate inflammatory increase. In case of ckit there was a decrease of frequency only in gingivitis HIV-negative group. Total Langerhans cells were observed higher MCP HIV-positive than the number of HIV-negative group. No statistically significant difference was observed when analyzed by localization tissue even with infiltrate inflammatory increase. No correlation statistically significant was observed among S100+, ckit+ and tryptase+ cells and blood levels of CD4, CD8 and viral load. The HAART therapy can be the responsible to maintain an efficient immune response in HIV-positive subjects. In this way, propitiate density and frequency of mast cells just like HIV-negative subjects with gingivitis and periodontitis. Additionally, the HAART therapy is a CL protector factor, because is responsible to decrease viral load and than cause lower aggression to this cells in the tissue with gingivitis and periodontitis.

key words – Langerhans cell, mast cell, immune response, HIV, gingivitis, periodontitis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	O processo inflamatório na doença periodontal	22
2.2	A doença periodontal e a infecção pelo HIV	24
2.3	O papel dos mastócitos na doença periodontal	30
2.4	As células de Langerhans e células dendríticas	36
2.5	As células dendríticas na doença periodontal	37
2.6	Inter relação entre células dendríticas e o HIV	42
3	OBJETIVOS	46
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	48
	Artigo I - Mastócitos c-kit+ e triptase+ na gengivite e periodontite em indivíduos HIV-positivos e negativos	49
	Artigo II - Análise quantitativa de células de Langerhans na gengivite e periodontite em indivíduos HIV-positivos e negativos.....	71
5	RESULTADOS	91
6	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
	ANEXOS	115

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1-	Distribuição da amostra segundo o gênero.....	91
Gráfico 2-	Distribuição da amostra segundo o uso do tabaco.....	91
Gráfico 3-	Distribuição do infiltrado inflamatório segundo sua classificação semi-quantitativa nas condições periodontais estudadas	94
Gráfico 4-	Classificação do infiltrado inflamatório segundo o número de células inflamatórias mononucleares presente.....	96
Gráfico 5-	Distribuição das células triptase+ segundo a condição periodontal.....	97
Gráfico 6-	Distribuição das células c-kit+ segundo a condição periodontal.....	97
Gráfico 7-	Distribuição da freqüência de células triptase+ segundo a condição periodontal.	98
Gráfico 8-	Distribuição da freqüência de células c-kit+ segundo a condição periodontal	99
Gráfico 9-	Distribuição das células S-100+ presentes na lâmina própria e no epitélio segundo a condição periodontal	101
Gráfico 10-	Distribuição das células S-100+ totais presentes segundo a condição periodontal	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição da amostra em relação à idade, gênero dos níveis sanguíneos de LT CD4, CD8, carga viral, segundo a condição periodontal gengivite (G) e periodontite (P) em indivíduos HIV-positivos	92
Tabela 2-	Distribuição amostral em relação à idade e gênero no grupo de indivíduos HIV-negativos.....	93
Tabela 3-	Variáveis de interesse dos indivíduos com Gengivite (G) e Periodontite Crônica Moderada (PCM) em HIV-positivos (HIV+) e HIV-negativos (HIV-)	93
Tabela 4-	Número de células inflamatórias mononucleares presente no infiltrado segundo a condição periodontal.....	95
Tabela 5-	Caracterização da distribuição da frequência de mastócitos segundo sua condição periodontal e intensidade do infiltrado inflamatório.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase -	Adenosina trifosfatase
AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CCR 5 -	Receptores de quimiocina CC tipo 5
CCR 6 -	Receptores de quimiocina CC tipo 6
CCL 5 -	Ligante de quimionica CC tipo 5
CXCR 4 -	Receptores de quimiocina CXC tipo 4
CD 1a -	Cluster of differentiation 1a
CD 4 -	Cluster of differentiation 4
CD 8 -	Cluster of differentiation 8
CD 83 -	Cluster of differentiation 83
CD -	Célula dendrítica
CL -	Célula de Langerhans
CNPq -	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA -	Ácido Desoxi-ribonucleico
DC-SIGN -	Anticorpo anti células dendríticas
FAPEMIG -	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GUN -	Gengivite Ulcerativa Necrosante
HAART -	Highy Active Antiretroviral Theraphies
HLA-DR -	Antígenos leucocitários humanos DR
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig -	Imunoglobulina
LB -	Linfócito B
LT -	Linfócito T
LT CD4 -	Linfócito T CD4
LT CD8 -	Linfócito T CD8
LTh1 -	Linfócito T auxiliar tipo 1
LTh2 -	Linfócito T auxiliar tipo 2
MHC -	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MHC-I -	Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe I
MHC-II -	Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II
mm -	Milímetros

MMP -	Metaloproteinases de matriz
OMS -	Organização Mundial da Saúde
OKT6 -	Anticorpo monoclonal de camundongo anti células de Langerhans
PS -	Profundidade de Sondagem
PAF -	Fator ativador de Plaquetas
PAP -	Procedimento antibacteriano da peroxidase
PIC -	Perda de Inserção Clínica
PUN -	Periodontite Ulcerativa Necrosante
RANTES -	Regulador de ativação da expressão e secreção de células T
RAR -	Raspagem e alisamento radicular
RNA -	Ácido Ribonucleico
SIV -	Vírus da Imunodeficiência Símia
TCR -	Receptor de células T
TGF- β -	Fator Transformador de Crescimento - beta
TNF- α -	Fator de Necrose Tumoral – alfa
VCAM 1 -	Molécula de adesão celular vascular tipo 1

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos epidemiológicos vêm apontando a doença periodontal como uma doença de grande importância na saúde pública (PAPAPANOU, 1996; AAP, 2005). Existem indicadores de que as consequências desta doença, além de acometerem a cavidade bucal, também possuem influências sistêmicas. A conscientização da população sobre a importância da manutenção da saúde bucal, seja através de métodos preventivos ou terapêuticos apropriados, e da relevância deste aspecto na saúde do indivíduo como um todo, é um dos pontos positivos em direção ao controle desta e de outras doenças bucais. Desta forma, o já elevado e crescente contingente de indivíduos acometidos pela doença periodontal justificam todos os esforços científicos em direção ao entendimento das bases celulares e moleculares desta doença com a esperança de que os conhecimentos gerados possam beneficiar a população em risco ou doente (LINDHE et al. 2005).

A avaliação da natureza e composição do infiltrado inflamatório associado à patogênica da doença periodontal tem sido uma abordagem bastante utilizada pelos estudos que avaliam o processo inflamatório periodontal. Estudos sobre a caracterização do infiltrado inflamatório decorrentes da periodontite já foram realizados, tendo fornecido informações sobre os tipos celulares, citocinas e fatores inflamatórios presentes no sítio da infecção. Outra abordagem também utilizada é a avaliação da ocorrência de alterações fenotípicas e/ou funcionais em populações celulares circulantes, numa tentativa de se determinar alterações sistêmicas associadas à doença periodontal (ÇELENLIGIL et al. 1990; LAPPIN et al. 1999).

A resposta inflamatória é característica de cada estágio da doença, desta maneira gengivite e periodontite possuem populações de células inflamatórias distintas quantitativa e qualitativamente (OKADA et al. 1983). Análises imunoistoquímicas caracterizaram os

leucócitos presentes em tecidos periodontais e revelaram que na gengivite há a predominância de células da resposta Th1 e na periodontite células Th2 (BERGLUNDH et al. 2002). Gemmell & Seymour (1995) mostraram um aumento na proporção de linfócitos T (LT) com um aumento do infiltrado inflamatório na gengivite em relação à gengiva clinicamente saudável. Em outro estudo, Gemmell & Seymour (1995) observaram um aumento na contagem de LT no sangue periférico, sugerindo que esta migração celular para a gengiva pode ocorrer durante o processo de gengivite. Outros estudos caracterizam também de forma bem distinta as citocinas envolvidas nos diferentes estágios da doença (UKAI et al. 2001; GUSTAFSSON et al. 2006). Esta resposta imune é organizada por um importante tipo celular, LT CD4+. Foram identificadas subpopulações funcionalmente distintas de LT CD4+, os linfócitos Th1 e Th2. Linfócitos Th1 são caracterizados pela produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), sendo associadas com a inflamação e indução da resposta imune mediada por células. Linfócitos Th2 produzem IL-4, IL5 e IL13 e auxiliam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B (LB) que estão associados a resposta humoral (REINHARDT et al. 1988; YAMAZAKI et al. 1993; LAPPIN et al. 1999, GEMMELL & SEYMOUR 2004).

A resposta imune pode ser influenciada por fatores de risco para a doença periodontal. Entre eles estão os fatores não modificáveis como o polimorfismo genético e os fatores modificáveis: a condição sócio-econômica, fumo, estresse e doenças sistêmicas, particularmente o diabetes e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estes fatores aumentam o risco de início e progressão da doença (BECK et al. 1990).

Estudos transversais nos anos 90 abordaram a questão da prevalência da doença periodontal em indivíduos HIV-positivos, estes reportaram alta prevalência de eritema gengival linear, gengivite ulcerativa necrosante (GUN) e periodontite ulcerativa necrosante (PUN)(FRIEDMAN et al. 1991, FICARRA & SHILLITOE, 1992). Estudos recentes

demonstram não haver diferença significativa na prevalência e gravidade da doença em comparação com controles saudáveis (ROBINSON et al. 2000; HOFER et al. 2002). Isto se deve ao uso de medicação antiviral, terapia antiviral altamente ativa (HAART). Além disto, os participantes dos estudos são alocados aleatoriamente, e assim incluem indivíduos com e sem a manifestação da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Neste sentido, é possível que os relatos anteriores possuam um viés de seleção (YIN et al. 2007).

Smith et al. (1995) observaram uma prevalência dentro de padrões normais de frequência para a doença periodontal em indivíduos soropositivos, a microflora subgingival assemelhava-se com a de indivíduos sem alterações sistêmicas, não observando relação com a contagem de LT CD4+ e CD8+. Ramirez et al. (2003) observaram que o surgimento da candidíase e da leucoplasia pilosa estão associados com a contagem de LT CD4+ e com o aumento da carga viral, sendo desta forma um indicador para mudanças no tratamento anti retroviral. O sucesso da terapia relaciona-se com a redução da carga viral e conseqüentemente com a diminuição na prevalência das lesões bucais. Pacientes HIV-positivos que apresentam freqüentes recorrências destas lesões devem ser avaliados sob possível progressão da doença (HODGSON et al. 2006).

A infecção pelo HIV é responsável pela destruição dos LT CD4+, macrófagos e células dendríticas (CD) (YIN et al. 2007). A diminuição dos LT CD4+ resulta em uma resposta imune alterada com redução da sua especificidade e ativação anormal de LB (SHIRAI et al. 1992). Apesar desta resposta imunológica alterada, estudos recentes não indicaram uma maior gravidade da doença periodontal em indivíduos HIV-positivos sob uso de HAART (ROBINSON et al. 2000; HOFER et al. 2002; YIN et al. 2007).

O infiltrado inflamatório na doença periodontal foi avaliado tanto em indivíduos HIV-positivos como em HIV-negativos e a uma das células estudada foi o mastócito. Os mastócitos estão envolvidos em várias atividades na resposta inflamatória como:

produção de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF). Possuem complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II, realizando apresentação de antígenos para LT CD4+ e CD8+. Realizam fagocitose e são responsáveis pela produção de citocinas presentes na resposta celular e humoral. Além disto, estão envolvidos na cicatrização tecidual através de suas metaloproteinases de matriz (MMP) (LIN & BEFUS 1999, NÆSSE et al. 2003, WALSH 2003, STEINSVOLL et al. 2004).

Comparações na contagem de mastócitos em tecidos gengivais clinicamente saudáveis, com gengivite ou periodontite são inconclusivas, tendo em vista que alguns estudos mostram um aumento na contagem celular com o aumento da inflamação, (SHAPIRO et al. 1969, KENNETT et al. 1993, BATISTA et al. 2005) outros mostram uma redução (ROBINSON & DE MARCO 1972, GEMMELL et al. 2004). É hipotetizado que estes achados controversos sejam devidos a diferenças metodológicas, principalmente associadas à ausência de padronização na definição de casos e do uso de distintas técnicas laboratoriais.

Outra célula presente no infiltrado é a célula dendrítica, que é a primeira célula a fazer contato com o antígeno local realizando sua captura, processamento e apresentação aos LT presentes nos linfonodos. Nos tecidos periféricos humanos três subgrupos são observados: células de Langerhans (CL), presentes na camada basal e supra basal do epitélio; células dendríticas, presentes no tecido conjuntivo, na derme e órgãos como rins, pulmões e coração; células dendríticas linfóide/plasmocitóide, presentes no sangue (CUTLER & JOTWANI, 2004).

Estudos experimentais têm demonstrado diferenças no número de CD quando se compara gengivite, periodontite e gengiva clinicamente saudável. Maior contagem foi observada com o aumento da inflamação (NEWCOMB et al. 1982, JOTWANI & CUTLER, 2003), porém, não foi observada diferença quantitativa entre gengivite e periodontite

(JOTWANI et al. 2001). Entretanto, observaram-se alterações morfológicas como diminuição do tamanho celular e do número dos dendritos principalmente na periodontite (SEGUIER et al. 2000b). Cirrincione et al. (2002), observaram CL em todo o epitélio bucal e relataram que no epitélio da bolsa estas células estavam em quantidade muito menor e normalmente não expressavam MHC-II nem faziam contato com linfócitos. Já na lâmina própria da região da bolsa, as CD estavam em maior número do que na região bucal e estas expressavam MHC-II e relacionavam-se com linfócitos e também estavam próximas à plasmócitos.

Alterações fenotípicas e funcionais nas CL também foram observadas na periodontite associada ao HIV, como grande diminuição ou até a ausência de expressão de MHC-II, concentravam-se na camada basal do epitélio e faziam contato apenas com LT CD8+ foram reportadas por Pimpinelli et al. (1995). Adicionalmente os autores relataram que as CD da lâmina própria aumentaram em número, mantinham a expressão do MHC-II e formaram grupos com LT CD8+. Estas alterações estão relacionadas com a expressão de receptores de superfície, entre eles CD4, CCRs e CLR. Estes receptores estão relacionados com funções usuais como captura de antígenos, migração e interação com células T e também atuam com destaque nas interações com o vírus HIV (JAMESON et al. 2002, MACKEWICZ et al. 2003, TELESHOVA et al. 2003). Menor contagem de CL no epitélio gengival na periodontite de indivíduos HIV-positivos comparado com HIV-negativos foi reportada (MYINT et al. 2000). Esta contagem reduzida pode estar associada à ligação entre partículas virais e o receptor CD4 das células dendríticas, o que seria uma consequência direta da infecção pelo HIV (WOOD et al. 1983). Outro mecanismo de depleção das CL seria sua destruição pelos LT CD8+ no epitélio e no tecido linfóide (BORROW et al. 1995). Já naqueles indivíduos com manifestação da AIDS, o mecanismo de reposição celular na medula óssea pode estar comprometido, por isso observa-se uma menor contagem de CD (KNIGHT et al. 1995).

Apesar de grande parte da atividade imunológica das CL e dos mastócitos terem sido descritas, os achados são conflitantes e ainda limitados sobre a distribuição e real papel destas células no tecido periodontal inflamado nos indivíduos HIV-positivos. Para melhor compreender a resposta imune nestes indivíduos, este estudo foi proposto com o objetivo de avaliar quantitativamente as células de Langerhans e os mastócitos na gengivite e na periodontite em indivíduos HIV-positivos e HIV- negativos. Este estudo será apresentado em cinco seções distintas: 1) revisão de literatura, 2) objetivos, 3) Artigos I e II, intitulados: (I) Mastócitos c-kit+ e triptase+ na gengivite e periodontite em indivíduos HIV-positivos e negativos. (II) Análise quantitativa de células de Langerhans na gengivite e periodontite em indivíduos HIV-positivos e negativos, 4) resultados globais, 5) conclusões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O processo inflamatório na doença periodontal

A presença de bactérias patogênicas e conseqüente infecção e inflamação são marcos fundamentais da doença periodontal. A reação inflamatória pode ser vista microscópica e clinicamente, no periodonto afetado e representa a resposta de um hospedeiro susceptível à presença da microbiota do biofilme e seus produtos (SCHENKEIN, 2006).

Os estágios iniciais da doença periodontal representam uma evolução inflamatória acompanhada de modificações no tecido conjuntivo e epitélio juncional. A lesão inicial é caracterizada pela presença de um infiltrado celular composto principalmente por macrófagos e LT (PAGE & SHROEDER, 1976). A lesão avançada ocorre quando a inflamação se estende para o ligamento periodontal e osso alveolar, verificando-se uma contínua perda de fibras colágenas subgengivais próxima à bolsa periodontal, presença de reabsorção óssea e aumento de LB e plasmócitos (PAGE & SHROEDER, 1976, GEMMELL & SEYMOUR, 2004).

Embora as bactérias apresentem um papel claro na patogênese da periodontite, está bem definido que o sistema imune do hospedeiro é essencial no processo da doença. As células do sistema imune estão amplamente distribuídas pelo organismo e na presença de um processo infeccioso, há a necessidade de concentrar estas células e seus produtos no local da infecção (ALLISSON & LANIER, 1987). A atividade inflamatória observada na doença periodontal é um processo decorrente da migração e recrutamento celular, e o estabelecimento dessa atividade envolve o deslocamento inicial e adesão de leucócitos ao endotélio vascular, assim como sua posterior emigração para o tecido, além

disto, estes processos envolvem diversas proteínas de adesão e quimiotáticas (TEDER et al., 1995).

Gemmel et al. (1996) sugeriram que um desequilíbrio imuno regulatório de LT locais pode existir na doença periodontal, possivelmente relacionado à produção de distintas citocinas. Essas moléculas, sendo produzidas por células no microambiente inflamatório, irão, pelo controle das funções de diversos tipos celulares e da migração/recrutamento celular, determinar o destino do processo inflamatório. Enquanto citocinas como IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-8 promovem direta ou indiretamente a atividade inflamatória, IL-4, IL-10, e IL-13 têm sido relacionadas à atividade antiinflamatória. Na verdade, o equilíbrio entre estas citocinas e conseqüentemente, o equilíbrio entre a representatividade das atividades coordenadas por elas, pode definir estágios diferentes da inflamação.

Os LT Th1 e Th2 foram identificados como sendo subpopulações funcionalmente distintas de LT CD4+, sendo que sua distinção funcional é resultado de uma população diferenciada de citocinas (MOSSMAN et al., 1986). Os LT Th1 são caracterizadas pela produção de IFN- γ , IL-2, estando associadas com a inflamação e induzem uma resposta imune mediada por células. Os LT Th2 produzem IL-4, IL-5, e IL-13, auxiliam a proliferação e diferenciação dos LB e estão associadas com a indução da resposta humoral. Resultados têm frequentemente demonstrado uma mistura de citocinas derivadas de LT Th1 e Th2 ou a predominância de um dos tipos de resposta em indivíduos com doença periodontal (SEYMOUR & GEMMELL, 2001). A ocorrência mista de citocinas Th1 e Th2 pode ser explicada tendo em vista o grande número de espécies bacterianas que podem interagir com o sistema imune na doença periodontal (SCHENKEIN, 2006). Os estudos histológicos caracterizam as lesões iniciais e a gengivite clínica como uma resposta Th1, enquanto as lesões avançadas como uma resposta Th2.

Desta maneira podemos compreender que a doença periodontal envolve complexas atividades inflamatórias que são iniciadas pela presença de bactérias patogênicas. No modelo multifatorial proposto para a doença, observa-se que esta resposta imune pode ser modificada pela presença de fatores de risco biológicos, comportamentais e sociais (BECK, 1990). Dentre os inúmeros fatores biológicos torna-se de importância para esta revisão a inter relação entre a doença periodontal e a infecção pelo HIV.

2.2 A doença periodontal e a infecção pelo HIV

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de indivíduos adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores de São Francisco e Nova York, que apresentavam Sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocytis carinii* e comprometimento do sistema imune. Em 1983 o agente etiológico foi identificado. Tratava-se de um retrovirus humano, atualmente denominado Vírus da Imunodeficiência Humana, HIV-1, que anteriormente foi denominado LAV e HTVL-III. Em 1986 foi identificado um segundo agente etiológico, também retrovirus, estreitamente relacionado ao HIV-1, denominado HIV-2. Embora não se saiba ao certo qual a origem dos HIV-1 e 2, sabe-se que uma grande família de retrovirus relacionados a eles está presente em primatas não-humanos na África Sub-Saariana. O vírus da imunodeficiência Símia (SIV) presente com muita frequência nos macacos verdes africanos é muito próximo ao HIV-2, sugerindo que ambos evoluíram de uma origem comum. Por estes fatos, supõe-se que o HIV tenha origem geográfica Africana e que sua disseminação se deve às características da sociedade contemporânea (ABBAS, 2005; OMS, 2005).

O HIV-1 e o HIV-2 possuem a estrutura geral dos lentivirus. É um vírus RNA, mas realiza seu ciclo celular passando pela incorporação do material genético no núcleo da célula, ao contrário de outros vírus RNA que realizam seu ciclo celular somente no citoplasma. Isto ocorre graças à presença da enzima transcriptase reversa, que transforma uma molécula de RNA em uma de DNA antes da incorporação no genoma da célula, daí a classificação como um retrovírus. Para completar um ciclo de infecção e reprodução em uma célula, o HIV passa pela fusão com a superfície da célula e entrada no citoplasma, produção do DNA no ribossomo a partir do RNA viral, integração no genoma da célula, produção de proteínas virais, excitação e maturação extracelular do *virion* (ABBAS, 2005).

O principal receptor da superfície celular para o HIV é a molécula CD4. Esta molécula é expressada principalmente na superfície de LT auxiliares. Outras células que expressam a molécula CD4 na superfície, como macrófagos e células dendríticas também podem ser infectadas pelo HIV. Contínua replicação viral ocorre nos linfonodos com liberação do vírus e células infectadas no sangue. A queda na contagem de LT CD4+ ocorre como resultado de uma infecção direta da célula com alteração e lise da membrana celular, indução de apoptose, formação de sincícios, alteração nas células progenitoras e auto-imunidade (YIN et al. 2007).

Atualmente existem quatro classes de anti retrovirais aprovadas pela *Food and Droug Administration*: inibidor da transcriptase reversa análogo nucleosídeo e nucleotídeo, inibidor da transcriptase reversa análogo não nucleosídeo, inibidores de protease e fusão de inibidores, constituindo a chamada terapia ativa anti retroviral, HAART (*Highly Active Antiretroviral Theraphies*). Os conhecimentos atuais sobre a imunopatogênese da infecção pelo HIV e a existência de reservatórios virais anatômicos e celulares indicam que a erradicação do HIV não pode ser obtida com os esquemas terapêuticos existentes. Apesar dos avanços terapêuticos, estima-se que 10 a 20% dos

indivíduos que iniciam o tratamento não conseguem suprimir a viremia de forma satisfatória após alguns meses de terapia (falha virológica primária) e cerca de 20 a 50% dos que apresentam boa resposta inicial apresentarão falha virológica após um ano de tratamento (falha virológica secundária), sendo a taxa de resposta virológica aos tratamentos subsequentes progressivamente reduzida. A falha terapêutica, principalmente por resistência às drogas, é um fenômeno esperado e um número crescente de indivíduos já se encontra sem opções de medicamentos anti retrovirais. Efeitos colaterais dos anti retrovirais, muitos dos quais desconhecidos no passado, são cada vez mais frequentes e, em grande parte, são os principais responsáveis pela descontinuação da terapia. Dentre outros, o desenvolvimento de neuropatia, hepatotoxicidade, pancreatite, lipodistrofia, diabetes, dislipidemia, osteoporose e acidemia láctica estão entre as complicações que podem piorar consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo infectado pelo HIV (YIN et al., 2007; UNAIDS, 2009).

A terapia inicial sempre deve incluir três drogas, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN) associados a um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN) ou a um inibidor da protease (IP), o que significa que esquemas duplos (apenas com dois ITRN) não devem mais ser utilizados. A única exceção na qual a terapia dupla pode ser utilizada é o caso de exposição ocupacional, mesmo em situações específicas. O uso isolado do AZT ainda é aceitável para a quimioprofilaxia da transmissão vertical em algumas situações específicas (YIN et al., 2007; UNAIDS, 2009).

O Brasil é uma referência no tratamento da AIDS, sendo que dos 15 medicamentos distribuídos, 9 são fabricados no país. Esta produção local somente foi possível após 2001, quando a Organização Mundial de Saúde realizou a quebra de patente dos anti retrovirais (UNAIDS, 2009).

A infecção pelo HIV resulta em várias alterações sistêmicas e bucais. Os estudos epidemiológicos envolvendo as lesões bucais associadas ao HIV iniciaram nos anos 90. No decorrer dos anos, as pesquisas foram intensas e o tratamento com drogas para o HIV obtiveram relativo sucesso, aumentando a sobrevivência dos indivíduos e melhorando sua qualidade de vida. Estes estudos foram importantes para conhecer a AIDS e suas manifestações bucais.

Os primeiros estudos mostraram uma prevalência aumentada de manifestações bucais. De acordo com Axell et al. (1990) as manifestações bucais associadas com a infecção pelo HIV devem ser listadas dentro de 3 grupos, baseados na intensidade com que se apresentam nesta associação. O grupo I consiste de lesões bucais que estão comumente associadas com infecções pelo HIV, como por exemplo candidíase, leucoplasia pilosa, gengivite úlcero-necrosante e sarcoma de Kaposi. Ulcerações atípicas, doenças de glândulas salivares, infecções virais por citomegalovírus, herpes vírus, papiloma vírus e varicela zoster são enquadradas no grupo II, pois são menos comuns de ocorrerem. O grupo III abrange lesões possivelmente associadas com infecção pelo HIV, como osteomielite e sinusite.

Além de alta prevalência de manifestações bucais, observou-se também maior destruição periodontal, com maior perda de inserção clínica nos indivíduos HIV-positivos quando comparados com HIV-negativos (YEUNG et al., 1993). Em um estudo realizado por Glick et al. (1994) com 700 indivíduos HIV-positivos, observou-se uma associação positiva entre Periodontite Ulcerativa Necrosante (PUN) com o estado imunológico dos indivíduos, chegando à conclusão de que indivíduos com contagem de LT CD4 abaixo de 200 cel/mm³ tinham 20,8 vezes mais chance de desenvolver PUN. É importante salientar que nestes estudos, os indivíduos encontravam-se debilitados imunologicamente, já com manifestações da síndrome, o que podem acarretar um viés de seleção na amostra. Outro ponto importante é que a medicação anti retroviral disponível não se mostrava tão eficaz.

A partir de 1996, com o uso dos inibidores de proteases e uma associação de medicamentos é que houve uma mudança no controle da doença e suas alterações sistêmicas e bucais.

Martinez-Canut et al. (1996) realizaram correlação entre gravidade da doença periodontal e nível de LT CD4+, que contrário ao observado por por Gonçalves et al. (2005) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre gravidade da doença e contagem de LT CD4+. Thomas et al. (1998) verificaram que alterações periodontais associadas ao HIV eram raras, sendo que neste estudo a maioria dos indivíduos fazia uso de medicamentos. Assim, concluiu-se que o uso de anti retrovirais reduz a frequência de periodontite associada ao HIV. Ceballos-Salobrena et al. (2000) avaliaram a prevalência de lesões bucais em indivíduos HIV-positivos com terapia anti retroviral. A mais alta prevalência de lesões bucais foi encontrada em usuários de droga intravenosa e em indivíduos com carga viral maior que 10.000 cópias e LT CD4+ menor que 200 cel/mm³. Observou-se assim que com a terapia anti retroviral, houve queda de 30% nas lesões bucais.

Assim como nas lesões bucais, houve uma mudança de paradigma com relação à maior gravidade da doença periodontal nos indivíduos HIV-positivos. Estudos comparativos entre indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos não mostraram maior gravidade da doença em HIV-positivos, avaliações longitudinais mostraram perdas de inserção equivalentes (ROBINSON et al. 2000), com os mesmos fatores de risco associados ao HIV-negativos, como: idade, tempo de tabagismo, carga viral, e presença de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella Intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ALPAGOT et al.,2003). Com relação à resposta da terapia periodontal e de suporte Hofer et al. (2002) observaram que indivíduos HIV-positivos respondem igualmente bem, inclusive com melhor índice de placa do que nos indivíduos HIV-negativos. Concluindo assim, que nos indivíduos HIV-positivos o nível de inserção

pode ser mantido. No entanto, a higiene bucal e o monitoramento periodontal são os principais fatores para o sucesso.

Com relação ao desafio bacteriano na doença periodontal, Gonçalves (2005) observou a associação entre a microbiota subgengival em HIV-positivos com periodontite crônica em uso de anti retrovirais, com diferentes níveis de LT CD4+, sendo que 61% destes indivíduos já apresentavam sintomas da AIDS. Concluiu-se que a microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica inclui alta prevalência de patógenos periodontais clássicos, encontrados também em indivíduos não infectados (YEUNG et al., 2002; PATEL et al., 2003). A imunossupressão grave favorece a colonização dessas espécies, assim como também de espécies não comumente encontrados na microbiota subgengival. Em outro estudo Gonçalves et al. (2007) compararam a composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica e gengivite, HIV-negativos e HIV-positivos usuários da HAART. Observaram maior prevalência das bactérias pesquisadas em indivíduos HIV-negativos, sendo que *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* e *Selenomonas noxia* foram as espécies mais frequentes. Em contraste, *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii* foram observados com maior frequência em indivíduos HIV-positivos. Desta forma concluíram que embora os principais patógenos em indivíduos HIV-positivos sejam os mesmos que em HIV-negativos, existe uma singularidade da doença, com algumas espécies observadas somente em indivíduos HIV-positivos (ODDEN et al. 1995; MYINT et al., 1999).

Outra abordagem da doença seria em relação a sua imunopatologia. Como a infecção pelo HIV promove uma destruição dos LT CD4+ e conseqüente desequilíbrio funcional do sistema imune, vários estudos foram propostos para quantificar os LT CD4+ e CD8+, tanto no sangue periférico como em biópsias teciduais. Steidley et al. (1992) observaram maior relação LT CD4/CD8 no sangue periférico de indivíduos HIV-positivos

com periodontite crônica e nenhuma contagem tecidual de LT CD4+ ou CD8+. Esta total ausência de LT no tecido gengival pode explicar a característica de rápida progressão da doença. Indivíduos com história de PUN possuem menor contagem de LT CD4+ (ODDEN et al., 1995).

Na resposta Th2, predominante na periodontite (SEYMOUR & GEMMELL, 2001) pode-se observar algumas alterações nos indivíduos HIV-positivos. Gomez et al. (1997) compararam a expressão de células Th2 (CD30) em 5 indivíduos com gengivite HIV-positivos e 5 HIV-negativos, utilizando a técnica de imunistoquímica (anticorpo Ki-1). Foi observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de CD30+ em indivíduos HIV-positivos em relação aos HIV-negativos. Myint et al. (1999) avaliaram a presença e distribuição de imunoglobulinas no infiltrado inflamatório de indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos com periodontite crônica. Os indivíduos HIV-positivos apresentaram um maior número de células IgA+ e IgG+ adjacente a bolsa periodontal do que indivíduos HIV-negativos ($p < 0,05$) e menor número de IgG2 em toda a gengiva ($p < 0,05$). Enquanto na gengiva dos HIV-negativos a maior concentração destas células encontravam-se adjacente à bolsa periodontal, nos HIV-positivos esta distribuição era difusa. Em outro trabalho, Myint et al. (2002) realizaram uma análise quantitativa de neutrófilos, macrófagos e mastócitos em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos através da técnica de imunistoquímica. No grupo HIV-positivos assintomáticos houve um aumento em relação aos HIV-negativos em cerca de 10 vezes na contagem dos mastócitos, já nos grupos com alguma manifestação (eritema linear ou candidíase) foi observado um aumento mais pronunciado, em cerca de 15 vezes, quando comparado com HIV-negativos. Entretanto a análise de correlação com níveis séricos de LT CD4+ não foi estatisticamente significativa. Além disto, cerca de 50% dos mastócitos em ambos os grupos expressavam TGF- β_1 que é um potente quimiotático para neutrófilos, macrófagos e mastócitos e um importante fator envolvido no aumento da resposta inflamatória.

2.3 O papel dos mastócitos na doença periodontal

Uma das células presente no infiltrado inflamatório é o mastócito. Estas células são originadas na medula óssea, a partir de células hematopoiéticas pluripotenciais. Na medula iniciam parte de sua maturação, entram na corrente sanguínea e finalizam sua maturação na mucosa, ou no tecido conjuntivo. Dependendo de sua localização no tecido, há uma diferenciação na composição dos seus grânulos. Nos mastócitos da mucosa predomina a triptase; já nos do tecido conjuntivo verifica-se a presença de triptase e quimase. A triptase é uma protease encontrada tanto em mastócitos como em basófilos. É uma ativadora de células epiteliais de reparo, quimiotática para granulócitos a partir da indução da produção de interleucina-8 (IL-8) pelas células epiteliais, ativadora da pró-colagenase e também participa na cascata de produção de metaloproteinases de matriz (MMP). A quimase é um mediador específico dos mastócitos não encontrado nos basófilos. Uma de suas funções é clivar e ativar o precursor inativo da IL-1 β . No entanto, o real significado da diferença de fenótipos destas células ainda não foi totalmente estabelecido (GALLI & KITAMURA, 1987, GRUBER et al. 1988).

Com relação à sua localização, estão presentes em grande número logo abaixo do epitélio da mucosa e também dentro deste. Na lâmina própria intestinal, são encontrados normalmente 20.000 células/mm³, podendo aumentar em caso de infecções parasitárias e inflamações intestinais (LIN & BEFUS, 1999).

Os mastócitos possuem funções na inflamação, defesa e reparo tecidual. Estão envolvidos na resposta imune inata e adquirida, produzindo citocinas que atuam na resposta tipo Th1 e Th2. Quando estimulado por citocinas ou produtos bacterianos, estas células produzem e secretam vários mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF), fator de necrose tumoral (TNF) e

interleucinas IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13. Na função de reparo tecidual, induzem a produção de MMPs. Além disso são capazes de fagocitar, processar e fazer apresentação de antígenos (WALSH, 2003; STEINSVOLL et al., 2004).

As células do sistema imune secretam importantes mediadores inflamatórios com atuações autócrina, parácrina ou endócrina. Um dos mediadores mais importantes secretados pelos mastócitos é a histamina, que é uma substância vaso ativa, que aumenta a permeabilidade vascular através da contração endotelial e formação de espaços intercelulares sendo responsável, também, pela ativação da molécula de adesão P-selectina que promove a adesão de plaquetas e de leucócitos ao endotélio (ZHAO et al., 2001).

O TNF também é derivado dos mastócitos na inflamação. É responsável pela expressão endotelial da E-selectina (ELAM-1), a molécula de adesão rápida para neutrófilos, LT, monócitos e outros leucócitos. A síntese e liberação prolongada de TNF pode manter a migração de leucócitos e promover a cronicidade da inflamação. Exerce também efeito quimiotático para neutrófilos no tecido. Nos queratinócitos, o TNF em pequena concentração detém o seu crescimento, e em altas concentrações é citotóxico. Outro importante tipo celular que atua o TNF é o LT. Estudos têm demonstrado que no líquen plano oral o TNF induz as células da lesão a produzirem RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*), que estimula a degranulação de mastócitos e liberação de histamina. Este mecanismo de feedback positivo permite uma explicação de como o LT no infiltrado pode promover uma cronicidade de degranulação de mastócitos e secreção de TNF. Possui atuação também nas células de Langerhans, promovendo sua ativação, estimula suas células precursoras e ativam células dendríticas peri vasculares (WALSH et al., 2003; SUEKI et al., 1993).

Além do TNF, os mastócitos realizam a produção e liberação de IL-1, que é responsável pela ativação de moléculas de adesão no endotélio. Esta interleucina

também é produzida por macrófagos e monócitos em resposta a endotoxinas de bactérias gram negativas do sulco, polpa ou lesões periapicais. Como sua síntese e liberação demoram de seis a 24 horas, e sua ação é como um mediador primário, observa-se que a atuação do TNF é mais rápida e potente na expressão da E-selectina. Outra interleucina produzida é a IL-4, que influencia a progressão para uma inflamação crônica, pois estimula a adesão endotelial de linfócitos e monócitos e suprime a adesão de neutrófilos. Esta seleção celular acontece devido a mudanças na expressão das moléculas de adesão, especificamente supressão da E-selectina e P-selectina e ativação da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) (GEMMELL et al.,1993; PATEL, 1999).

Apesar de não ser a principal célula na apresentação de antígenos, uma importante interação ocorre entre mastócitos e LT. Os mastócitos expressam complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, além de CD 80, CD86 e CD54, que servem como segundo sinal para ativação do linfócito T durante a apresentação. Também são capazes de processar vírus e bactérias intracelulares para sua apresentação restrita através do MHC I. Apesar de não ser uma célula apresentadora de antígeno específica, sua contribuição para uma resposta de LT específica é real, como visto no líquen plano oral. Os mastócitos dividem com as células dendríticas uma estratégica posição peri-vascular, e sua produção de citocinas nesta localização é tão importante como a expressão de moléculas acessórias em sua superfície (WALSH et al.,1991; ZHAO et al., 2002b).

Existe também uma íntima relação entre mastócitos e LT, influenciando sua quimiotaxia, através da expressão de moléculas de adesão e pela degradação da matriz extracelular através de proteases. Adicionalmente, a produção de IL-6 e IL-8 promove a quimiotaxia para LT CD4+ e CD8+ respectivamente (MOLLER et al., 1993).

Agentes que alteram a função e degranulação dos mastócitos têm sido descritos. O bloqueio da resposta de mastócitos da polpa dental *in vitro* foi possível utilizando

anticorpos que neutralizaram o TNF. Corticosteróides têm sido utilizados há décadas no tratamento de condições inflamatórias da polpa e da mucosa bucal. Uma de suas importantes propriedades é diminuir ou eliminar a presença de mastócitos no local através do seu uso prolongado (LAVKER & SCHECHTER,1985). Na tentativa de diminuir o dano tecidual causado pela degranulação dos mastócitos, Jeffcoat et al. (1985) avaliaram o efeito de uma droga inibidora da degranulação de mastócitos, a lodoxamide ethil. Este experimento foi realizado em cães beagle com periodontite. O uso da medicação em dose diária de 20mg/kg, mostrou-se eficaz no tratamento da doença com diminuição da perda óssea, porém observou-se um aumento da mobilidade dentária nos cães medicados.

Estudos foram realizados com o intuito de avaliar a participação dos mastócitos nas doenças inflamatórias, entre elas a gengivite e a periodontite. Os seguintes métodos são utilizados para quantificar sua presença no tecido: histoquímica, imunoistoquímica e imunofluorescência (BATISTA et al., 2005).

Aeschlimann et al. (1980) realizaram uma análise quantitativa de mastócitos na periodontite crônica utilizando azul de toluidina. Foram realizadas remoções em três momentos: antes do início da terapia periodontal causal; durante a cirurgia periodontal que se realizou após quatro semanas da raspagem e também após quatro meses da realização da fase cirúrgica. Não houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar o número de células na fase inicial e durante a cirurgia. Porém foi observado um aumento em ambas as regiões após quatro meses da cirurgia, mostrando um envolvimento dos mastócitos no reparo tecidual. Assim como observado por Günham et al. (1991), neste estudo foram utilizadas biópsias de indivíduos saudáveis e com periodontite, removendo um fragmento antes da cirurgia e um segundo fragmento, três semanas após a terapia cirúrgica. Os tecidos removidos foram preparados para análise histoquímica utilizando os métodos de Giemsa e do azul de toluidina. A contagem celular foi semelhante em ambos os métodos. O número de mastócitos foi maior no tecido

inflamado do que no saudável. No entanto, a contagem de mastócitos foi menor no tecido inflamado quando comparado com o do pós-operatório. Batista et al., (2005) avaliando gengiva clinicamente saudável, gengivite e periodontite não observaram diferenças nas contagens de mastócitos entre os três grupos, utilizando o método histoquímico com o azul de toluidina.

Avaliando os estudos com histoquímica pode-se verificar que existe uma relação dos mastócitos com o processo inflamatório e também com o processo cicatricial de reparo e rearranjo do tecido. No entanto, diferentes critérios de classificação da doença e o fato da doença periodontal ser sítio específica, alterando sua atividade e quiescência em surtos aleatórios, torna difícil uma uniformidade dos resultados.

Estudos com imunoistoquímica comparando gengiva clinicamente saudável, gengivite e periodontite também não são conclusivos. Gemmell et al. (2004) avaliaram tecido gengival com gengivite ou clinicamente saudável em um grupo e fragmentos com periodontite moderada a grave em outro grupo. Os indivíduos com periodontite foram submetidos à primeira fase da terapia periodontal e como persistiram tanto o sangramento como a PS aumentada, foram submetidos à cirurgia periodontal e removido o tecido gengival. No tratamento imunoistoquímico foram utilizados os anticorpos triptase e c-kit. Secções coradas com hematoxilina e eosina foram avaliadas previamente em relação ao tamanho do seu infiltrado inflamatório sendo considerado pequeno até 1/3 da região adjacente ao epitélio juncional e do sulco, médio até 2/3 e grande em toda a sua extensão. No grupo com gengivite e gengiva clinicamente saudável, somente os fragmentos com infiltrado pequeno foi utilizado. O número de mastócitos triptase+ diminuiu na periodontite em relação à gengivite. A contagem das células triptase+ foi maior do que c-kit+ em ambos os grupos. Os mastócitos c-kit+ permaneceram constantes, independente do grau de infamação, indicando que não houve um aumento na migração de mastócitos para as áreas com inflamação.

Assim como nos estudos com histoquímica, os estudos que utilizaram como meio de avaliação dos mastócitos a imunohistoquímica, apresentaram resultados diferentes. Além disto, quando os mesmos anticorpos são utilizados, existem diferenças nas metodologias quanto à classificação da doença, comparação de formas distintas de doenças periodontais e tratamento apenas nos casos com periodontite. Estes fatores podem provavelmente ocasionar grandes diferenças nos resultados reportados.

2.4 As células de Langerhans e células dendríticas

Origem e função

Paul Langerhans, um estudante de medicina interessado na anatomia de nervos da pele, no ano de 1868, descreveu uma população celular de forma dendrítica localizada no epitélio escamoso da epiderme e na lâmina própria do tecido conjuntivo subjacente. Por quase cem anos, a identidade e função destas células eram desconhecidas, Silberberg (1978) relatou sua importância como o mais periférico componente do sistema imune. Sua função primordial é de iniciar a resposta imune, realizando a captura, processamento e apresentação do antígeno aos LT presentes nos linfonodos. Nos tecidos periféricos humanos três subgrupos são observados: células de Langerhans (CL) presentes na camada basal e supra basal do epitélio, células dendríticas (CD) presentes na derme e órgãos como rins, pulmões e coração e células dendríticas linfóide/plasmocitóide presentes no sangue. Marcadores específicos para cada tipo celular foram descobertos para facilitar sua identificação, sendo: CD1a, Langerin/Lag, CCR6, E-cadherin e S100 para células de Langerhans; DC-SIGN, fator XIIIa, CD11b para células dendríticas e CD11c, CD123 para células dendríticas linfóide/plasmocitóide (CUTLER & JOTWANI, 2004).

As células dendríticas são de origem mielóide e derivadas da linhagem monocítica. Alguns estudos revelaram evidências de que estas possuem a habilidade de divisão enquanto residem no epitélio (GIACOMETTI & MONTAGNA,1967; MACKENZIE,1975). Apresentam diferentes morfologias, fenótipos e funções, dependendo do estágio de sua maturação. No sangue são idênticas a monócitos, porém, no tecido conjuntivo assumem uma forma mais estrelada e quando ativadas, após a captura e processamento de antígenos, tornam-se ainda mais estrelados e com prolongamentos (CUTLER & JOTWANI, 2004).

As células dendríticas são eficientes estimuladores de LT e LB. Enquanto os linfócitos B podem reconhecer antígenos através de seus receptores e iniciar a produção de anticorpos, os LT necessitam que o antígeno seja processado e apresentado a ele. Os receptores de antígeno das células T (TCRs) reconhecem fragmentos de antígenos ligados à molécula com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presente na superfície das células apresentadoras de antígeno. Existem dois tipos de MHC, moléculas da classe I, presente em quase todas as células nucleadas, as quais apresentam antígeno aos LT CD8+; e moléculas da classe II, encontradas nas células dendríticas, linfócitos B e macrófagos, que são responsáveis pela apresentação de antígenos aos LT CD4+ presentes nos linfonodos iniciando a resposta imune antígeno específica. Células infectadas ou tumorais freqüentemente produzem citocinas inflamatórias como o interferon, que estimulam outras células do sistema imune, a aumentarem a expressão das moléculas de MHC nas células dendríticas (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Na gengiva, as células de Langerhans estão presentes em três localizações: epitélio bucal, epitélio sulcular e epitélio juncional; localizando-se na camada supra-basal e espinhosa. No epitélio juncional são observados dois tipos celulares, um com morfologia esférica e poucos prolongamentos e outro tipo com prolongamentos de tamanhos e

quantidade moderadas. Estas diferenças podem estar relacionadas com diferentes estágios de maturação destas células (LOMBARDI et al. 1993).

2.5 As células dendríticas na doença periodontal

Muitos estudos experimentais têm demonstrado evidências de diferenças no número de células dendríticas e na expressão de antígenos de superfície quando comparam-se gengivite, periodontite e gengiva clinicamente saudável (NEWCOMB & POWELL, 1986; JOTWANI et al. 2001, CURY et al., 2008) . Por este motivo, há uma maior necessidade de investigação das células dendríticas, que podem representar uma célula chave na patogênese e desenvolvimento da doença periodontal.

Em um estudo eticamente controverso, Newcomb et al. (1982) avaliaram biópsias gengivais de quatro estudantes de odontologia que se submeteram a um intensivo controle de placa e conseqüentemente com tecidos periodontais saudáveis. No início da pesquisa foi suspenso qualquer tipo de controle de placa por três semanas e fragmentos gengivais removidos nos tempos 0, 8 e 21 dias, quando foi retomada a escovação. A marcação para células de Langerhans foi realizada com a técnica da adenosina trifosfatase. Observou-se um aumento estatisticamente significativo de CL no epitélio bucal com o aumento da inflamação (tempo 0) até o oitavo dia. Este nível manteve-se sem alteração até o 21º dia.

Newcomb e Powell (1986) avaliaram a presença de células de Langerhans em indivíduos com gengiva saudável e periodontite moderada através de imunoistoquímica (HLA-DR) e de imunofluorescência (OKT6). No tecido saudável as CL foram observadas tanto no epitélio bucal como no do sulco, localizadas geralmente na camada basal do epitélio. Entretanto, não foram observadas no epitélio juncional. Na periodontite foi observado um aumento em ambos os epitélios com maior presença celular na camada

espinhosa, ocorrendo um aumento na expressão dos receptores HLA-DR. Algumas células eram pequenas e redondas enquanto outras mantinham sua característica de dendritos. Mais células marcadas foram observadas com o OKT6.

Saglie et al. (1987) avaliaram a presença de CL em tecido gengival inflamado e não inflamado de seis indivíduos. Os autores utilizaram o marcador anti-Leu-6 e também realizaram uma marcação com a técnica da peroxidase (PAP) para *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* e *Bacteróides gingivalis*. Houve um aumento estatisticamente significativo no número de CL entre o tecido sadio e o inflamado, o local de maior concentração celular foi na camada espinhosa, mas também foram observadas células no tecido conjuntivo adjacente. Estas células eram realmente CL devido ao anticorpo específico usado (ATPase + e 5¹-nucleotidase) que não marca macrófago. O número de bactérias foi maior no tecido inflamado que continha também grande número de CL. Estes resultados sugerem que este aumento das CL pode ser um dos mecanismos de defesa contra a invasão bacteriana.

Um estudo de imunofluorescência duplo demonstrou uma associação entre *Porphyromonas gingivalis* e CL CD1a⁺ imaturas no epitélio de cortes gengivais de indivíduos com periodontite. As CL CD1a⁺ imaturas eram limitadas ao epitélio, enquanto que as CD maduras estavam restritas ao tecido conjuntivo. A diferença entre imaturas e maduras se dá devido à expressão de moléculas de captura e adesão a antígenos nas imaturas e sua baixa expressão nas maduras. Isto sugere que CD imaturas poderiam estar expostas ao *P. gingivalis*, resultando em sua ativação/maturação e movimentando-as para dentro do tecido conjuntivo (CUTLER et al., 1999).

Séguier et al. (2000a) realizaram um estudo utilizando técnicas imuno-histológicas e morfométricas em amostras de indivíduos saudáveis (n= 10), com gengivite (n= 8) e com periodontite (n= 9), para avaliar linfócitos intra-epiteliais e CL. Os tipos celulares avaliados foram: CD1a⁺ (CL), CD45RB (linfócitos), CD3 (LT), CD20(LB) e a área ocupada

por fibras colágenas. Observou-se que em relação ao grupo controle, todas as células inflamatórias estavam aumentadas na gengivite e na periodontite. Houve um significativo aumento de LT citolíticos na periodontite quando comparado com gengivite ($p < 0,05$). Foi observada também uma diminuição das células de Langerhans na gengivite e na periodontite quando comparado com gengiva saudável ($p < 0,02$ e $p < 0,001$; respectivamente) e não houve diferença entre os grupos gengivite e periodontite. Finalmente, observou-se uma correlação positiva de CL com linfócitos CD45RB e CD3 na gengivite.

Seguier et al. (2000b) avaliaram morfológicamente CL CD1a+ no epitélio gengival de indivíduos saudáveis, com gengivite e com periodontite. No grupo controle, as CL mostravam-se bem delimitadas com presença dos dendritos, quando a comparação foi feita com células na presença de gengivite e de periodontite, observou-se uma diminuição do tamanho celular e do número dos dendritos principalmente na periodontite. Na camada basal foram observadas células mais arredondadas e com poucos dendritos.

Em um estudo que avalia CL e CD, Jotwani et al. (2001) utilizaram a técnica de imunistoquímica e os seguintes anticorpos: CD1a (CL) e CD83 (CD) em amostras de oito indivíduos saudáveis, sete com gengivite e 14 com periodontite. Um significativo aumento foi observado na presença de periodontite quando comparado com a gengiva saudável com ambas as células estudadas, CL e CD ($p < 0,05$), o mesmo não foi observado com a gengivite.

Cirrincione et al. (2002) avaliaram CL no epitélio e CD na lâmina própria de indivíduos com periodontite crônica e a expressão de marcadores de superfície em contato com linfócitos. Foram utilizadas 10 biópsias de indivíduos com periodontite crônica. As CL foram observadas em todo o epitélio bucal, porém no epitélio da bolsa estavam em quantidade muito menor e normalmente não expressavam MHC-II, nem faziam contato com linfócitos. Na contagem por $0,1 \text{ mm}^2$ observou-se: epitélio bucal ($38 \pm$

2 mm²), sulcular (16 ± 5 mm²) da bolsa (5 ± 1 mm²) (p < 0,05). Já na lâmina própria da região da bolsa, as CD estavam em maior número do que na região bucal, expressando MHC-II, relacionando-se com linfócitos e próximas à plasmócitos. Os autores concluíram que a presença das células dendríticas é indispensável para a existência da resposta imune mediada por LT na periodontite crônica, porém esta resposta parece estar limitada à lâmina própria.

Jotwani & Cutler (2003) através da técnica de imunofluorescência, analisaram células de Langerhans e células dendríticas de indivíduos com periodontite (n= 7) e clinicamente saudáveis (n= 5), utilizando os anticorpos DC-SIGN e CD1a. A dupla marcação deixou claro que existem dois tipos celulares distintos: (1) no epitélio (CL); e (2) na lâmina própria (CD), que em sua grande maioria expressam o receptor manose. A análise dos dados revelou um aumento significativo das CD na periodontite comparado com a gengivite (p=0,019). Uma associação entre CD e LT CD4+ foi observada na lâmina própria, sugerindo uma maior apresentação de antígenos na periodontite crônica.

Em outro estudo utilizando dois marcadores, neste caso fator XIIIa (CD) e CD1a (CL), Cury et al. (2008) observaram um maior número de células fator XIIIa+ e CD1a+ na lâmina própria e no epitélio gengival externo do grupo gengivite em comparação ao grupo com periodontite. Já na região do epitélio do sulco e de sua lâmina própria, a contagem das CD e CL foi similar na gengivite e periodontite. Este achado mostra que existe uma resposta imune diferenciada na gengivite e na periodontite.

Confirmando o fato de que existem sub-populações distintas de células dendríticas, Dereka et al. (2004) avaliaram a presença de CD XIIIa positivas e CL positivas para proteína S-100 no epitélio gengival e tecido conjuntivo de bolsas periodontais, antes e após terapia periodontal de raspagem subgengival. Os resultados revelaram que o número de CD Fator XIIIa positivas diminuiu comparado com o controle após a remoção de placa e tártaro, instrução de higiene bucal e raspagem e alisamento

radicular em bolsas periodontais de 4-5mm, mas não em bolsas com de mais de 6mm de profundidade. De modo inverso, a contagem de CL positivas para proteína S-100 diminuiu após tratamento periodontal em bolsas com mais de 6mm, porém aumentou nas bolsas com PS entre 4-5mm ($p < 0,05$), já no tecido conjuntivo houve uma diminuição após higiene bucal e raspagem supra e aumento após RAR, no entanto, sem diferença estatística. Estes resultados podem refletir uma tendência para redução destas duas subpopulações distintas de CD após terapia periodontal não-cirúrgica.

Zavala & Cavicchia (2006) avaliaram as mudanças relacionadas com as CL no epitélio gengival com a idade nos seguintes aspectos: morfologia, densidade e distribuição intra-epitelial. Em concordância com estudos anteriores, encontraram uma diminuição da densidade de CL com a idade no epitélio gengival humano. Os autores observaram que em indivíduos jovens a maioria das CLs estavam localizadas na camada supra-basal (estrato espinhoso), já nos indivíduos idosos as CL apareceram com maior frequência na camada espinhosa. De acordo com a localização específica das CLs no epitélio pode se supor que sua habilidade de imuno vigilância é menos ativa em pessoas idosas. Nenhuma diferença entre gêneros foi observada. As células dendríticas positivas para CD1a foram observadas no epitélio gengival e nenhuma célula foi encontrada no tecido conjuntivo.

2.6 Inter-relação entre células dendríticas e o HIV

As CD expressam vários receptores de superfície, entre eles CD4, CCRs e CLR. No entanto, esta expressão é alterada quantitativa e qualitativamente dependendo do estágio de ativação celular. Estes receptores estão relacionados com funções usuais como captura de antígenos, migração, interação com LT e também atuam com destaque nas interações com o vírus HIV. É a expressão destes receptores que irá determinar qual

célula irá entrar em contato com a partícula viral, processá-la e posteriormente transmiti-la aos LT (TELESHOVA et al. 2003).

As células dendríticas são responsáveis pela transmissão dos vírus aos LT de duas maneiras: inicialmente, células imaturas e maduras capturam, processam e transmitem ao LT CD4+, sem serem contaminadas; segundo, após um declínio da primeira fase, ocorre uma amplificação dos receptores virais R5, o que aumenta sua ligação com células dendríticas imaturas ocorrendo nova contaminação dos linfócitos por partículas virais recém sintetizadas (TELESHOVA et al. 2003).

A ligação entre partículas virais e o receptor CD4 das células dendríticas pode levar a uma queda em sua contagem, o que é uma consequência direta da injúria pelo HIV (Wood et al. 1983). Além disto, a seguinte alteração na morfologia das CL foi observada por Rappersberger et al. (1988): dendritos curtos e limite celular pouco delimitado. Este fato pode ser observado em cerca de 30% da população celular, que apresentavam também o citoplasma e a cromatina condensados, organelas citoplasmáticas dilatadas e alguns casos de citólise. Entretanto, nestas biópsias os queratinócitos e melanócitos apresentavam-se normais. Partículas virais estavam presentes nos espaços intercelulares das CL e adjacentes aos queratinócitos mas não entre eles.

Apesar da principal via de contaminação ser através das superfícies mucosas vaginal e anal, esta transmissão na mucosa bucal e suas secreções é incomum. Fluidos orais possuem vários fatores que protegem sua mucosa da infecção e reduzem o risco de transmissão. Entretanto, algumas substâncias do fluido seminal, sangue e proteínas sanguíneas podem proteger o vírus HIV-1 dos efeitos de defesa da saliva (Baron et al. 2000). Outro fator protetor seria a expressão ou não de alguns receptores de superfície do HIV-1, como CCR5, CXCR4, DC-SIGN e Langerin. A ausência de expressão do CCR5,

devido a uma mutação do gene, proporciona aos indivíduos portadores resistência à infecção pelo HIV (HUANG et al. 1996).

O risco de transmissão do HIV-1 é maior na relação sexual anal do que na vaginal, por que na região retal existe grande presença de células DC-SIGN+, CCR5+, CD4+. Além disto, as CD se distribuem na lâmina própria ao longo de todo epitélio, enquanto que na vagina a população de CD expressa moderado nível de DC-SIGN e baixo CCR5. Portanto, presume-se que a baixa expressão de receptores para o HIV-1 na mucosa bucal saudável atue como um fator de proteção à infecção nesta região (JAMESON et al. 2002).

A resistência ao HIV também pode ser mediada por proteínas antimicrobianas, as defensinas; sua atividade ocorre em dois níveis: diretamente na inativação de partículas virais e na inibição da replicação dos vírus na célula alvo LT CD4 (MACKEWICZ et al. 2003). Foi observado também que a β -defensina humana (BDH) 2 e 3, que são produzidas por células do epitélio bucal, podem bloquear a replicação viral interagindo diretamente com os vírions e também através da modulação do co-receptor CXCR4. São expressas na gengiva sadia e na maioria dos outros tecidos a sua expressão aumenta na inflamação (QUIMONES-MATEAU et al. 2003).

Jotwani et al. (2004) demonstraram que durante a inflamação gengival há um aumento de células que expressam CCR5, como as CL, e receptores para o HIV como CD4, DC-SIGN e MR. Observações similares foram reportadas na mucosa vaginal e retal inflamada. A inflamação destas mucosas têm sido considerada como um fator de risco para infecção ao HIV por algumas razões incluindo o fato da ulceração eliminar o efeito da barreira epitelial intacta e expor grande quantidade de células que expressam o receptor viral. Estudos em mulheres demonstraram que a inflamação vaginal aumenta a expressão de CCR5 nos LT, macrófagos e CD e isto mostra ser um fator chave determinante para suscetibilidade ao HIV (ZHANG et al. 1998). Jotwani et al. (2004) também concluíram que há um aumento significativo na presença de defensinas na periodontite, comparado com a

gingivite. Estas observações sugerem que o tecido gengival possui múltiplos fatores endógenos que propiciam uma resistência ao contágio do HIV, tanto no tecido clinicamente saudável como na presença de inflamação.

Menor contagem de CL no epitélio gengival na periodontite de indivíduos HIV-positivos comparado com HIV-negativos foi reportada por Myint et al. (2000). Neste estudo, os indivíduos HIV-positivos foram recrutados no período de 1992-1994, com baixas contagens de LT CD4+, e manifestações bucais como candidíase e leucoplasia. Além disto, utilizavam um anti retroviral: acyclovir ou zidevudine, mas não HAART.

Os achados com relação à quantificação de CD e CL são inconclusivos. Além disto, os estudos envolvendo indivíduos HIV-positivos são restritos. Observou-se também que vários foram os marcadores utilizados para a reação de imunoistoquímica. Neste estudo, optamos por utilizar o anticorpo anti S100 pelo fato que o mesmo marca células presentes no epitélio e na lâmina própria, desta forma, a partir de uma reação apenas poderemos avaliar a presença das CL em ambas as regiões.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar quantitativamente por meio da técnica de imunistoquímica os mastócitos e as células de Langerhans presente no tecido gengival acometido por gengivite e periodontite crônica moderada em indivíduos HIV-positivos e HIV- negativos.

3.2 Objetivos específicos

- Análise da densidade e da frequência dos mastócitos presentes no infiltrado inflamatório na periodontite crônica e na gengivite em indivíduos HIV-positivos e HIV- negativos.

- Comparar quantitativamente os mastócitos na mesma condição periodontal em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos.

- Correlacionar os mastócitos presentes no infiltrado inflamatório com os níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral, tanto na periodontite como na gengivite de indivíduos HIV-positivos.

- Analisar quantitativamente as células de Langerhans presentes no epitélio e na lâmina própria do tecido gengival acometido por gengivite e periodontite crônica em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos.

- Comparar quantitativamente as células de Langerhans na mesma condição periodontal nos indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos.

- Correlacionar as células de Langerhans presentes no epitélio e na lâmina própria com os níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral, tanto na periodontite como na gengivite de indivíduos HIV-positivos.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO I

**AVALIAÇÃO DE MASTÓCITOS NA GENGIVITE E PERIODONTITE EM INDIVÍDUOS
HIV-NEGATIVOS E HIV-POSITIVOS USUÁRIOS DE HAART**

Resumo

Este estudo transversal teve como objetivo avaliar quantitativamente e comparar a densidade e a frequência de mastócitos no tecido gengival de indivíduos HIV-negativos e HIV-positivos, com doença periodontal por meio de dois anticorpos anti c-kit e anti triptase. Adicionalmente, foi avaliada a correlação entre a densidade e a frequência destes mastócitos com níveis sanguíneos de LT CD4, CD8 e carga viral, nos indivíduos HIV-positivos. Todos os indivíduos HIV-positivos eram usuários de terapia ativa anti retroviral (HAART). A amostra constou de biópsias de 50 indivíduos, divididos em quatro grupos: 1) 15 indivíduos com periodontite crônica moderada (PCM) HIV-negativos, 2) 15 indivíduos PCM HIV-positivos, 3) 10 indivíduos com gengivite HIV-negativos e 4) 10 indivíduos HIV-positivos com gengivite. Os tecidos gengivais foram obtidos durante cirurgia a retalho de Widman Modificado nos casos de periodontite e nos casos de gengivite durante exodontias. Os resultados foram expressos em cada grupo pela média e desvio padrão do número de células por mm² e em porcentagem da frequência de mastócitos no número total de células mononucleares do infiltrado inflamatório. Os grupos foram comparados utilizando o teste *t-student* e a correlação de Pearson quando adequado. Não houve diferença na densidade e frequência de mastócitos entre os indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos. Observou-se uma diminuição de mastócitos triptase+ com o aumento da inflamação tanto na gengivite como na periodontite em ambos os grupos, no entanto, nos mastócitos c-kit+, verificou-se uma diminuição com o aumento da inflamação apenas entre os casos de gengivite HIV-negativos. A quantificação de mastócitos na gengivite ou na periodontite em indivíduos HIV-positivos usuários de HAART não diferiu de indivíduos HIV-negativos. A menor frequência de mastócitos triptase+ em relação ao aumento da inflamação sugere uma maior participação dos mastócitos na resposta do tipo Th1.

Palavras chave: gengivite, periodontite, mastócitos, HIV, resposta imune.

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada por bactérias e seus metabólitos presentes no biofilme dental. Estudos mostraram que o dano tecidual real é causado pela própria resposta imune do hospedeiro, que pode estar alterada por fatores de risco como a genética, fumo, estresse e doenças sistêmicas (Beck et al. 1990). A avaliação da composição do infiltrado inflamatório e de sua relação com a gravidade da doença periodontal tem sido uma abordagem utilizada pelos pesquisadores que desejam entender o processo inflamatório periodontal (Çelenligil et al. 1990; Lappin et al. 1999).

Análises imunoistoquímicas caracterizando os leucócitos presentes em tecidos periodontais e revelaram que na gengivite há a predominância de células da resposta celular (Th1) e na periodontite da resposta humoral (Th2) (Berglundh et al. 2002). Gemmell e Seymour (1995) mostraram um aumento na proporção de células T com um aumento do infiltrado inflamatório na gengivite em relação ao tecido saudável. Outros estudos caracterizaram de forma bem distinta as citocinas envolvidas nos diferentes estágios da doença (Ukai et al. 2001; Gustafsson et al. 2006). Tanto a resposta Th1 como a Th2 é iniciada e organizada por um importante tipo celular, o linfócito T (LT) CD4+, que a partir da expressão de suas citocinas influenciará uma resposta tipo Th1 ou Th2 (Reinhardt et al. 1988; Yamazaki et al. 1993; Lappin et al. 1999, Gemmell e Seymour 2004).

A infecção pelo HIV, destrói os LT CD4+, macrófagos e células dendríticas (Yin et al. 2007). A diminuição de LT CD4+ resulta em uma resposta imune alterada com redução da sua especificidade e ativação anormal de linfócitos B (Shirai et al. 1992). Estudos recentes não indicaram uma maior destruição periodontal em indivíduos HIV-positivos (HIV+) sob uso de HAART (Robinson et al. 2000; Hofer et al. 2002; Gonçalves et al. 2005, Yin et al. 2007). Entretanto, alterações como maior dispersão dos linfócitos B (Myint et al. 1999), aumento do número de mastócitos, neutrófilos e macrófagos (Myint et al. 2002),

maior presença de metaloproteinases de matriz degranuladas por mastócitos (Næsse et al. 2003) sugerem que a resposta imune na doença periodontal sofre alterações em indivíduos HIV-positivos.

Os mastócitos também estão presentes em infiltrados inflamatórios. Este tipo celular por sua vez, está envolvido em várias atividades na resposta inflamatória como: produção de aminas vaso ativas como a histamina; liberação de prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF); apresentação de antígenos através do MHC de classe I e II; fagocitose; produção de citocinas tanto da resposta Th1 como Th2, que podem atuar em monócitos, LT CD4+ e CD8+ e linfócitos B (Næsse et al. 2003, Walsh 2003, Steinsvoll et al. 2004). A contribuição real dos mastócitos na progressão da doença periodontal ainda apresenta relatos divergentes e inconclusivos pois alguns estudos relatam um aumento no número destas células por mm² com o aumento da inflamação na periodontite em relação à gengivite (Günham et al. 1991; Batista et al. 2005) e outro uma diminuição na periodontite em relação à gengivite (Gemmell et al., 2004).

Adicionalmente, são escassos os relatos da participação dos mastócitos na complexa etiopatogenia da doença periodontal em indivíduos HIV-positivos. Em um estudo comparativo entre indivíduos HIV-positivos e negativos, Myint et al. (2002) observaram um grande aumento na contagem de mastócitos em indivíduos com periodontite e HIV-positivos, sendo este aumento mais expressivo quando o indivíduo apresentava alguma outra manifestação bucal como candidíase ou eritema linear.

Para a realização de uma análise histoquímica o marcador mais utilizado para mastócito é o azul de toluidina. Entretanto, apesar da grande simplicidade da técnica, é sabido que o marcador não possui alta especificidade (Robson & De Marco 1972, Aeschlimann et al. 1980, Günhan et al.1991). Na análise imunoistoquímica um dos principais marcadores é a triptase, que é um anticorpo anti triptase presente nos grânulos

de mastócitos e basófilos (Kennett et al. 1993, Batista et al. 2005). Outro marcador é o anti CD117, c-kit, que é um receptor trans-membrana da tirosina quinase, presente em outras células do pulmão, cérebro e pele. A função do CD117 é promover a proliferação e maturação dos mastócitos, também é necessário para a ligação com fibroblastos através de seu ligante, o fator de células primordiais, que induz também sua adesão e quimiotaxia (Mekori et al. 1997, kitamura et al. 2000). Neste estudo, optou-se pela utilização do anticorpo anti triptase, para avaliar os mastócitos ativados, presentes no tecido e também do anti c-kit, que avalia a migração destas células ainda imaturas para o tecido inflamado (Gemmell et al. 2004).

Estudos na literatura quantificaram mastócitos em sítios com gengivite e periodontite em indivíduos HIV-negativos e HIV-positivos e demonstraram resultados diferentes (Günham et al. 1991; Myint et al. 2002; Gemmell et al., 2004; Batista et al. 2005). Além disto, alguns estudos abordaram indivíduos HIV-positivos sintomáticos não tratados com HAART. Como nos indivíduos HIV-positivos usuários de HAART a doença periodontal possui as mesmas características clínicas de gravidade e progressão do que nos indivíduos HIV-negativos (Hofer et al. 2002), o presente estudo foi proposto para verificar se esta hipótese de igualdade pode ser verificada também na resposta imune, em relação à presença dos mastócitos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar e comparar a densidade e a frequência de mastócitos presentes em amostras de tecidos com gengivite ou periodontite removidas de indivíduos HIV-negativos e HIV-positivos sob uso de HAART. Adicionalmente, buscou-se correlacionar a densidade e a frequência dos mastócitos com níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral.

Material e métodos

Inicialmente foram avaliadas 47 biópsias de indivíduos HIV-positivos e 65 de HIV-negativos com doença periodontal. Após processamento e confecção de lâmina fixadas em hematoxilina e eosina (H.E.) verificou-se a presença das seguintes estruturas teciduais: epitélio do sulco, epitélio gengival externo, e lâmina própria. Deste total, 25 amostras de tecido gengival foram removidas de indivíduos HIV-positivos e 25 de HIV-negativos que apresentaram tais estruturas em boas condições e incluídos no estudo.

Esta amostra de 50 indivíduos foi composta por dois grupos, grupo teste (HIV-positivos) e controle (HIV-negativos); cada grupo foi dividido em dois subgrupos com periodontite crônica moderada (PCM) ou gengivite (G). A composição dos grupos foi assim determinada: grupo HIV+G (n=10); HIV+PC (n=15); HIV-G (n=10) e HIV-PC (n=15). Foram incluídos no estudo indivíduos entre 18-55 anos, de ambos os gêneros. Para a definição da condição periodontal foram utilizados os seguintes critérios:

- Gengivite – Sangramento à sondagem > 25% dos sítios presentes (López et al. 2005).
- Periodontite Crônica Moderada – Foram considerados conjuntamente os seguintes critérios, definição de caso: presença de perda de inserção clínica (PIC) proximal \geq 3mm em pelo menos dois dentes não adjacentes (Tonetti & Claffey, 2005). Definição de gravidade: forma moderada, presença de sítios com profundidade de sondagem (PS) até 6 mm e perda de inserção clínica < 4 mm (AAP, 2000).

Os indivíduos HIV-positivos foram recrutados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infectoparasitárias Orestes Diniz (CTR/DIP) da Prefeitura de Belo Horizonte (PBH); e os indivíduos HIV- do Curso de Especialização em Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), Belo Horizonte, Brasil, no período de março a dezembro de 2007. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram esclarecidos da não maleficência do tratamento e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG, parecer nº. ETIC 514/07.

Todos os indivíduos HIV-negativos foram encaminhados ao Centro de Testagem Anônima PBH, para confirmação da soronegatividade.

Foram excluídos do estudo indivíduos com alterações sistêmicas como hipertensão, diabetes não controlada, trombocitopenia e outras que contra-indicassem naquele momento o tratamento periodontal.

Os indivíduos com periodontite foram submetidos à terapia inicial com raspagem e alisamento radicular, controle de placa e orientação para a técnica de escovação. Após o término do tratamento, os indivíduos foram reavaliados decorrido um intervalo de 45 a 60 dias. As coletas de tecido gengival foram realizadas nas seguintes condições: (1) Grupos com Periodontite: nos casos de persistência de sítios com profundidade de sondagem alterada ($PS > 5$ mm) e presença de sangramento e/ou supuração, foi realizado uma cirurgia à retalho de Widman Modificado. (2) Grupos com gengivite: o fragmento gengival foi removido durante exodontia, indicada por indicação protética ou ortodôntica.

Nos indivíduos HIV-positivos, dados do prontuário médico foram coletados para informar os níveis sanguíneos dos LT CD4+, CD8+ e a carga viral, estes dados deveriam ter no máximo dois meses, caso este período fosse maior, um novo hemograma era solicitado.

Os fragmentos de tecido gengival removidos foram fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente seguiam para o processamento. Cortes de 5 μ m de espessura foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H.E.), para visualização da anatomia tecidual. Foram incluídos casos onde era possível observar o epitélio gengival externo, epitélio do sulco e lamina própria. Confirmada a presença destas estruturas, foram realizados cortes de 3 μ m e montados em lâminas gelatinizadas. Uma amostra representativa exibindo as estruturas teciduais necessárias para inclusão e análise no estudo pode ser observada na figura 1.

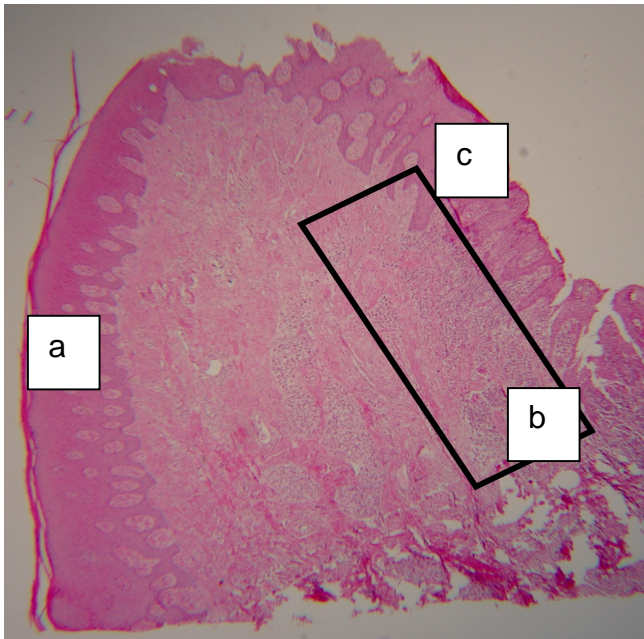


Figura 1- Corte histológico de tecido gengival de indivíduo com doença periodontal. Em destaque marcação da região do infiltrado inflamatório presente na lâmina própria onde foi realizada a contagem dos mastócitos. Estruturas necessárias para inclusão no estudo: a) epitélio gengival externo, b) lâmina própria, c) epitélio do sulco (HE – aumento 20x).

Imunoistoquímica

Foram utilizados dois anticorpos primários, anti c-kit e também anti triptase (TAB. 1).

Tabela 1- Anticorpos primários, fabricantes, método de recuperação antigênica e diluição.

Anticorpo	Fabricante	Recuperação antigênica	Diluição
c-kit Anti- CD 117 (A 4502)	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA	panela de pressão (Mantra) ácido cítrico pH 6 121°C, 10 minutos	1:300
triptase (clone G3)	CellMarque Hot Springs, AR, USA	não há	1:2000

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol e reidratados em banhos decrescentes de etanol. Para remoção do pigmento formol, foram imersas por dez

minutos em solução de Hidróxido de amônio 10% em etanol 95% e lavadas em cinco banhos com água destilada. Quando necessário, foi realizada a recuperação antigênica segundo padronização (TAB. 1). Seguiu-se então bloqueio da peroxidase endógena utilizando 2 banhos de 5 minutos de peróxido de hidrogênio 20 volumes e metanol (1:1), seguidos de 5 banhos de água destilada e 3 de TRIS-HCL 20 mM. Posteriormente, procedeu-se uma incubação em três banhos em solução tampão de TRIS-HCL pH-7.4 (tris-hidroxi-metil-aminometano) por 15 minutos. Os cortes foram incubados em anticorpo primário à temperatura ambiente por 18 horas. Desincubou-se realizando três banhos de TRIS-HCL. Foi realizado então a incubação no anticorpo secundário e no complexo terciário pertencentes ao kit LSAB®+ System-HRP (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos. Desincubou-se lavando com três banhos de TRIS-HCL. A revelação da reação foi executada com a solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Seguiu então os banhos em água destilada. A contra coloração foi feita com solução Hematoxilina de Mayer's durante 1 minuto, um banho com solução aquosa de Hidróxido de amônio 10%, sendo imediatamente lavadas em cinco banhos de água destilada. Por fim, realizou-se a desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes, diafanização em xilol e montagem das lâminas em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

Análise quantitativa e estatística

A análise da densidade dos mastócitos c-kit+ e triptase+ foi realizada por um examinador treinado, no infiltrado inflamatório subjacente ao epitélio do sulco. O número de campos variou 8 a 16 nos grupos com periodontite e de 6 e 8 nos grupos com gengivite. A contagem foi feita utilizando um microscópio Carl Zeiss, com um aumento de 400x, com retículo de integração da mesma marca, com área de 0,1024 mm². Foi realizada a somatória dos mastócitos por campo, posteriormente por lâmina e encontrado

a densidade por mm². A calibração do examinador foi realizada pela re-leitura das contagens de células de 10 indivíduos com intervalo de 15 dias. Para estabelecer a concordância intra examinador, todos os escores do teste *Kappa* não ponderado foram maiores que 0,90.

Para observar a frequência dos mastócitos triptase+ e c-kit+, inicialmente foi realizada a contagem de todas as células inflamatórias mononucleares do infiltrado inflamatório. Foram contados 6 campos na gengivite e 8 na periodontite. A contagem foi feita no mesmo microscópio acoplado a uma máquina fotográfica (Canon A640) com aumento de 560x. Cada campo foi fotografado e posteriormente quantificado através do programa Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas). O infiltrado foi classificado em discreto, moderado e intenso, de acordo com o número de células inflamatórias presentes tanto na gengivite como na periodontite. Posteriormente foi realizada a contagem dos mastócitos presente no infiltrado inflamatório e verificada sua frequência em relação ao número total de células. A análise de comparação entre os grupos foi realizada globalmente e também comparando grupos com a mesma condição periodontal segundo a intensidade do infiltrado.

Os resultados foram expressos em cada grupo pela média e desvio padrão do número de mastócitos por mm² e pela frequência. Foi realizada uma análise comparativa dentro dos grupos periodontite e gengivite HIV-positivos e HIV-negativos, tanto para o c-kit como para a triptase. Para identificar qual teste a ser usado foi verificada a homogeneidade e distribuição das variáveis. Deste modo, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* Student para comparação dos grupos e a presença de correlação foi verificada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (*r*). Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS for Windows 15.0 (Chicago, IL, USA), com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

O infiltrado inflamatório mononuclear foi maior nos grupos com periodontite ($1640 \pm 386,86$ cel/mm²) em relação aos grupos com gengivite ($569,75 \pm 404,03$ cel/mm²). Os mastócitos observados em tecidos com periodontite estavam presentes em maior número no infiltrado inflamatório profundo do sulco. Não foi observada a presença de mastócitos no epitélio. Pode-se observar uma relação dos mastócitos com vasos sanguíneos e também próximos a linfócitos (Fig. 2 A, B).

Clinicamente os grupos apresentaram-se homogêneos quanto à idade e gravidade de periodontite. No grupo HIV-positivos baixas cargas virais foram observadas (TAB. 2).

Tabela 2 – Variáveis de interesse e condição periodontal na amostra estudada.

	G /HIV-	G /HIV+	PCM /HIV-	PCM /HIV+
Nº de indivíduos	10	10	15	15
Idade	38 (34-50) ^a	38 (32-45) ^a	46 (40-60) ^a	42 (32-52) ^a
Gênero Masc.	3	7	7	8
Fem.	7	3	8	7
Nível sanguíneo de LT CD4+ cels/mm ³	ND	521 (117-1054) ^a	ND	450 (28-815) ^a
Nível sanguíneo de LT CD8+ cels/mm ³	ND	850 (267-1140) ^a	ND	1048 (406-1565) ^a
Carga viral	ND	20 (20-71671) ^a	ND	20 (20-321567) ^a
Índice de placa	0,94 ± 0,91 ^b	1,69 ± 0,83 ^b	1,05 ± 0,29 ^b	1,35 ± 0,65 ^b
% sítios PS ≤ 3 mm	ND	ND	85	91,4
% sítios PS ≥4 ≤ 6 mm	ND	ND	8,2	6,0
% sítios PS ≥7 mm	ND	ND	6,8	2,6
% sítios PIC < 3 mm	ND	ND	85,1	81,4
% sítios PIC ≥3 mm	ND	ND	14,9	18,6

^a : mediana; ^b : média e desvio padrão; ND: não determinado

PS: profundidade de sondagem; PIC: perda de inserção clínica

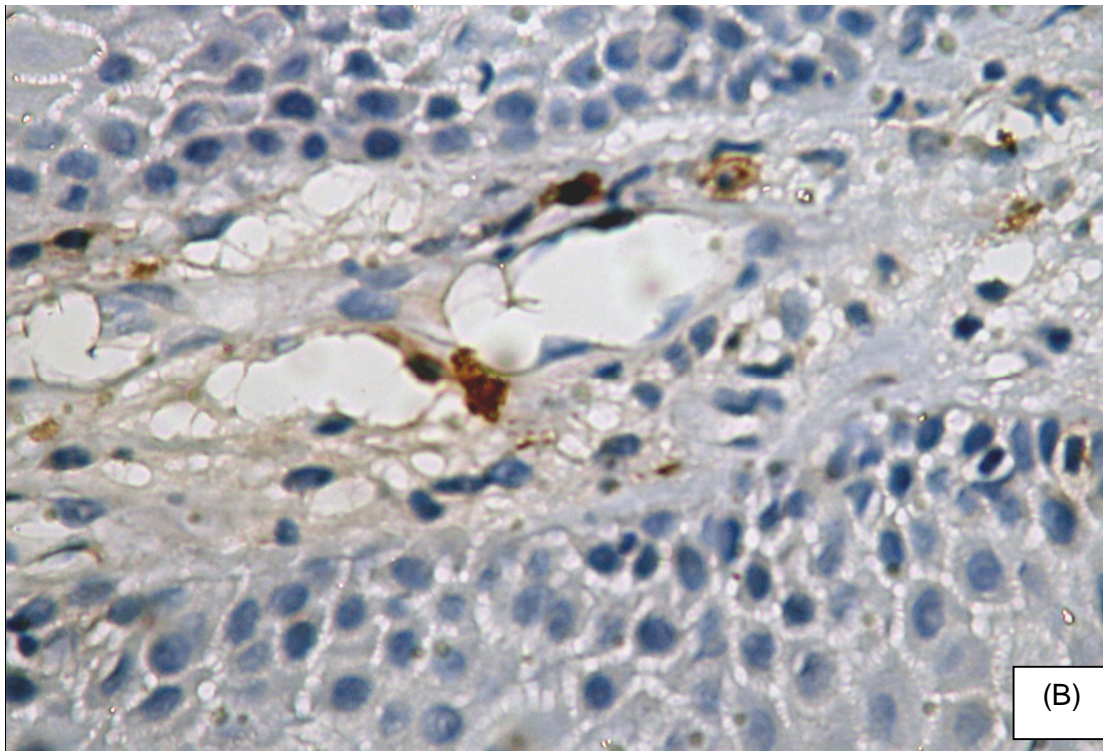
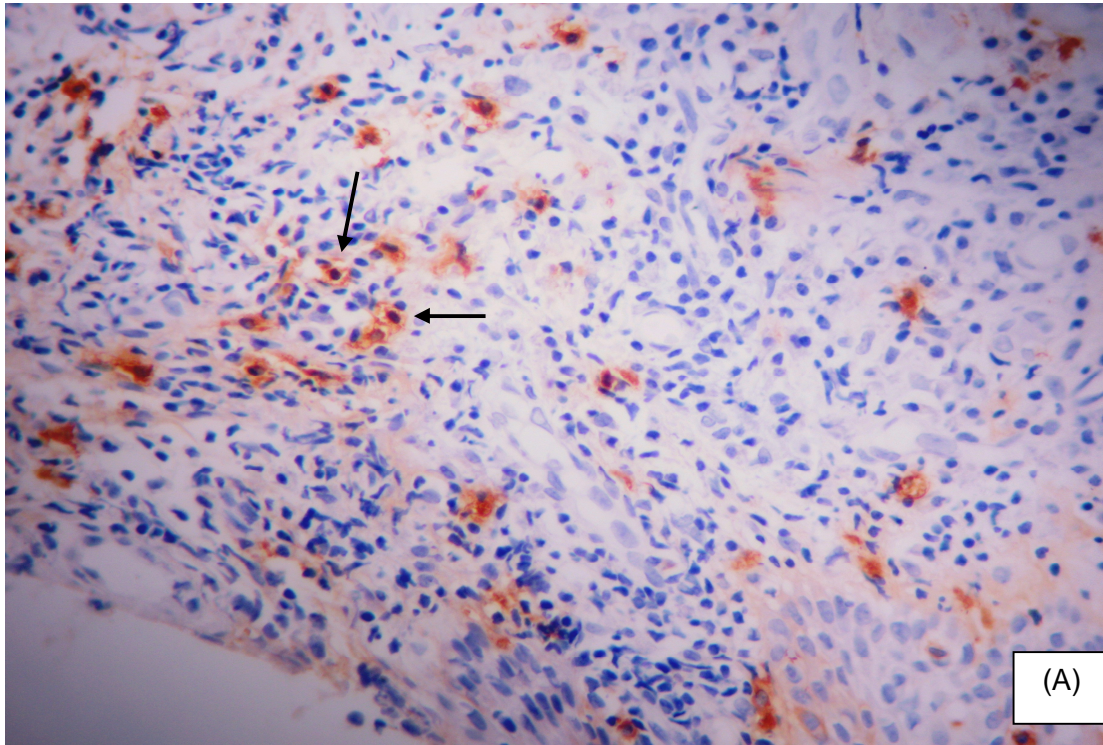


Figura 2 – Cortes histológicos de tecido gengival de indivíduo com periodontite. (A) Mastócitos triptase+ no tecido conjuntivo adjacente ao epitélio do sulco gengival em contato com células inflamatórias. (B) Mastócitos c-kit+ próximos a vasos sanguíneos (Streptavidina-Biotina - aumento 400x e 560x respectivamente).

Análise da densidade de mastócitos triptase+ e c-kit+

Na comparação das densidades dos mastócitos triptase+ entre os grupos gengivite HIV-positivos e gengivite HIV-negativos não foi observada diferença estatisticamente significativa; assim como quando se comparou os grupos periodontite HIV-positivos e HIV-negativos (TAB. 3). Ao realizar a análise dos mastócitos c-kit+, também não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os grupos gengivite HIV-positivos e HIV-negativos e entre periodontite HIV-positivos e HIV-negativos (TAB. 3).

Tabela 3 – Mastócitos identificados segundo a condição periodontal.

Condição periodontal	Anticorpos	
	C-kit (cel/mm ²)	Triptase (cel/mm ²)
Gengivite HIV -	12,94 (± 26,95)	41,17 (± 18,30)
Gengivite HIV +	18,42 (± 10,55)	57,30 (± 16,76)
Periodontite HIV -	25,19 (± 21,09)	44,59 (± 18,14)
Periodontite HIV +	40,67 (± 27,80)	56,25 (± 21,85)

(t Student, p > 0,05); média (±).

Análise da frequência de mastócitos triptase+ e C-kit+

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência dos mastócitos triptase+ e c-kit+ entre os grupos gengivite HIV-positivos e HIV-negativos, assim como nos grupos periodontite HIV-positivos e HIV-negativos (TAB.4).

Tabela 4 - Frequência de mastócitos em relação ao número de células mononucleares presentes no infiltrado inflamatório.

Condição periodontal	Anticorpos					
	% triptase+			% c-kit +		
	Média	dp(±)	Mediana	Média	dp(±)	Mediana
Gengivite HIV –	19,67	17,68	15,36	10,24	7,31	9,23
Gengivite HIV +	19,19	16,23	13,36	7,09	5,26	4,74
Periodontite HIV -	4,23	2,31	3,35	2,63	1,60	2,39
Periodontite HIV +	5,67	4,49	3,96	2,85	1,51	1,98

(t Student, $p > 0,05$)

Análise da frequência de mastócitos triptase+ e c-kit+ por intensidade do infiltrado inflamatório

Gengivite

Ao analisar os grupos com gengivite comparados pela mesma intensidade do infiltrado, não foi observada nenhuma diferença na frequência dos mastócitos triptase+ e c-kit+ entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos. Quando comparamos a condição discreta com a intensa observou-se uma diminuição na frequência dos mastócitos triptase+ tanto no grupo HIV-positivos como no HIV-negativos ($p=0,0001$ e $p=0,01$ respectivamente). Para os mastócitos c-kit+, uma diminuição estatisticamente significativa foi observada somente no grupo HIV-negativos ($p=0,002$) (TAB.5).

Periodontite crônica moderada

Nos grupos com periodontite, também não foi observada nenhuma diferença na frequência de mastócitos triptase+ e c-kit+ entre indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos, quando comparados pela mesma intensidade do infiltrado. Quando foi realizada uma comparação em relação ao aumento da inflamação (condição discreta para intensa)

verificou-se uma diminuição na frequência dos mastócitos triptase+ tanto no grupo HIV-positivos como no HIV-negativos ($p=0,001$ e $p=0,003$ respectivamente). Também não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência dos mastócitos c-kit+ com o aumento da inflamação (TAB.5).

Tabela 5 - Caracterização da distribuição da frequência de mastócitos segundo sua condição periodontal e intensidade do infiltrado inflamatório.

	Intensidade do infiltrado	Nº de amostras	% mastócitos triptase+	% mastócitos c-kit+
GENGIVITE	discreto HIV-	2	47,03 ± 20,46 ^y	20,08 ± 3,81*
	discreto HIV+	2	47,56 ± 8,65 ^o	11,09 ± 10,56
	moderado HIV-	4	20,08 ± 5,80	11,68 ± 5,39
	moderado HIV+	3	17,50 ± 5,46	4,29 ± 1,28
	intenso HIV-	4	5,59 ± 1,18 ^y	3,88 ± 2,31*
	intenso HIV+	5	8,86 ± 4,60 ^o	7,17 ± 4,46
PERIODONTITE	discreto HIV-	2	7,65 ± 1,98 [‡]	2,07 ± 1,91
	discreto HIV+	2	14,84 ± 5,19 [†]	2,32 ± 0,81
	moderado HIV-	4	5,33 ± 2,05	3,80 ± 2,59
	moderado HIV+	7	5,56 ± 2,31	3,59 ± 1,78
	intenso HIV-	9	2,99 ± 1,44 [‡]	2,23 ± 0,76
	intenso HIV+	6	2,76 ± 0,91 [†]	2,16 ± 1,03

(t Student $p < 0,05$ ^y ^o [†] [‡])

Correlação entre mastócitos c-kit+ e triptase+ e níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral

Com a finalidade de avaliar a presença de correlação entre a densidade e a frequência de mastócitos c-kit+ e triptase+ e níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson, no entanto, não foram observadas correlações estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Discussão

Neste estudo a presença de mastócitos no infiltrado inflamatório foi quantificada pela densidade por mm² e pela frequência, em porcentagem do número total de células mononucleares. A maior parte dos estudos consultados utilizou como parâmetro de comparação a densidade (Aeschlimann et al.1980, Gemmell et al. 2004, Batista et al. 2005). No entanto, comparavam os grupos com gengiva saudável, gengivite e periodontite, sendo que, devido a questões éticas as amostras de periodontite foram tratadas previamente com raspagem subgengival (Aeschlimann et al.1980, Günham et al. 1991, Batista et al. 2005). Como as amostras com periodontite deste estudo também foram tratadas previamente, comparou-se somente a densidade dos mastócitos entre gengivite HIV-positivos e HIV-negativos e entre periodontite HIV-positivos e HIV-negativos, sem observar uma diferença significativa entre os grupos para ambos os anticorpos utilizados. Entretanto deve ser ressaltado que as biópsias no grupo periodontite foram coletadas em sítios que persistiam com atividade de doença e PS > 5mm, isto é, sítios periodontalmente doentes.

A comparação dos mastócitos pela frequência no infiltrado inflamatório entre os mesmos grupos e a mesma intensidade inflamatória, também não revelou diferenças entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos. Neste caso, porém, podemos afirmar que os mastócitos triptase+ diminuem com o aumento da inflamação (infiltrado discreto para intenso) tanto no grupo HIV-positivos como no HIV-negativos e que a sua migração permanece constante (mastócitos c-kit+ sem alteração) em ambos os grupos. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Gemmell et al. (2004), embora realizado apenas em indivíduos HIV-negativos, que observaram uma diminuição na contagem de mastócitos na periodontite em relação à gengivite e também uma ausência de alteração dos mastócitos c-kit+.

Em um estudo Myint et al. (2002), compararam periodontite em HIV-positivos e negativos, observando uma contagem 15 vezes maior de mastócitos nos indivíduos com

alguma manifestação bucal da AIDS como: candidíase, líquen plano e sarcoma de Kaposi. Gomez et al. (1997) observaram alteração na expressão de células Th2 (CD30) em indivíduos com gengivite HIV-positivos, relatando um aumento nos níveis de células CD30+ em indivíduos HIV-positivos em relação aos HIV-negativos. Myint et al. (1999) observaram alteração na distribuição de imunoglobulinas no infiltrado inflamatório de indivíduos com periodontite crônica HIV-positivos com maior número de células IgA+ e IgG+ adjacente a bolsa periodontal. Esta resposta imune alterada poderia ser a causa da maior gravidade da doença periodontal nos indivíduos com algum sintoma da AIDS, já que estes estudos foram realizados nesta condição de doença. No entanto, em indivíduos HIV-positivos usuários da HAART, o nível de inserção clínica pode ser mantido, observando a presença dos mesmos fatores de risco associados ao HIV-, como: idade, tempo de fumante, carga viral, e presença de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella Intermédia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Robinson et al. 2000; Alpagot et al., 2003). Neste estudo, ao analisar a ausência de diferença na densidade e na frequência dos mastócitos entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos, pode-se relacioná-la com o sucesso da terapia anti retroviral atual. É importante ressaltar que todos os indivíduos HIV-positivos deste estudo eram usuários da HAART, sem qualquer tipo de alteração bucal, o que lhes proporcionaram baixa carga viral e altos níveis de LT CD4, conseqüentemente uma resposta imune satisfatória.

De acordo com estudo prévio (Gemmell et al., 2004), a diminuição dos mastócitos com o aumento da inflamação, pode estar relacionada com uma maior influência na resposta tipo Th1, com produção de histamina, TNF, IL-1, fagocitose e apresentação de antígenos, apesar de não ser a principal célula na apresentação de antígenos. Uma importante interação ocorre também entre mastócitos e LT, influenciando sua quimiotaxia, através da expressão de moléculas de adesão e pela degradação da matriz extracelular através de proteases. Adicionalmente, a produção de IL-6 e IL-8 são quimiotáticos para

LT CD4+ e CD8+ respectivamente (Moller et al., 1993). Esta função parece não estar alterada nos indivíduos HIV-positivos usuários de HAART, já que apresentam as densidades e frequências de mastócitos semelhantes, e que também não apresentam correlação entre os níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral. É importante salientar que o tratamento com a HAART está disponível no país desde 2001, sendo uma referência mundial no tratamento da AIDS. É responsável, inclusive, pela redução de putativos patógenos periodontais em seus usuários quando comparados com indivíduos HIV-negativos (Gonçalves et al. 2007).

Concluindo, a quantificação de mastócitos na gengivite ou na periodontite em indivíduos HIV-positivos usuários de HAART não difere de indivíduos HIV-negativos. A menor frequência de mastócitos triptase+ em relação ao aumento da inflamação sugere uma maior participação dos mastócitos na resposta tipo Th1. Adicionalmente, não houve correlação entre a densidade e a frequência dos mastócitos com níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral, porém, mais estudos devem ser realizados para verificação da alteração de alguma função dos mastócitos na inflamação periodontal em indivíduos HIV-positivos.

Agradecimentos

Este estudo foi suportado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), processo nº 301490/2007-4.

Referências Bibliográficas

1. Aeschlimann C.R., Kaminski E.J. & Robinson P.J. (1980). The effects of periodontal therapy on the mast cell population in gingival tissues. *Journal of Periodontology* **51**, 193-198.
-

2. Alpagot T., Font K. & Lee A. (2003). Longitudinal evaluation of GCF IFN- γ levels and periodontal status in HIV+ patients. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 944-948.
3. American Academy of Periodontology (2000). Parameter on Chronic Periodontitis With Slight to Moderate Loss of Periodontal Support. *Journal of Periodontology* **71**, 856-858.
4. Batista A.C., Rodini C.O. & Lara V.S. (2005). Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Diseases* **11**, 249-254.
5. Beck J.D., Koch G.G., Rozier R.G. & Tudor G.E. (1990) Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *Journal of Periodontology* **61**, 521-528.
6. Berglundh T., Liljenberg B., Lindhe J. (2002). Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 705-709.
7. Çelenligil H., Kansu E., Ruacan S., Eratalay K. & Çağlayan G. (1990) Immunohistological analysis of gingival lymphocytes in adult periodontitis . *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 542-548.
8. Gemmell E., Carter C.L. & Seymour G.J. (2004). Mast cells in human periodontal disease. *Journal of Dentistry Research* **83**, 384-387.
9. Gemmell E. & Seymour G.J. (1995). Gamma delta lymphocytes in human periodontal disease tissue. *Journal of Periodontology* **66**, 780-785.
10. Gemmell E. & Seymour G.J. (2004) Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000* **35**, 21-41.
11. Gomez R.S., Souza P.E., Costa J.E. & Araujo N.S. (1997). CD30+ lymphocytes in chronic gingivitis from HIV-positive patients:a pilot study.

Journal of Periodontology **68**, 881-884.

12. Gonçalves L.S., Ferreira S.M.S., Silva Jr. A., Villoria G.E., Costinha L.H. & Colombo A.P. (2005). Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: Clinical results. *Journal of Periodontology* **76**, 915-922.
13. Gonçalves L.S., Ferreira S.M.S., Souza C.O., Souto R., Colombo A.P. (2007). Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative brazilians with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **78**, 87-96.
14. Günhan M., Bostanci H., Günhan O. & Demiriz M. (1991). Mast cells in periodontal disease. *Annals of Dentistry* **50**, 25-29.
15. Gustafsson A., Ito H., Asman B. & Bergstrom K. (2006). Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 126-129.
16. Hofer D, Hämmerle CH, Grassi M & Lang N.P. (2002). Long-term results of supportive periodontal therapy in HIV-seropositive and HIV-seronegative patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 630-637
17. Kennett C.N., Cox S.W. & Eley B.M. (1993). Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell triptase in human gingival. *Journal of Periodontology* **64**, 870-877.
18. Kitamura Y., Morii E. & Jippo T. (2000) Mi-transcription factor as a regulator of mast cell differentiation. *International Journal of Hematology* **71**, 197-202.
19. Lopez N.J., Da Silva I., Ipinza J., Gutierrez J. (2005). Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-

- associated gingivitis. *Journal of Periodontology* **76**(suppl),2144-2153.
20. Mekori Y.A., Oh C.K., Dastyk J., Goff J.P., Adachi P.J., Worobec A., Semere T., Pierce J.H. & Metcalfe D.D. (1997). Characterization of a mast cell line that lacks the extracellular domain of membrane c-kit. *Immunology* **90**, 518-525
21. Myint M., Odden K., Schenck K., Halstensen T.S. & Schenck K. (1999). The gingival plasma cell infiltrate in HIV – positive patients with periodontitis is disorganized. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 358-365.
22. Myint M., Steinsvoll S., Yuan Z.N., Johne B., Helgeland K. & Schenck K. (2002). Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingival from patients with HIV infection. *AIDS* **16**, 235-243.
23. Moller A., Lippert U. & Lessmann D. (1993). Human mast cells produce IL-8. *Journal of Immunology* **151**, 3261-3266.
24. Næsse E.P., Schreurs O., Helgeland K., Schenck K. & Steinsvoll S. (2003). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without HIV-infection. *Journal of Periodontal Research* **38**, 575-582.
25. Reinhardt R.A., Bolton R.W., McDonald T., DuBois L.M. & Kaldahl W.B. (1988). Lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *Journal of Periodontology* **59**, 656-670.
26. Robinson P.G., Boulter A., Birnbaum W. & Johnson N.W. (2000). A controlled study of relative periodontal attachment loss in people with HIV infection. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 273-276.
27. Robson L.P. & De Marco T.J. (1972) Alteration of mast densities in experimentally inflamed human gingivae. *Journal of Periodontology* **43**, 614-622.
28. Shirai A., Cosentino M. & Leitman-Klinman S.F. (1992). Human

immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation *Journal of Clinical Investigation* **89**, 561-566.

29. Steinsvoll S, Helgeland K, Schenck K (2004). Mast cells – a role in periodontal disease? *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 413-419.
30. Tonetti M.S. & Claffey N. (2005). Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* suppl. **6**, 210-213.
31. Ukai T., Mori Y., Onoyama M. & Hara Y. (2001). Immunohistological study of interferon γ and interleukin 4 bearing cells in human periodontitis gingival. *Archives of Oral Biology* **46**, 901-908.
32. Walsh L.J. (2003). Mast cells and oral inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**, 188-198.
33. Yamazaki K., Nakajima T., Aoyagi T. & Hara K. (1993). Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* **28**, 324-334.
34. Yin M.T., Dobkin J.F. & Grbic J.T. (2007). Epidemiology, pathogenesis and management of human immunodeficiency virus infection in patients with periodontal disease. *Periodontology 2000* **44**, 55-81.

ARTIGO II

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE CÉLULAS DE LANGERHANS
NA GENGIVITE E PERIODONTITE EM INDIVÍDUOS HIV-NEGATIVOS E
HIV-POSITIVOS USUÁRIOS DE HAART**

Resumo

Este estudo transversal teve como objetivo avaliar e comparar quantitativamente a presença de células de Langerhans (CL) no tecido gengival de indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos com gengivite e periodontite. Além disto, avaliar a presença de correlação entre o número de CL com níveis sanguíneos de CD4, CD8 e carga viral nos indivíduos HIV-positivos, todos usuários de terapia ativa anti retroviral (HAART). A amostra constou de biópsias gengivais de 50 indivíduos, divididos em quatro grupos: 1) 15 indivíduos com periodontite crônica moderada (PCM) HIV-negativos, 2) 15 indivíduos com PCM HIV-positivos, 3) 10 indivíduos com gengivite HIV-positivos e 4) 10 indivíduos HIV-negativos com gengivite. A remoção das biópsias foi realizada durante cirurgia a retalho de Widman Modificado nos casos de PCM e nos casos de gengivite durante exodontias. A marcação celular foi realizada por meio da técnica de imunoistoquímica, utilizando o anticorpo S100. As CL foram avaliadas por localização no epitélio do sulco, epitélio gengival e na lâmina própria do epitélio do sulco e do epitélio gengival externo. Na análise total de CL, observou-se maior contagem no grupo com PCM HIV-positivos em relação ao grupo com PCM HIV-negativos. Ao realizar a análise por região tecidual, não se observou diferença na contagem celular. Não foi observado um aumento na contagem das CL com o aumento da inflamação e não houve correlação destas células com níveis sanguíneos de LT CD4, CD8 e carga viral. Concluindo, há aumento na contagem de células de Langerhans em indivíduos com PCM HIV-positivos em relação aos HIV-negativos.

Palavras chave: Células de Langerhans, gengivite, periodontite, resposta imune, HIV.

Introdução

Os microorganismos do biofilme dental produzem potentes fatores de virulência que ativam a resposta imune causando a destruição dos tecidos periodontais. As primeiras células do sistema imune a fazerem contato com antígenos locais são as células dendríticas (CD), que realizam a captura, processamento e apresentação do antígeno aos linfócitos T presentes nos linfonodos. Nos tecidos periféricos humanos três subgrupos são observados: células de Langerhans (CL) presentes na camada basal e supra basal do epitélio, CD presentes na lâmina própria, derme e órgãos como rins, pulmões e coração, células dendríticas linfóide/plasmocitóide presentes no sangue (Cutler e Jotwani, 2004).

Estudos experimentais têm demonstrado diferenças no número de células dendríticas quando se comparam gengivite, periodontite e gengiva clinicamente saudável. Embora maior contagem celular tenha sido observada com o aumento da inflamação (Newcomb et al. 1982, Jotwani e Cutler 2003) pouca diferença quantitativa entre gengivite e periodontite foi encontrada (Jotwani et al. 2001).

Séguier et al. (2000b) observaram alterações morfológicas como diminuição do tamanho celular e do número dos dendritos principalmente na periodontite. Cirrincione et al. (2002), observaram CL em todo o epitélio bucal, porém no epitélio da bolsa periodontal estavam em quantidade muito menor, normalmente não expressavam complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e não faziam contato com linfócitos. Já na lâmina própria da região da bolsa periodontal, eram as CD que estavam em maior número do que na região bucal, expressavam MHC-II, relacionavam-se com linfócitos e estavam próximos à plasmócitos.

Pimpinelli et al. (1995) observaram que em indivíduos com periodontite associada ao HIV, as CL mostravam alterações morfológicas como grande diminuição ou até mesmo

nenhuma expressão de MHC-II, concentravam-se na camada basal do epitélio e faziam contato apenas com linfócitos T (LT) CD8+. Já as CD da lâmina própria aumentaram em número, mantiveram a expressão do MHC-II e formaram grupos com LT CD8+.

Diversos estudos têm mostrado que estas alterações estão relacionadas com a expressão de receptores de superfície, entre eles CD4, CCRs e CCLs. Estes receptores estão relacionados com funções usuais como captura de antígenos, migração e interação com LT e também atuam com destaque nas interações com o Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV) (Jameson et al. 2002, Mackewicz et al. 2003, Teleshova et al. 2003). Adicionalmente, Wood et al. (1983) reportaram que a ligação entre partículas virais e o receptor CD4 das células dendríticas pode levar a uma queda em sua contagem, o que é uma consequência direta da infecção pelo HIV.

Marcadores específicos para cada tipo celular foram propostos para facilitar a identificação das CD, entre estes destacam-se: o CD1a, Langerin/Lag, CCR6, E-cadherin e S100 para CL; DC-SIGN, fator XIIIa, CD11b para CD e CD11c, CD123 para CD linfóide/plasmocitóide (Cutler e Jotwani, 2004). Dereka et al. (2004) observaram células fator XIIIa + no tecido conjuntivo e CL S100+ no epitélio e no tecido conjuntivo, enquanto que Jotwani e Cutler (2003) através da técnica de imunofluorescência analisaram células de Langerhans e células dendríticas utilizando os anticorpos CD-SIGN e CD1a. Esta dupla marcação deixou claro que existem dois tipos celulares distintos: no epitélio (CL) e na lâmina própria (CD).

Segundo Banchereau e Steinman (1998) as CL possuem uma interessante característica de migração pois possuem origem mielóide, seguem através de vasos sanguíneos até a lâmina própria e depois para o epitélio. Na maioria dos tecidos as CL estão presentes em um estágio dito imaturo, sendo incapazes de estimular os LT. Neste momento expressam vários receptores para captura de antígenos (Fcγ e Fcε) e uma vez realizada a captura e processamento antigênico, aumentam a expressão de MHC-II na

superfície externa para realizarem a apresentação do antígeno a LT CD4+ específicos, presentes no linfonodos. Este processo de maturação é acompanhado por mudanças morfológicas, partindo da forma arredondada e tornando-se dendrítica (Séguier et al. 2000b, Zavala & Cavicchia 2006).

Apesar de grande parte da atividade imunológica das CL ter sido descrita (Cutler & Jotwani, 2004), pouco se sabe sobre a distribuição destas células no tecido periodontal inflamado nos indivíduos HIV-positivos. Para melhor compreender a resposta imune nestes indivíduos, este estudo foi proposto com o objetivo de avaliar as CL na gengivite e na periodontite em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos.

Para verificar a presença de CL tanto no epitélio quanto na lâmina própria, foi feita a opção de utilizar o anticorpo S100. Desta maneira será possível a observação da possível presença de alterações em ambas as regiões e a verificação da hipótese de uma alteração quantitativa da CL em indivíduos HIV-positivos.

Material e métodos

Foram avaliadas 47 biópsias de tecidos gengivais de indivíduos HIV-positivos e 65 de HIV-negativos com doença periodontal. Para que as amostras pudessem ser incluídas neste estudo, após processamento e confecção de lâmina em hematoxilina e eosina (H.E.) as seguintes estruturas teciduais deveriam estar presentes: epitélio do sulco, epitélio gengival externo e lâmina própria. Foram selecionadas então, 25 amostras de indivíduos HIV-positivos e 25 amostras HIV-negativos que apresentaram tais estruturas em condições adequadas e foram incluídas no estudo. Uma amostra representativa exibindo as estruturas teciduais necessárias para inclusão e análise no estudo pode ser observada na figura 1.

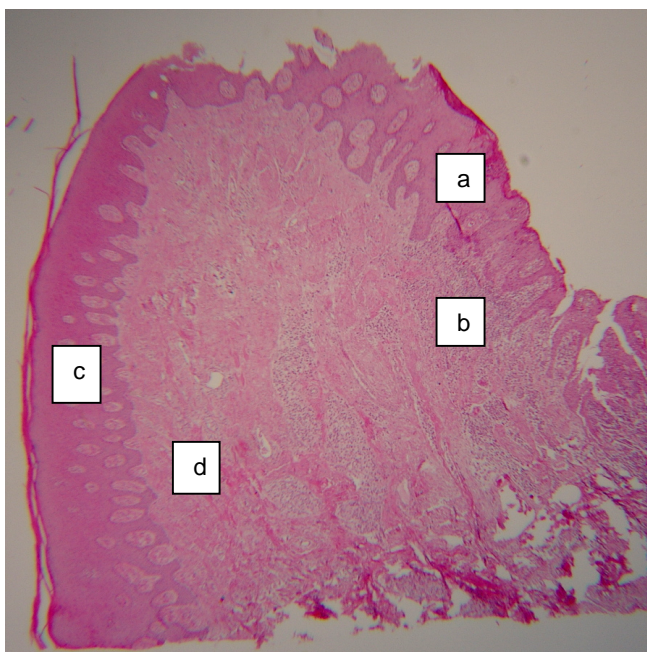


Figura 1- Corte histológico de gengiva de indivíduo com doença periodontal, mostrando os locais onde foram avaliadas as células de Langerhans. (a) epitélio do sulco gengival, (b) lâmina própria do epitélio do sulco gengival, (c) epitélio gengival externo, (d) lâmina própria do epitélio gengival externo (H.E.- aumento 50x).

Esta amostra de 50 biópsias foi composta por dois grupos, grupo teste (HIV-positivos) e controle (HIV-negativos); cada grupo foi dividido em dois subgrupos com periodontite crônica moderada (PCM) ou gengivite (G). A composição dos grupos foi assim determinada: grupo HIV+G (n=10); HIV+PCM (n=15); HIV-G (n=10) e HIV-PCM (n=15).

Foram incluídos no estudo amostras de indivíduos entre 18-55 anos, de ambos os gêneros. Para a definição da condição periodontal foram utilizados os seguintes critérios:

- Gengivite – Sangramento à sondagem > 25% dos sítios presentes (López et al. 2005).

- Periodontite Crônica Moderada – Foram considerados conjuntamente os seguintes critérios, definição de caso: presença de perda de inserção clínica proximal ≥ 3 mm em pelo menos dois dentes não adjacentes (Tonetti & Claffey, 2005). Definição de gravidade: forma moderada, presença de sítios com profundidade de sondagem até 6 mm e perda de inserção clínica < 4 mm (AAP, 2000).

Os indivíduos HIV-positivos foram recrutados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infectoparasitárias Orestes Diniz (CTR/DIP) da Prefeitura de Belo Horizonte (PBH); e os indivíduos HIV-negativos do Curso de Especialização em Periodontia da FO-UFMG, Belo Horizonte, Brasil. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram esclarecidos da não maleficência do tratamento e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG, parecer nº. ETIC 514/07.

Todos os indivíduos do grupo de HIV-negativos foram encaminhados ao Centro de Testagem Anônima PBH, para confirmação da soronegatividade.

Foram excluídos do estudo indivíduos com alterações sistêmicas como hipertensão, diabetes não controlada, trombocitopenia e outras que contra-indicassem naquele momento o tratamento periodontal.

Os indivíduos com periodontite foram submetidos à terapia inicial com raspagem e alisamento radicular, controle de placa e orientação para a técnica de escovação. Após o término do tratamento, os indivíduos foram chamados para nova avaliação, decorrido um intervalo de 45 a 60 dias. As coletas de tecido gengival foram realizadas nas seguintes condições: (1) Grupos com PCM: nos casos de persistência de profundidade de sondagem alterada ($PS > 5$ mm) na presença de sangramento e/ou supuração, foi realizado uma cirurgia à retalho de Widman Modificado. (2) Grupos com gengivite: o fragmento gengival foi removido durante exodontia, indicada por destruição por cárie e/ou indicação protética ou ortodôntica.

Nos indivíduos HIV-positivos, dados do prontuário médico também foram colhidos para informar os níveis sanguíneos dos LT CD4+, CD8+ e a carga viral, estes dados deveriam ter no máximo dois meses, caso este período fosse maior, um novo hemograma era solicitado.

Os fragmentos de tecido gengival removidos foram fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente seguiam para o processamento.

Imunoistoquímica

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol e reidratados em banhos decrescentes de etanol. Para remoção do pigmento formol, foram imersas por dez minutos em solução de Hidróxido de amônio 10% em etanol 95% e lavadas em cinco banhos com água destilada. Não houve recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de ligação da avidina endógena foi realizado segundo protocolo de Miller et al. (1999). Seguiu-se então a incubação em três banhos em solução tampão de TRIS-HCl ph-7.4 (tris-hidroxi-metil-aminometano) por 15 minutos. Os cortes foram incubados em anticorpo policlonal obtidos de coelhos anti S100 (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), diluição 1:700, por 18 horas à temperatura de 4°C. Desincubou-se realizando três banhos de TRIS-HCl. A incubação em anticorpo secundário e em complexo terciário pertencentes ao kit LSAB®+ System-HRP (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) foi realizada à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos. Desincubou-se lavando com três banhos de TRIS-HCl. A revelação da reação foi executada com a solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB)(Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Seguiu então os banhos em água destilada. A contra coloração foi feita com solução Hematoxilina de Mayer's durante 1 minuto, um banho com solução aquosa de Hidróxido de amônio 10%, sendo imediatamente lavadas em cinco banhos de água destilada. Finalmente procedeu-se a desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes, diafanização em xilol e montagem das lâminas em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

Análise quantitativa e estatística

A contagem das células foi realizada por um examinador previamente calibrado, em quatro regiões distintas: no epitélio do sulco, no epitélio gengival externo, e na lâmina própria dos epitélios do sulco gengival e gengival externo (Fig.1). A contagem foi feita em toda a extensão do epitélio e na lâmina própria e variou de 3 a 12 campos. A marcação celular observada foi do tipo citoplasmática e todas as células marcadas foram contadas independente de sua forma. A contagem foi feita utilizando um microscópio Carl Zeiss, com um aumento de 400x, com retículo de integração da mesma marca com área de 0,1024 mm². Foi realizada a somatória das células por campo, posteriormente por lâmina e encontrado a densidade por mm². A calibração do examinador foi realizada pela releitura das contagens de células de 10 indivíduos com intervalo de 15 dias. Para estabelecer a concordância intra-examinador, todos os escores do teste *Kappa* não ponderado foram maiores que 0.90.

Os resultados foram expressos em cada região pela média e desvio padrão do número de células por mm². Foi realizada uma análise comparativa entre os grupos PCM HIV-positivos e HIV-negativos e entre gengivite HIV-positivos e HIV-negativos, nas quatro regiões estudadas. Todas as células mononucleares do infiltrado inflamatório foram contadas e o mesmo foi classificado em discreto, moderado e intenso. Esta graduação do infiltrado inflamatório foi feita de acordo com quartios da mediana da contagem das células inflamatórias tanto na G como na PCM. Para identificar qual teste a ser usado foi verificada a homogeneidade e distribuição das variáveis. Deste modo, a análise estatística foi realizada utilizando o teste para comparação de médias de amostras independentes, *t-Student*. A presença de correlação entre CL e níveis sanguíneos de LT CD4, CD8 e carga viral foi verificada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (*r*). Os dados foram

analisados pelo programa estatístico SPSS for windows 15.0 (Chicago, IL, USA), com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

O infiltrado inflamatório mononuclear foi maior nos grupos com periodontite ($1640 \pm 386,86$ cel/mm²) em relação aos grupos com gengivite ($569,75 \pm 404,03$ cel/mm²). As CL, observadas na PCM e G tanto em HIV-positivos quanto em HIV-negativos foram mais freqüentes na camada basal, onde eram mais arredondados, do que na camada espinhosa, e se mostravam com maior número de prolongamentos citoplasmáticos (dendritos). Na lâmina própria, as CL eram mais frequentes do lado do sulco, e mantinham íntima relação com vasos sanguíneos, linfócitos e plasmócitos, a forma estrelada com dendritos era mais frequente do que no epitélio, porém, a forma arredondada ainda era a predominante (Fig 2).

Caracterização da amostra

Clinicamente os grupos apresentaram-se homogêneos quanto à idade e a gravidade de periodontite. A Tabela 1 reporta as variáveis de interesse e a condição periodontal na amostra estuda. Observa-se que o grupo HIV-positivo apresentou baixas cargas virais.

Tabela 1 – Variáveis de interesse e condição periodontal na amostra estudada.

	G /HIV-	G /HIV+	PCM /HIV-	PCM /HIV+
Nº de indivíduos	10	10	15	15
Idade	38 (34-50) ^a	38 (32-45) ^a	46 (40-60) ^a	42 (32-52) ^a
Gênero Masc.	3	7	7	8
Fem.	7	3	8	7
Nível sangüíneo de LT CD4+ cels/mm ³	ND	521 (117-1054) ^a	ND	450 (28-815) ^a
Nível sangüíneo de LT CD8+ cels/mm ³	ND	850 (267-1140) ^a	ND	1048 (406-1565) ^a
Carga viral	ND	20 (20-71671) ^a	ND	20 (20-321567) ^a
Índice de placa	0,94 ± 0,91 ^b	1,69 ± 0,83 ^b	1,05 ± 0,29 ^b	1,35± 0,65 ^b
% sítios P.S. ≤ 3 mm	ND	ND	85	91,4
% sítios P.S. ≥4 ≤ 6 mm	ND	ND	8,2	6,0
% sítios P.S. ≥7 mm	ND	ND	6,8	2,6
% sítios PIC < 3 mm	ND	ND	85,1	81,4
% sítios PIC ≥3 mm	ND	ND	14,9	18,6

^a : mediana; ^b ; média e desvio padrão; ND: não determinado
 PS: profundidade de sondagem; PIC: perda de inserção clínica

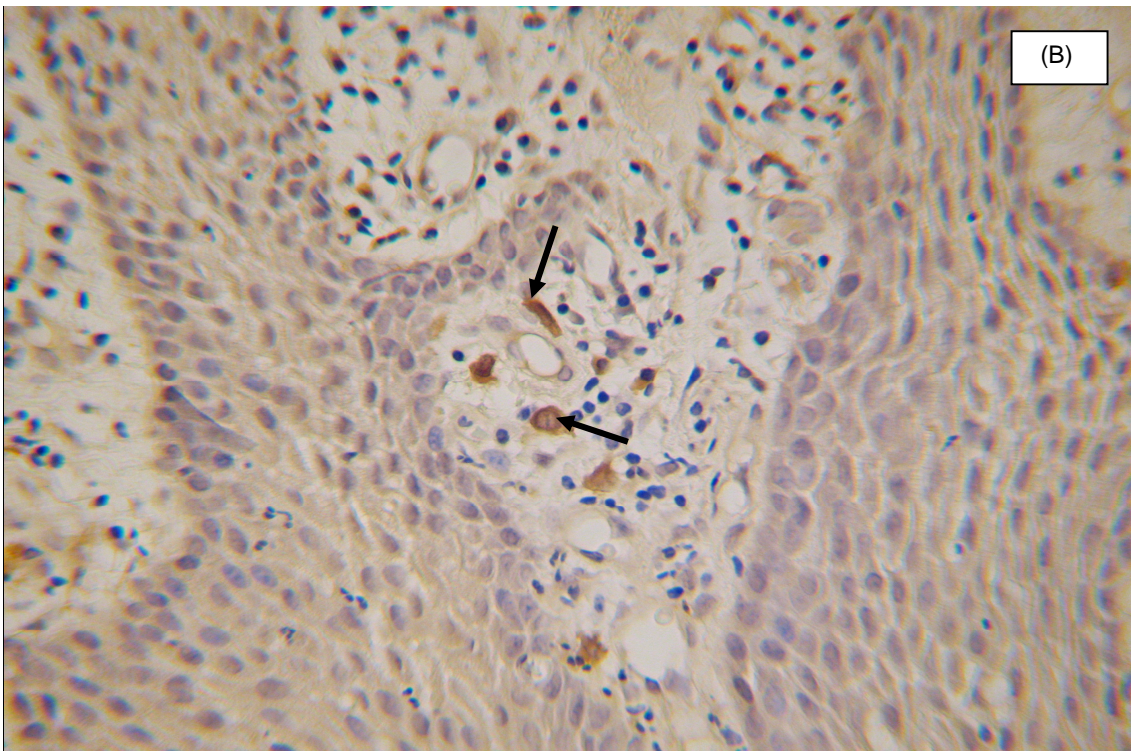
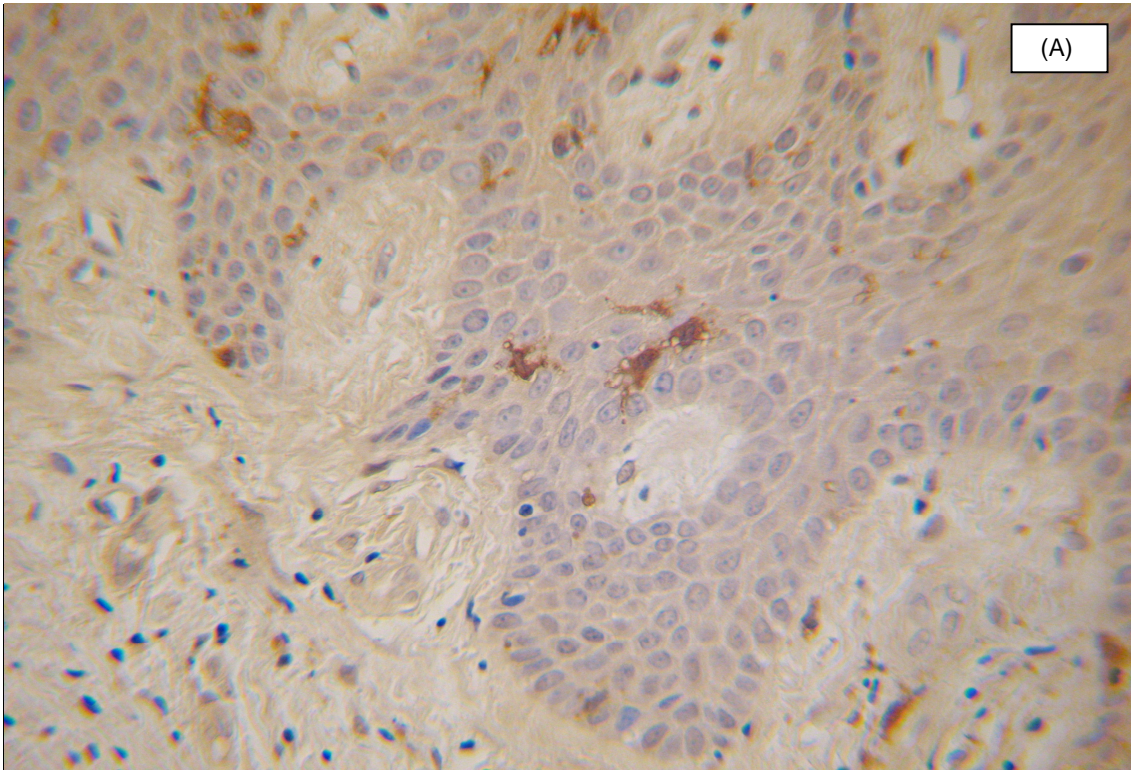


Figura 2 (A, B) – Fragmento de tecido gengival de indivíduo com periodontite. (A) Observam-se as CL na camada basal e espinhosa do epitélio. (B) Presença das CL na lâmina própria próximas a vasos sanguíneos (aumento 560x).

Análise quantitativa das CL

As CL foram avaliadas em quatro localizações distintas e também no corte histológico como um todo (Tab.2).

Tabela 2- Distribuição da densidade das CL em relação à sua localização tecidual e a condição periodontal.

Condição Periodontal	Epitélio do sulco	Epitélio gengival	Lâmina própria epitélio do sulco	Lâmina própria epitélio gengival	CL Totais
Gengivite HIV-	18,53 (±22,85)	27,24 (±14,16)	18,70 (±10,51)	24,57 (±11,29)	95,55 (±42,08)
Gengivite HIV+	19,73 (±13,70)	38,58 (±17,46)	27,93 (±17,65)	16,03 (±11,01)	107,07 (±43,64)
Periodontite HIV-	20,62 (±14,30)	40,46 (±22,37)	19,75 (±17,80)	17,14 (±8,04)	99,51 (±40,91)*
Periodontite HIV+	32,07 (±29,74)	52,29 (±30,41)	33,46 (±21,39)	17,68 (±10,05)	144,34 (±66,88)*

* $p < 0,05(t\text{-Student})$; densidade (cel/mm²)

Inicialmente foi realizada uma análise comparativa entre as CL totais na G em HIV-positivos e na G em HIV-negativos sem encontrar alteração estatisticamente significativa. Na comparação entre PCM HIV-negativos e PCM HIV-positivos, foi observado um aumento no grupo HIV-positivos ($p= 0,035$).

Uma análise das quatro localizações estudadas foi realizada comparando os grupos G HIV-positivos e G HIV-negativos e também PCM em HIV-negativos e PCM em HIV-positivos, entretanto não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Ao analisar os subgrupos na mesma condição periodontal segundo a mesma intensidade do infiltrado, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos. Adicionalmente, foi realizada a comparação entre a condição de intensidade do infiltrado discreto com o intenso, para avaliar possível alteração com o aumento da inflamação. Também não foram encontradas diferenças significativas (Tab.3).

Tabela 3 - Caracterização da distribuição das CL totais segundo a condição periodontal e intensidade do infiltrado inflamatório

	Intensidade do infiltrado	Número de amostras	CL totais
GENGIVITE	discreto HIV-	2	59,02 ± 54,60
	discreto HIV+	2	138,40 ± 16,51
	moderado HIV-	4	104,26 ± 29,34
	moderado HIV+	3	104,51 ± 39,26
	intenso HIV-	4	105,09 ± 48,43
	intenso HIV+	5	96,06 ± 52,91
PERIODONTITE	discreto HIV-	2	59,39 ± 26,46
	discreto HIV+	2	123,00 ± 42,77
	moderado HIV-	4	83,94 ± 22,86
	moderado HIV+	7	163,51 ± 81,07
	intenso HIV-	9	115,34 ± 42,88
	intenso HIV+	6	129,08 ± 57,40

(*t-Student*, $p > 0,05$)

Correlação entre CL e níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral nos indivíduos HIV-positivos

A presença de correlação entre a contagem de CL e níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e carga viral, foi verificada por meio dos coeficientes de correlação de Pearson (r), e correlações estatisticamente significativas não foram observadas (Tab.4).

Tabela 4 – Coeficiente de Correlação de Pearson entre níveis sanguíneos de CD4+, CD8+ e carga viral e a contagem de CL nas regiões gengivais.

	Epitélio do sulco	Epitélio bucal	Lâmina própria epitélio do sulco	Lâmina própria epitélio gengival	CL Totais
CD4	-0,144	-0,153	0,054	-0,324	-0,035
CD8	-0,079	0,015	0,140	0,041	0,201
Carga viral	-0,109	0,198	-0,056	0,134	0,009

(*t-Student*, $p > 0,05$)

Discussão

Neste estudo foi realizada uma avaliação imunoistoquímica utilizando um anticorpo (S100) para CL. A análise quantitativa das CL totais revelou maior número no grupo com PCM HIV-positivo em relação ao grupo PCM HIV-negativo. Em relação à gengivite, não houve uma diferença entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos. Estes resultados são contrários aos que foram reportados por Wood et al. (1983) e Rappersberger et al. (1988), que observaram uma diminuição das CL nos indivíduos com AIDS. Esta diminuição provavelmente seria por causa da ligação do vírus HIV com os receptores CD4, CCR e CCL das CL, tornando-as um reservatório e uma via de infecção do LT CD4+. Neste estudo, porém, todos os indivíduos eram usuários de HAART, com baixas contagens de carga viral, ou seja, menor agressão direta às CL. Além disto, deve-se ressaltar que ambos os grupos de PCM foram definidos por dois critérios distintos incluindo conjuntamente definição de caso e gravidade da doença, evitando assim vieses relacionados ao diagnóstico de doença periodontal (Costa et al. 2009) e homogenizando os grupos quanto a gravidade da doença. Desta maneira, este aumento na contagem das CL na PCM nos indivíduos HIV-positivos pode estar relacionado com a presença de patógenos específicos. Embora os principais patógenos sejam os mesmos do que no HIV-negativo, existe uma singularidade da doença, com algumas espécies como *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii* somente observadas em indivíduo HIV-positivos (Odden et al. 1995; Myint et al., 1999; Gonçalves et al. 2007).

A comparação dos subgrupos segundo a mesma intensidade da inflamação e a mesma condição periodontal não revelou diferenças entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos. Adicionalmente, não foi observada alteração na contagem das CL totais com o aumento da inflamação (infiltrado discreto para intenso) tanto no grupo HIV-positivos como no HIV-negativos. Entretanto, estes dados são de difícil comparação com estudos

prévios, devido a diferentes metodologias, que podem ser a causa dos resultados discordantes (Saglie et al. 1987; Cutler et al. 1999; Jotwani e Cutler 2003) . Além disto, a maioria dos estudos prévios compara a gengivite com a PCM (Séguier et al. 2000a, Jotwani et al. 2001, Cury et al., 2008). No nosso entendimento, esta comparação não parece ser adequada pois são formas distintas de doença periodontal. Neste estudo não foram observadas alterações na densidade das CL com o aumento da inflamação, resultado concordante com estudos prévios (Séguier et al. 2000a, Jotwani et al. 2001). Dereka et al. (2004) observaram que uma vez realizada a remoção do fator irritante através da raspagem subgengival haveria uma diminuição na contagem das CL no epitélio e no tecido conjuntivo, em bolsas de até 6 mm de profundidade. É importante ressaltar que apenas o estudo de Dereka et al. (2004) utilizou o mesmo anticorpo utilizado no presente estudo. Além do mais, diferentes formas de remoção dos tecidos e critérios de classificação da doença periodontal poderiam criar vieses e conseqüentemente, resultados discordantes.

Na comparação entre as quatro regiões estudadas, não foi observada diferença entre os grupos HIV-positivos e HIV-negativos tanto na gengivite como na periodontite. Em um estudo, avaliando apenas indivíduos HIV-negativos, Cury et al. (2008), observaram um aumento na lâmina própria e no epitélio gengival no grupo com gengivite, em comparação ao grupo com periodontite, indicando características diferentes na resposta imune entre as duas doenças. É interessante observar também que na região do epitélio e lâmina própria do sulco, não houve alteração na contagem das células dendríticas. Este fato pode estar relacionado com a permeabilidade do epitélio juncional e a presença de uma defesa local através do fluido gengival rico em IgG e de maior presença de células fagocitárias presentes no infiltrado da lâmina própria.

Foi avaliada também a presença de correlação entre as CL e os níveis sanguíneos de LT CD4+, CD8+ e de carga viral, não observando relação estatisticamente

significativa. Este fato pode estar relacionado também ao perfil da amostra dos HIV-positivos, onde todos os indivíduos são usuários de HAART com baixa carga viral e níveis de LT CD4+ e CD8+ dentro dos padrões aceitos, embora alguns indivíduos tenham níveis de LT CD4+ menores que 200 cels/mm³, porém, estudos prévios indicam que estes níveis não comprometem a eficiência da resposta imune (Martinez-Canut et al. 1996; Gonçalves et al. 2005).

Concluindo, o presente estudo observou um aumento na contagem de CL totais na PCM de indivíduos HIV-positivos em comparação com HIV-negativos. Não foi observada diferença na contagem de CL com o aumento da inflamação. O uso de HAART gerando baixa contagem de carga viral, pode ser considerado um fator protetor em relação a destruição das CL, propiciando, portanto, uma resposta imune satisfatória em indivíduos HIV-positivos. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar possíveis alterações em suas funções na presença de PCM em indivíduos HIV-positivos.

Agradecimentos

Este estudo foi suportado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), processo nº 301490/2007-4.

Referências bibliográficas

1. American Academy of Periodontology. Parameter on Chronic Periodontitis With Slight to Moderate Loss of Periodontal Support. *J Periodontol* 2000;71(5) (suppl): 856-858.

2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and control of immunity. *Nature* 1998; 392(3):245-252.
3. Cirrincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73(1):45-52.
4. Costa FO, Guimarães AN, Kato Segundo T et al. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Science* 2009;51:199-206.
5. Cury PR, Furuse C, Araújo NS et al. Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis. *Braz Oral Res* 2008;22(3):258-263.
6. Cutler CW, Jotwani R, Palucka KA. Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis *J Periodontol Res* 1999;34:406-412.
7. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000* 2004;35:135-157.
8. Dereka XE, Tosios KI, Chrysomali E. Factor XIIIa+ dendritic cells and S-100 protein+ Langerhans Cells in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 2004;39:447-452.
9. Gonçalves L.S., Ferreira S.M.S., Silva Jr. A., Villoria G.E., Costinha L.H. & Colombo A.P. (2005). Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected Brazilian patients undergoing highly active antiretroviral therapy: Clinical results. *J Periodontol* 76, 915-922.
10. Gonçalves LS, Ferreira SMS, Colombo AP et al. (2007). Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative

brazilians with chronic periodontitis. *J Periodontol* 78:87-96.

11. Jameson B, Baribaud F, Pohlmann S et al. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques *J Virol* 2002;76:1855-1875.
12. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M et al. Mature dendritic Cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo and in Vitro studies. *J Immunol* 2001;167:4693-4700.
13. Jotwani R, Cutler CW. Multiple Dendritic cell (DC) subpopulations in human gingival and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Den Res* 2003;82:736-741.
14. Lopez NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutierrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* 2005;76(suppl):2144-2153.
15. Mackewicz CE, Yuan J, Tran P et al. Alpha-defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 2003;17: 23-32.
16. Martinez-Canut P, Guarinos J, Bagán JV. Periodontal disease in HIV seropositive patients and its relation to lymphocyte subsets. *J Periodontol* 1996;67:33-36.
17. Miller KT, Kubier PH, Reynolds BH et al. Blocking on endogenous avidin-biotin activity in immunohistochemistry: The use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 1999;7: 63–65.
18. Myint M, Odden K, Schenck K et al. The gingival plasma cell infiltrate in HIV – positive patients with periodontitis is disorganized. *J Clin Periodontol*

1999;26(3): 358-365

19. Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingival. *J Clin Periodontol* 1982;9(4):297-304.
20. Odden K., Schenck K., Hurlen B. High numbers of T cells in gingival from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J O Pathol Med*, 1995;24:413-419.
21. Pimpinelli N, Riccardi R, Piluso S et al. Immune cell infiltration in periodontal lesions of HIV infected subjects. Antigenic and ultra-structural features. *Eur J Dermatol* 1995; 5:607-613.
22. Rappersberger K, Gartner S, Schenk P et al. Langerhans cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirolgy* 1988;29:185-194.
23. Saglie FR, Pertuiset JH, Smith CT et al. The presence of bacteria in oral epithelium in periodontal disease *J Periodontol* 1987;57:417-422.
24. Séguier S, Godeau G, Brousse N et al. Quantitative morphological analyses of Langerhans cells in healthy and diseased human gingival. *Arch Oral Biology* 2000b ;45:1073-1081.
25. Séguier S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biology* 2000a;45:441-452.
26. Teleshova N, Frank I, Pope M. Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection *J Leuk Biol* 2003;74:683-688.
27. Tonetti M.S. & Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European

Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* suppl. 2005;6, 210-213.

28. Wood GS, Warner NL, Warnke RA. Leu3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol* 1983;131: 212-6.
29. Zavala WD, Cavicchia JC. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. *Arch Oral Biology* 2006.;51:1150-1155.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Será apresentada a seguir a análise descritiva dos dados, os quais foram analisados pelo programa estatístico SPSS for Windows-15.

A amostra foi composta por biópsias removidas de 50 indivíduos. A distribuição por gênero e uso de tabaco pode ser observada nos gráficos 1 e 2.

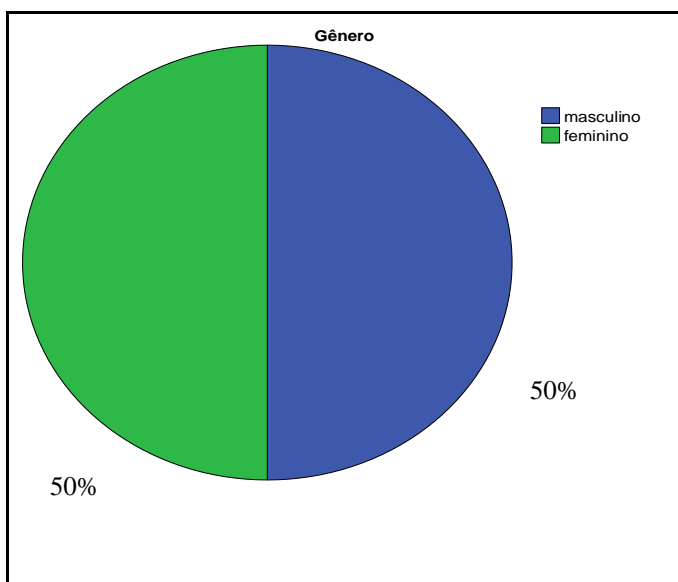


Gráfico 1- Distribuição da amostra segundo o gênero.

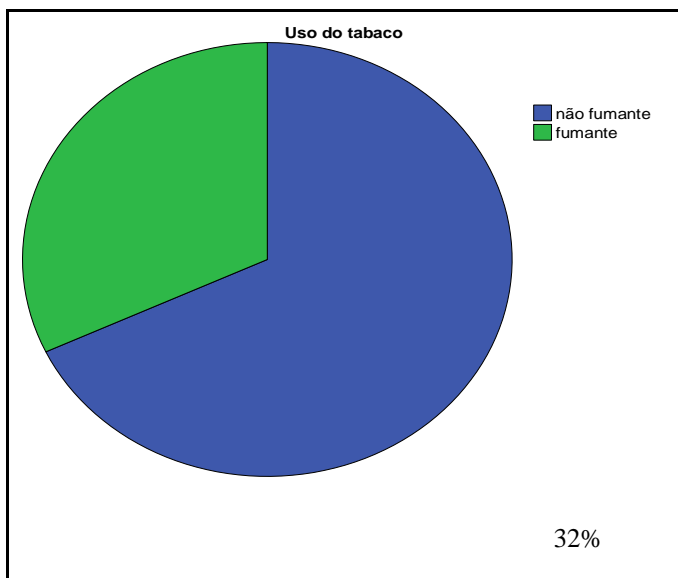


Gráfico 2- Distribuição da amostra segundo o uso do tabaco

Nos indivíduos HIV-positivos foram coletados do prontuário os níveis sanguíneos de linfócitos T CD4, CD8, carga viral, idade e gênero como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1- Distribuição da amostra em relação à idade, gênero dos níveis sanguíneos de LT CD4, CD8, carga viral, segundo a condição periodontal gengivite (G) e periodontite (P) em indivíduos HIV-positivos.

Condição periodontal	Idade	Gênero	CD4	CD8	Carga viral
P1	48	M	238	1051	556
P2	42	F	576	1104	20
P3	52	F	815	1527	451
P4	51	F	575	1042	20
P5	43	M	564	1565	20
P6	49	F	112	518	20
P7	42	M	450	658	1925
P8	41	F	677	1199	20
P9	43	F	28	406	115116
P10	36	M	297	438	20
P11	44	M	315	1080	321
P12	40	M	735	1048	20
P13	32	M	285	547	1840
P14	36	F	269	680	321567
P15	38	M	269	1173	20
G1	32	F	572	1001	20
G2	35	F	349	1140	20
G3	43	M	773	824	20
G4	43	M	446	770	20
G5	36	F	628	713	20
G6	44	M	315	1080	332
G7	38	M	1054	885	20
G8	45	M	682	716	20
G9	36	M	471	877	20
G10	39	M	117	267	71671

Nos indivíduos HIV-negativos os níveis sanguíneos de CD4, CD8 e carga viral não foram avaliados, no entanto, durante o tratamento periodontal todos os indivíduos preencheram uma ficha clínica (ANEXO A) com todos os dados pessoais, hábitos de higiene, uso de tabaco, índice de placa e periodontograma, estes dados podem ser visualizados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Distribuição amostral em relação à idade e gênero no grupo de indivíduos HIV-negativos.

Condição periodontal	Idade	Gênero	CD4	CD8	Carga viral
P1	46	M			
P2	43	M	-	-	-
P3	52	F			
P4	49	F			
P5	57	F			
P6	42	F			
P7	45	M			
P8	40	M			
P9	65	F	-	-	-
P10	46	F			
P11	66	M			
P12	46	F			
P13	44	M			
P14	42	F			
P15	59	M			
G1	38	F			
G2	43	F			
G3	45	M	-	-	-
G4	43	F			
G5	50	F			
G6	34	F			
G7	41	F			
G8	35	M			
G9	38	M			
G10	38	F	-	-	-

Tabela 3- Variáveis de interesse dos indivíduos com Gengivite (G) e Periodontite Crônica Moderada (PCM) em HIV-positivos (HIV+) e HIV-negativos (HIV-)

	G /HIV-	G /HIV+	PCM /HIV-	PCM /HIV+
Idade	38 (34-50) ^a	38 (32-45) ^a	46 (40-60) ^a	42 (32-52) ^a
Gênero Masc.	3	7	7	8
Fem.	7	3	8	7
Nível sanguíneo de LT CD4+ cels/mm ³	ND	521 (117-1054) ^a	ND	450 (28-815) ^a
Nível sanguíneo de LT CD8+ cels/mm ³	ND	850 (267-1140) ^a	ND	1048 (406-1565) ^a
Carga viral	ND	20 (20-71671) ^a	ND	20 (20-321567) ^a
Índice de placa	0,94(± 0,91) ^b	1,69 (± 0,83) ^b	1,05 (± 0,29) ^b	1,35(± 0,65) ^b
% sítios P.S. ≥4 ≤6	ND	ND	8,2	6,0
% sítios PIC ≥3	ND	ND	14,9	18,6

^a : mediana; ^b : média e desvio padrão; ND: não determinado.

Como as doenças estudadas são inflamatórias, grande número de células inflamatórias encontravam-se presentes. Este infiltrado composto em sua maioria de linfócitos e de plasmócitos foi classificado segundo sua intensidade. Inicialmente foi realizado uma classificação semi-quantitativa para cada unidade amostral. A presença do infiltrado foi relacionado com a extensão de sua área, sendo classificado como discreto, quando ocupava até 1/3 da extensão da região da lâmina própria do sulco ou bolsa gengival. Infiltrado moderado quando sua extensão ocupava até 2/3 da região do sulco e intenso quando ocupava mais de 2/3 da região da lâmina própria do sulco ou bolsa (GRAF.3).

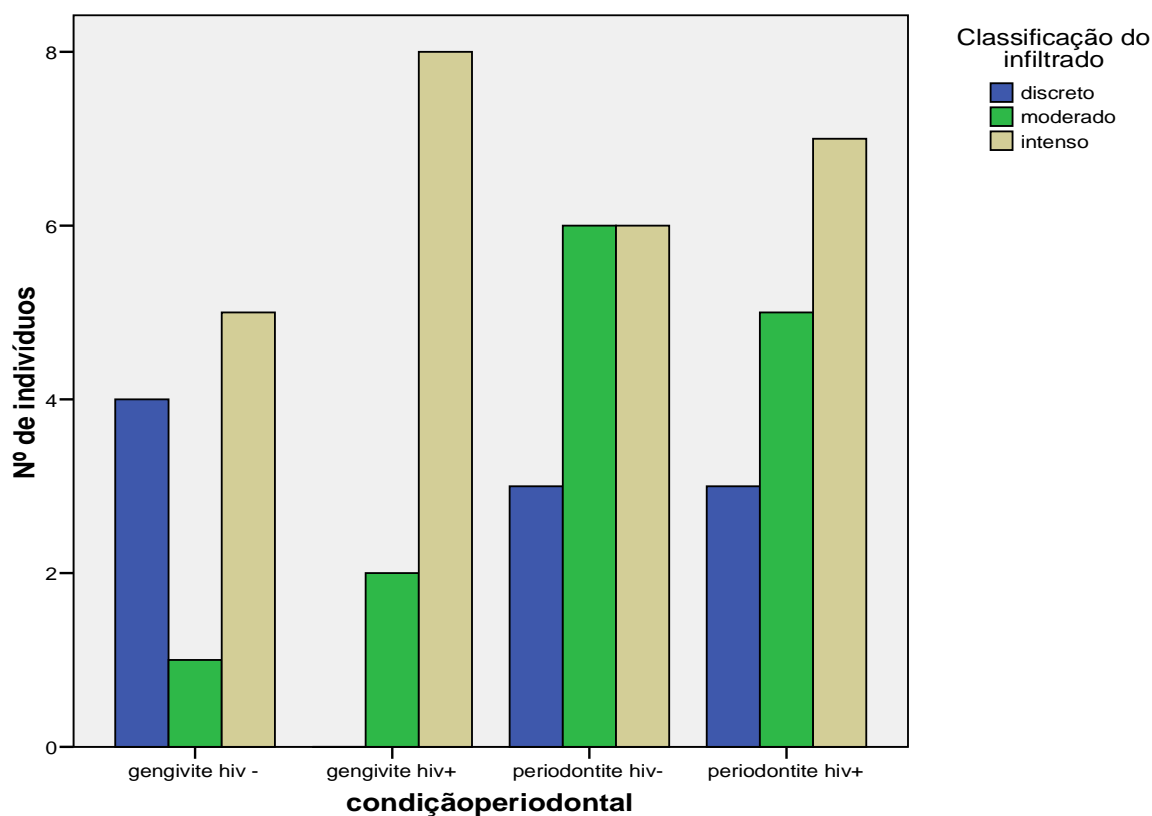


Gráfico 3 – Distribuição do infiltrado inflamatório segundo sua classificação semi-quantitativa nas condições periodontais estudadas.

Além desta classificação semi-quantitativa, todas as células inflamatórias mononucleares foram contadas. Esta contagem foi realizada com o aumento de 560x em 6 a 8 campos na gengivite e 8 campos na periodontite. Os resultados são apresentados globalmente por grupo na tabela 4.

Tabela 4 - Número de células inflamatórias mononucleares presente no infiltrado segundo a condição periodontal.

Condição periodontal	Media (mm ²)	Desvio padrão	Mediana
Gengivite HIV –	318,80	237,92	216 (39 – 715)
Gengivite HIV +	350,40	248,48	301 (95 – 830)
Periodontite HIV -	1009,53	450,25	1026 (420 – 1872)
Periodontite HIV +	869,07	390,90	830 (162 – 1649)

A partir dos dados acima foi realizado também uma avaliação quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório obedecendo aos seguintes critérios para cada unidade amostral:

Grupo Gengivite:

- Infiltrado leve: ≤ 150 células inflamatórias mononucleares.
- Infiltrado moderado: $> 151 \leq 300$ células inflamatórias mononucleares.
- Infiltrado intenso: > 301 células inflamatórias mononucleares.

Grupo Periodontite:

- Infiltrado leve: ≤ 500 células inflamatórias mononucleares.
- Infiltrado moderado: $> 501 \leq 1000$ células inflamatórias mononucleares.
- Infiltrado intenso: > 1001 células inflamatórias mononucleares (GRAF. 4).

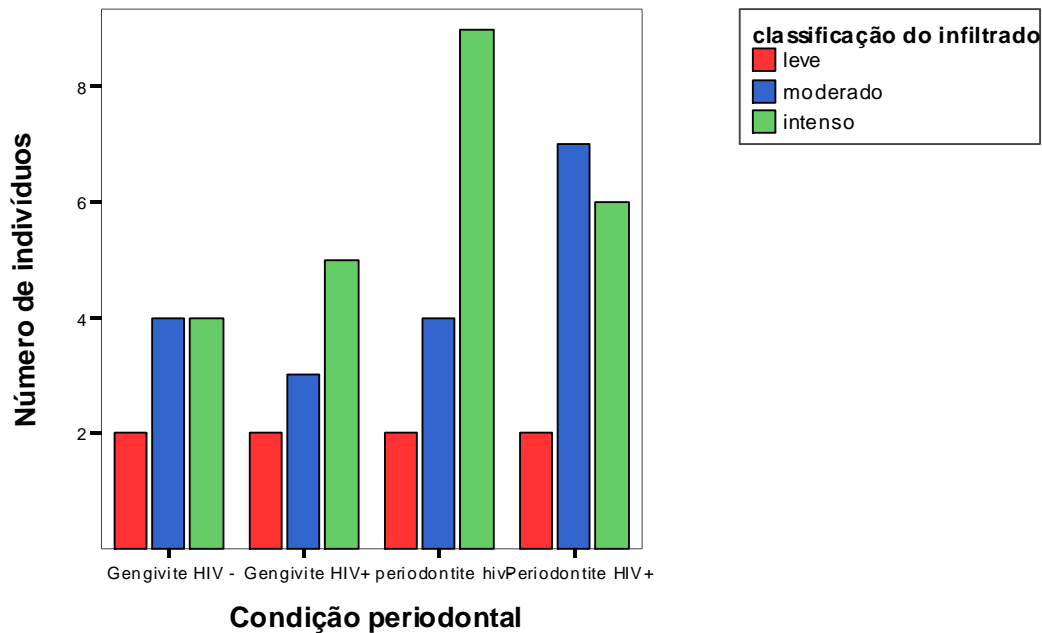


Gráfico 4 - Classificação do infiltrado inflamatório segundo o número de células inflamatórias mononucleares presentes.

Os cortes histológicos foram tratados pela técnica de imunistoquímica utilizando os anticorpos triptase e c-kit para marcação de mastócitos maduros e imaturos respectivamente. A metodologia se encontra no artigo científico. A distribuição por mm² de ambas as células marcadas pode ser observada nos gráficos 5 e 6. Com relação à triptase, pode-se observar que há uma maior contagem nos indivíduos HIV-positivos, tanto na gengivite como na periodontite. Pode-se observar também que as medianas dos grupos gengivite e periodontite HIV-positivos e HIV-negativos encontram-se bem próximas. Da mesma maneira, na distribuição dos mastócitos c-kit+ observa-se que há uma maior contagem nos indivíduos HIV-positivos, tanto na gengivite como na periodontite.

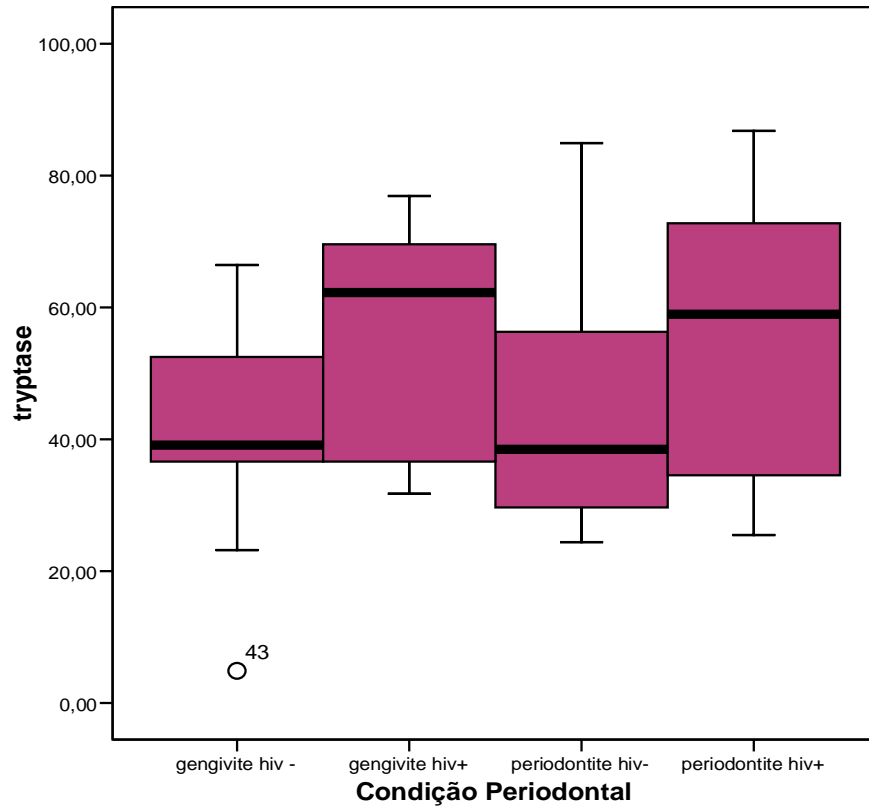


Gráfico 5 – Distribuição das células triptase+ segundo a condição periodontal.

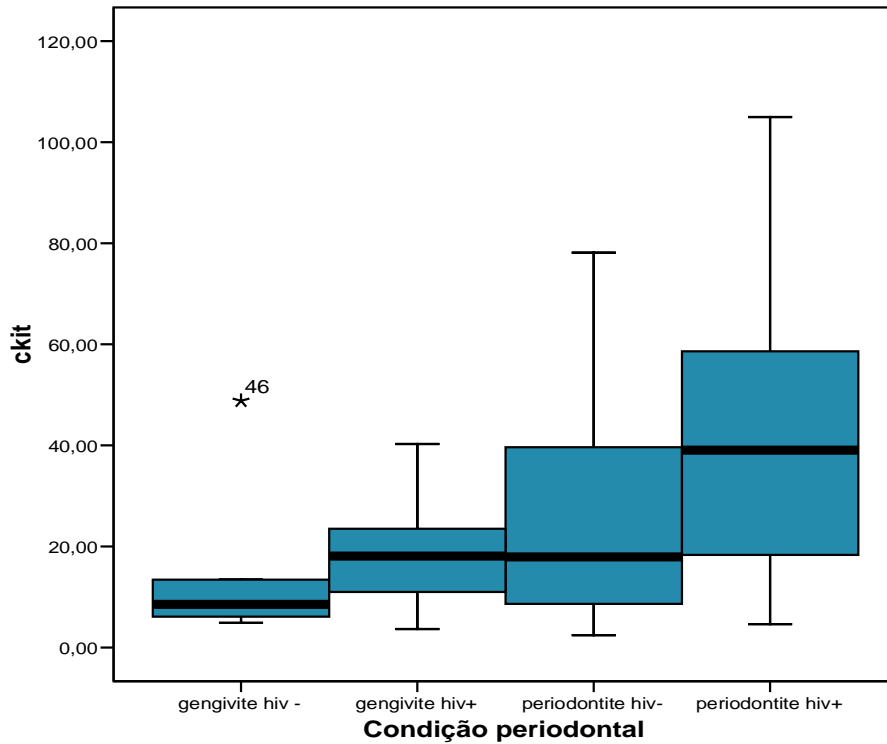


Gráfico 6 - Distribuição das células C-kit+ segundo a condição periodontal.

Além de determinar a densidade dos mastócitos presentes na região do infiltrado inflamatório nos grupos gengivite e periodontite HIV-negativos e HIV-positivos, foi realizada também uma análise da freqüência destas células segundo o número total de células mononucleares presente no infiltrado inflamatório (GRAF. 7 e 8).

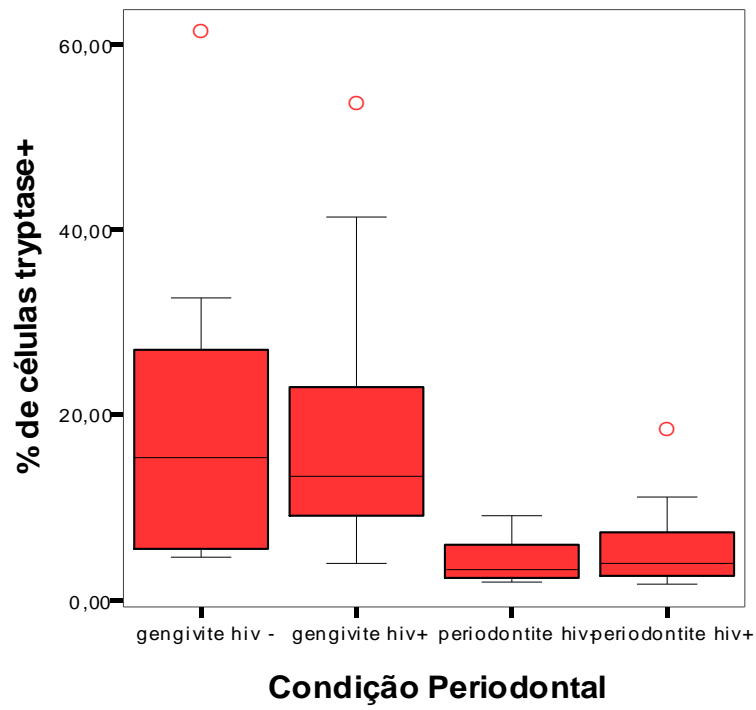


Gráfico 7 – Distribuição da freqüência de células triptase+ segundo a condição periodontal.

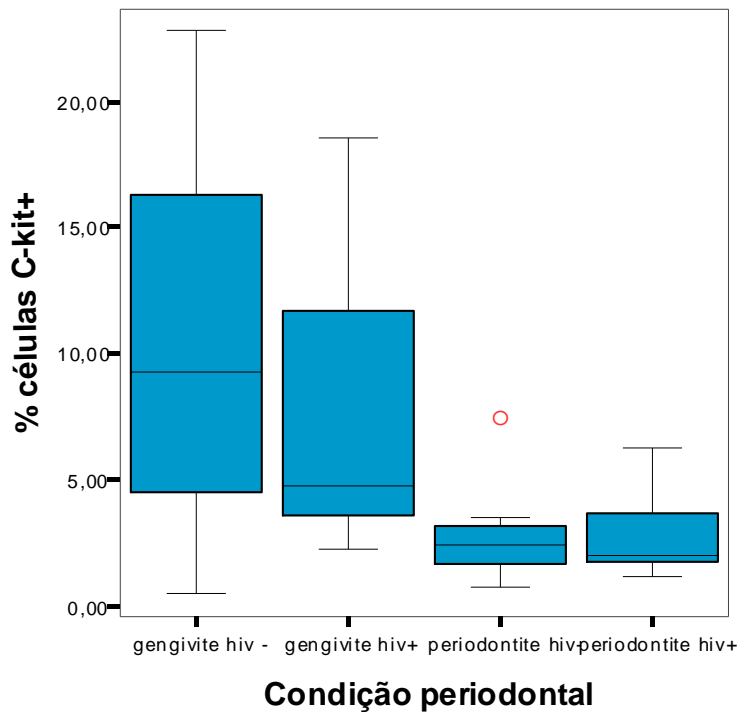


Gráfico 8 – Distribuição da freqüência de células C-kit+ segundo a condição periodontal.

Foi realizado também uma comparação entre a mesma condição periodontal e a classificação do infiltrado inflamatório entre indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos. A partir daí foi realizada uma comparação das médias das frequências dos mastócitos triptase+ e c-kit+ (TAB.5). Pode-se observar que tanto a frequência dos mastócitos triptase+ como dos c-kit+ aumenta com o aumento da inflamação. Uma análise detalhada encontra-se no artigo científico.

Tabela 5 - Caracterização da distribuição da frequência de mastócitos segundo sua condição periodontal e intensidade do infiltrado inflamatório.

	Intensidade do infiltrado	Nº de amostras	% mastócitos triptase+	% mastócitos c-kit+
GENGIVITE	discreto HIV-	2	47,03 ± 20,46 [¥]	20,08 ± 3,81*
	discreto HIV+	2	47,56 ± 8,65 [◊]	11,09 ± 10,56
	moderado HIV-	4	20,08 ± 5,80	11,68 ± 5,39
	moderado HIV+	3	17,50 ± 5,46	4,29 ± 1,28
	intenso HIV-	4	5,59 ± 1,18 [¥]	3,88 ± 2,31*
	intenso HIV+	5	8,86 ± 4,60 [◊]	7,17 ± 4,46
PERIODONTITE	discreto HIV-	2	7,65 ± 1,98 [‡]	2,07 ± 1,91
	discreto HIV+	2	14,84 ± 5,19 [†]	2,32 ± 0,81
	moderada HIV-	4	5,33 ± 2,05	3,80 ± 2,59
	moderada HIV+	7	5,56 ± 2,31	3,59 ± 1,78
	intenso HIV-	9	2,99 ± 1,44 [‡]	2,23 ± 0,76
	intenso HIV+	6	2,76 ± 0,91 [†]	2,16 ± 1,03

p < 0,05 ^{¥◊†*‡}

Foi realizada também uma avaliação das Células de Langerhans presentes tanto na lâmina própria como no epitélio do sulco e no epitélio bucal (GRAF.9). Para tanto, utilizou-se o anticorpo anti S-100, a metodologia encontra-se no artigo científico. Além de uma quantificação por região, foi reportado uma contagem global das CL em todo o corte histológico (GRAF.10).

As análises estatísticas de comparações entre os grupos segundo cada anticorpo utilizado e também as análises de correlação entre os níveis sanguíneos de LT CD4, CD8 e carga viral estão presentes nos artigos científicos.

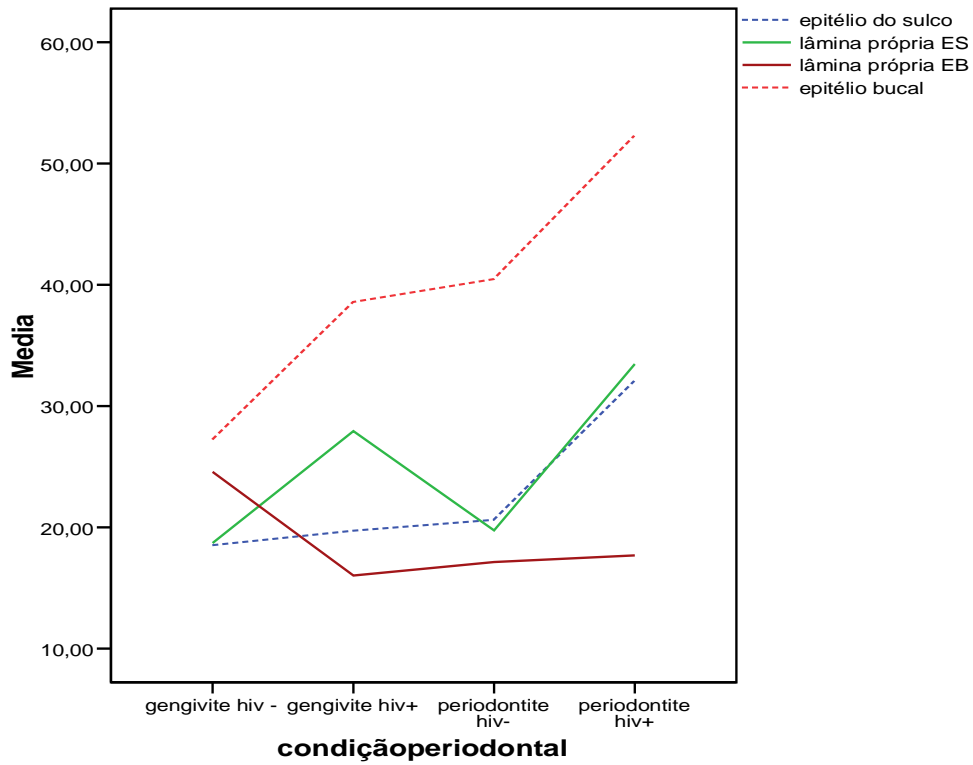


Gráfico 9 – Distribuição das células S-100+ presentes na lâmina própria e no epitélio segundo a condição periodontal.

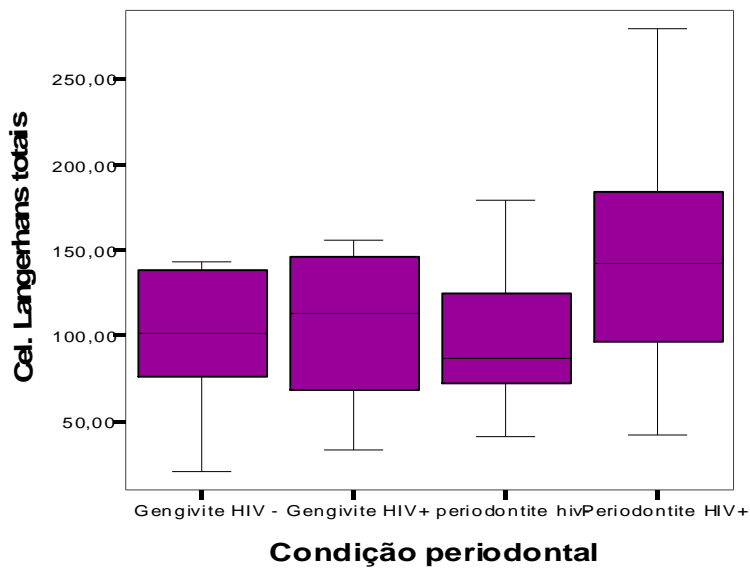


Gráfico 10 – Distribuição das células S-100+ totais presentes segundo a condição periodontal.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O uso de HAART parece ser a responsável pela manutenção de uma resposta imune eficaz nos indivíduos HIV-positivos. Desta forma, propicia densidade e frequência de mastócitos semelhantes com indivíduos HIV-negativos no tecido gengival acometido por gengivite e periodontite.

- O uso de HAART em indivíduos HIV-positivos é um fator protetor às CL, pois diminuem a carga viral e conseqüentemente, causam menor agressão a estas células no tecido gengival acometido por gengivite e periodontite. No entanto, seu uso pode propiciar a colonização de espécies incomuns que poderiam estar gerando um aumento das CL na periodontite de indivíduos HIV-positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K., LINCHTMAN A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier 2005. 580p.

AESCHLIMANN C.R., KAMINSKI E.J., ROBINSON P.J. The effects of periodontal therapy on the mast cell population in gingival tissues. *J. Periodontol.*, n. 4, v. 51, p.193-198, abril, 1980.

ALISSON, J.P., LANIER, L.L. Structure, function, and serology of the T- cell antigen receptor complex. *Annu Rev Immunol*, v.5, p. 503-540, 1987.

ALPAGOT T., FONT K., LEE P. Longitudinal evaluation of GCF IFN γ levels and periodontal status in HIV+ patients. *J. Clin. Periodontol.* v.30, n.11, p. 944-948, Nov, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Epidemiology of periodontal disease (posiition paper). *J Periodontol.*, v.76, p.1406-1419, 2005.

AXELL et al. Revised Classification of HIV – associated oral lesions. *Brit Den J*, v.170, n.8, p.305-6, April 1991 *apud* Souza Lélia Batista et al. Manifestações orais em pacientes com AIDS em uma população brasileira. *Pesq Odont Brás.* v.14, n.1, p.79-85, jan/mar, 2000.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and control of immunity. *Nature* v.392, p.245-252, 1998.

BARON S. et al. Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminal fluid and milk: a novel mechanism. *J. Intect. Dis.* v.181, p. 498-504, 2000.

BATISTA A.C., RODINI C.O., LARA V.S., Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis.* n.11, p.249-254, 2005.

BECK J.D. et al. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J. Periodontol.*, v.61, p.521-528, 1990.

BERGLUNDH T., LILJENBERG B., LINDHE J. Some effects of periodontal therapy on local and systemic immunological parameters. *J. Clin. Periodontol.*, v.26, p.91-98, 1999.

BERGLUNDH T., LILJENBERG B., LINDHE J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.29, p.705-709, 2002.

BORROW P., EVANS C.F., OLDSTONE M.B. Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J. Virol.* v.69, p.1059-1070, 1995.

CEBALLOS-SALOBRENA A., AGUIRRE-URIZAR J.M., BAGAN-SEBASTIAN J.V. Oral manifestations associated with human immunodeficiency virus infection in a Spanish population. *J. Oral Pathol. Med.* v.25, p.523-526, 1996.

ÇELENLIGIL H. et al. Immunohistological analysis of gingival lymphocytes in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.17, p.542-548, 1990.

CIRRINCIONE C. et al. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J. Periodontol.*,v.73, p.45-52, 2002.

CURY P.R., FURUSE C., ARAÚJO N.S. et al. Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis. *Braz Oral Res.*v. 22, n.3, p.258-263, 2008.

CUTLER C.W. et al. Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J. Periodontol. Res.*, v.34, p.406-412, 1999.

CUTLER C.W., JOTWANI R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000*, v.35, p.135-157, 2004.

DEREKA X.E. et al. Factor XIIIa+ dendritic cells and S-100 protein+ Langerhans Cells in adult periodontitis. *J Periodontol. Res.*, v.39, p.447-452, 2004.

FRIEDMAN SR; DES JARLAIS DC. HIV among drug injectors: The epidemic and the response. *AIDS*. v.3, n. 3 1991, p.239-250, 1991.

FICARRA G., SHILLITOE JE. HIV-Related Infections of the Oral Cavity. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* v. 3, n. 3, p.207-231,1992.

GALLI S.J., KITAMURA Y. Genetically mast-cell-deficient *W/W^v* and *SL/SL^d* mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *Am. J. Patol.*, n. 127, p. 191-198, 1987.

GEMMELL E., CARTER C.L., SEYMOUR G.J. Mast cells in human periodontal disease. *J. Dent. Res.*, v.83, p.384-387, 2004.

GEMMELL E., SEYMOUR G.J. Gamma delta lymphocytes in human periodontal disease tissue. *J. Periodontol.*, v., p.780-785, 1995.

GEMMELL E., RODERICK I., SEYMOUR G.J. Characterization of T lymphocyte clones derived from *Porphyromonas gingivalis* infected subjects. *J. Periodontol. Res.*, v.31, p.47-56, 1996.

GEMMELL E., SEYMOUR G.J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v.35, p.21-41, 2004.

GEMMELL E., WALSH L.J., SEYMOUR G.J. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J. Periodontol. Res.*, v.29, p.46-53, 1993.

GIACOMETTI L, MONTAGNA W. Langerhans cells. Uptake of tritiated thymidine. *Science*, v.157, p.439-440, 1967.

GLICK M., MUZYKA B.C., SALKIN L.M. et al. Necrotizing ulcerative periodontitis: a marker for immune deterioration and a predictor for the diagnosis of AIDS. *J. Periodontol.* n.65, p. 393-397, 1994.

GONÇALVES L.S., FERREIRA M.S., COLOMBO A.P. Association of T CD4 lymphocyte

levels and chronic periodontitis in HIV – infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy:clinical results. *J. Periodontol.*, v.76, p.915-922, 2005.

GONÇALVES L.S., FERREIRA M.S., COLOMBO A.P. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV) – seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV – seronegative Brazilians with chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 78, n. 1, p. 87-96, jan., 2007.

GOMEZ R.S., SOUZA P.E., COSTA J.E. & ARAUJO N.S.. CD30+ lymphocytes in chronic gingivitis from HIV-positive patients:a pilot study. *J. Periodontol.*,v.68, p.881-884, 1997.

GRUBER B.L., et al. Activation of latent rheumatoid synovial collagenase by human mast cell tryptase. *J. Immunol.*, n.140, p. 3936-3942, 1988.

GÜNHAN M., BOSTANCI H., GÜNHAN O. et al. Mast cells in periodontal disease. *Ann Dent.* n.50, p.25-29, 1991.

GUSTAFSSON A. et al. Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.33, p.126-129, 2006.

HOFER D. et al. Long-term results of supportive periodontal therapy in HIV-seropositive and HIV-seronegative patients. *J. Clin. Periodontol.*,v.29, p.630-637, 2002.

HODGSON T.A., NAIDOO S., CHIDZONGA M. et al. Identification of oral health care needs in children and adults, management of oral diseases. *Adv. Dent. Res.* 2005 (in press) apud *Bulletin of the World Health Organization.* v.83, n.9, p.700-706, sep, 2005.

HUANG Y. et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.*, v.2, p.1240-1243, 1996.

JAMESON B. et al. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans e rhesus macaques *J. Vitrol.*, v.76, p.1855-1875, 2002.

JEFFCOAT M.K., WILLIAMS R.C., JOHNSON H.G. Treatment of periodontal disease in beagles with Iodoxamine ethil, an inhibitor of mast cell release. *J. Periodont. Res.*, n.20, p.532-541, 1985.

JOTWANI R. et al. Mature dendritic Cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo and in Vitro studies. *J. Immunol.*, v.167, p.4693-4700, 2001.

JOTWANI R., CUTLER C.W. Multiple Dendritic cell (DC) subpopulations in human gingival and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J. Dent. Res.*, v.82, p. 736-741, 2003.

JOTWANI R., MUTHUKURU M., CUTLER C.W. Increase in HIV receptors/co-receptors/ α -defensins in inflamed human gingival. *J. Dent. Res.*, v.83, p.371-377, 2004.

KENNETT C.N. et al. Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingival. *J. Periodontol.*, v.64, p.870-877, 1993.

KLEIN R.S., QUART A.M., SMALL C.B. Periodontal disease in heterosexuals with acquired immuno-deficiency syndrome. *J. Periodontol.*, v.62, p.535-540, 1991.

KNIGHT S.C. Mechanisms of retrovirally induced immunosuppression acting via dendritica cells. *Ad. Exp. Med. Biol.* v.378, p.423-427, 1995.

KITAMURA Y. et al. Mi-transcription factor as a regulator of mast cell differentiation. *Int. J. Hematol.*, v.71, p.197-202, 2000.

- LAPPIN D.F. et al. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *J Clin Periodontol.*, v.26, p.183-189, 1999.

LAVKER R.M., SCHECHTER N.M. Cutaneous mast cell depletion results from topical corticosteroid usage. *J. Immunol.*, n.135, p.2368-2371, 1985.

LIN T.J., BEFUS A.D. Mast cells and eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. In: *Mucosal Immunology*, eds. Ogra, P.L., Mestecky, J., Lamm M.E., p.469-482, 1999.

LINDHE J., THORKIL K., LANG N.P. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005,1013 p.

LOMBARDI T, HAUSER C, BUDTZ-JÖRGENSEN E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.193-202, 1993.

HODGSON T.A., GREENSPAN D., GREENSPAN J.S. Oral Lesions of HIV Disease and HAART in Industrialized Countries *Adv. Dent. Res.* v.19, p.57-62, 2006.

MACKENZIE I.C. Labelling of murine epidermal Langerhans cells with h-thymidine. *Am. J. Anatom.*, v.144, p.127-136, 1975.

MACKEWICZ C.E. et al. Alpha-defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* v.17, p.23-32, 2003.

MARTINEZ-CANUT P., GUARINOS J., BAGÁN J.V. et al. Periodontal disease in HIV seropositive patients and its relation to lymphocyte subsets. *J. Periodontol.* n. 66, p.367-376, 1996.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T- cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, v.17, n.3, p. 138-146, mar., 1996.

MYINT M. et al. Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingival from patients with HIV infection. *AIDS* v.16, p.235-243, 2002.

MYINT M., Yuan Z.N., Schenck K. Reduced number of Langerhans cells and increase HLA-DR expression in keratinocytes in oral gingival epithelium of HIV-infected patients with perionitis. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.513-519, 2000.

MYINT M. et al. The gingival plasma cell infiltrate in HIV – positive patients with periodontitis is disorganized. *J. Clin. Periodontol.*, v. 26, p.358-365, 1999.

NÆSSE E.P.et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in

persons with and without HIV-infection . *J. Periodontol. Res.*, v.38, p.575-582, 2003.

NEWCOMB G.M., POWELL R.N. Human gingival Langerhans cells in health and disease. *J. Periodontol. Res.*, v.21, p.640-652, 1986.

NEWCOMB GM, SEYMOUR GJ, POWELL RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *J. Clin. Periodontol.*, v.9, p.297-304, 1982.

ODDEN K., SCHENCK K., HURLEN B. High numbers of T cells in gingiva from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J. O Pathol Med.*, v.24, p.413-419, 1995.

OKADA H, KIDA T, YAMAGAMI H. Characterization of the immunocompetent cells in human advanced periodontitis. *J. Periodontol. Res.*, v.17, p.472-473, 1983.

PAGE R.C., SCHROEDER H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Labor. Invest.* v.34, p.235-249, 1976.

PAPAPANOU P.N. Periodontal diseases: epidemiology *Ann Periodontol.* v.1, n.1, p.1-36, nov 1996.

PATEL M., COOGAN M.M., GALPIN J.S. Periodontal pathogens in subgingival plaque of HIV-positive subjects with chronic periodontitis. *Oral Microb. Immunol.*, v.18, p. 199-201, 2003.

PIMPINELLI N. et al. Immune cell infiltration in periodontal lesions of HIV infected subjects. Antigenic and ultra-structural features. *Eur. J. Dermatol.*, v.5, p.607-613, 1995.

QUIMONES-MATEAU M.E. et al. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS* v.17, p.39-48, 2003.

RAMIREZ-AMADOR V. et al. The changing clinical spectrum of human immunodeficiency virus (HIV)-related oral lesions in 1,000 consecutive patients: a 12-year study in a referral

center in Mexico. *Medicine*. v. 82, p.39-50, 2003.

RAPPERSBERGER K. et al. Langerhans cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* v.29, p.185-94, 1988.

-REINHARDT R.A. et al. Lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J. Periodontol.*, v.59, p.656-670, 1988.

ROBINSON P.G. et al. A controlled study of relative periodontal attachment loss in people with HIV infection. *J. Clin. Periodontol.*, v.27, p.273-276, 2000.

ROBSON L.P. & DE MARCO T.J. Alteration of mast densities in experimentally inflamed human gingivae. *J. Periodontol.* v.43, p.614-622, 1972.

SAGLIE F.R. et al. The presence of bacteria in oral epithelium in periodontal disease *J Periodontol.*, v.57, p.417-422, 1987.

SÉGUIER S, GODEAU G, BROUSSE N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Arch Oral Biol.*, v., p.441-452, 2000a.

SÉGUIER S. et al. Quantitative morphological analyses of Langerhans cells in healthy and diseased human gingival. *Arch. Oral Biol.*, v.45, p.1073-1081, 2000b.

SEYMOUR G.J., GEMMELL E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol. Scand.*, v.59, p.167-173, 2001.

SHAPIRO S, ULMANSKY M, SCHEUER M. Mast cell population in gingivae affected by chronic destructive periodontal disease. *Periodontics*, v.40, p.276-278, 1969.

SHIRAI A. et al. Human human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation *J. Clin. Invest.*, v.89, p.561-566, 1992.

SCHENKEIN H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining

periodontal disease. *Periodontol.* 2000, v.40, p. 77-93, 2006.

SILBERBERG-SINAKIN I., BAER R.L., THORBECKE G.J. Langerhans cells. A review of their nature with emphasis on their immunologic functions. *Prog. Allergy.* v.37, p.268-294, 1978.

SMITH G.L.F., CROSS D.L., WRAY D. Comparison of periodontal disease in HIV seropositive subjects and controls. *J. Clin. Periodontol.*, v.22, p.558-568, 1995.

STEIDLEY K.E. et al. A comparison of T4:T8 lymphocyte ratio in the periodontal lesion of healthy and HIV-positive patients. *J. Periodontol.*, v.63, p.753-756, 1992.

STEINSVOLL S., HELGELAND K., SCHENCK K. Mast cells – a role in periodontal disease? *J. Clin. Periodontol.*, n.31, p.413-419, 2004.

SUEKI H., WHITAKER D., BUCHSBAUM M. et al. Novel interactions between dermal dendrocytes and mast cells in human skin: implications for hemostasis and matrix repair. *Lab. Invest.* n.69, p. 160-172, 1993.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, v.9, n. 10, p. 866-873, jul., 1995.

TELESHOVA N., FRANK I., POPE M. Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection *J. Leuk. Biol.*, v.74, p.683-688, 2003.

TONETTI M.S., CLAFFEY N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J. Clin. Periodontol.*,suppl. v.6, p.210-3, 2005.

-UKAY T., et al. Immunohistological study of interferon γ and interleukin 4 bearing cells in human periodontitis gingival. *Arch. O. Biol.*, v.46, p.901-908, 2001.

UNAIDS Content Management Team. Report on the global HIV/AIDS epidemic 2009:

executive summary. 36p.

VASTARDIS S., LEIGH J.E., WOZNIAK K. et al. Influence of periodontal disease on Th1/Th2-type cytokines in saliva of HIV-positive individuals. *O. Microb. Immunol.*,v.18, p.88-91, 2003.

WALSH L.J. Mast cells and oral inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, n. 14, v. 3, p. 188-198, 2003.

WALSH L.J., ISHII T., SEYMOUR G.J. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.*, n.19, p.177-181, 1993c.

WALSH L.J., KAMINER M.S., LAZARUS G.S. Role of laminin in localization of human dermal mast cells. *Lab. Invest.* n.65, p. 433-440, 1991.

WALSH L.J. Mast cells and oral inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*,v.14, 188-198, 2003.

WOOD G.S., WARNER N.L., WARNKE R.A. Leu3/T4 antibodies react with cells of monocyte/macrophage and Langerhans lineage. *J. Immunol.*, v.131, p.212-6, 1983.

-YAMAZAKI K. et al. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, v.28, p.324-334, 1993.

YEUNG S.C., STEWART G.J., COOPER D.A., SINDHUSAKE D. Progression of periodontal disease in HIV seropositive patients. *J. Periodontol.*,v.64, p.651-657, 1993.

YEUNG S.C., TAYLOR B.A., SEYMOUR G.J. IgG subclass specific antibody response to periodontopathic organisms in HIV-positive patients. *J. Periodontol.*,v.73, n. 12, p.1444-1450, dez, 2002.

YIN M.T., DOBKIN J.F., GRBIC J.T. Epidemiology, pathogenesis and management of human immunodeficiency virus infection in patients with periodontal disease. *Periodontol 2000.*, v.44, p.55-81, 2007.

ZAVALA W.D., CAVICCHIA J.C. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. *Arch Oral Biology.*, v.51, p.1150-1155, 2006.

ZHANG L. et al. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus co-receptors: CXCR4, CCR3, and CCR5 *J.Vitrol.* v.72:5035-5045, 1998.

ZHAO Z.Z., SUGERMAN P.B., WALSH L.J., A fluorometric microassay for histamine release from human gingival mas cells. *J. Periodontal. Res.*, n.36, p. 233-236, 2001.

ZHAO Z.Z.,SAVAGE N.W., WALSH L.J. et al. Mast cell/T cell interations in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.*, n.31, p.189-195, 2002b.

ANEXOS

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, PATOLOGIA E CIRURGIA ODONTOLÓGICAS

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__.

Prezado paciente,

Estamos realizando uma pesquisa para avaliar as células da inflamação na gengiva de indivíduos com doença periodontal em pacientes positivos e negativos para o vírus HIV. Para isso precisamos analisar pequenos pedaços de gengiva que são removidos durante a fase de cirurgia do tratamento. O tratamento da gengiva será realizado no próprio CTR/DIP para os indivíduos HIV positivos e na Faculdade de Odontologia da UFMG para os indivíduos HIV negativos. Gostaríamos de contar com sua colaboração, esclarecendo que:

1- A pesquisa consiste em preenchimento de prontuário odontológico do CTR/DIP e da FO-UFMG, onde deverão constar: radiografias recentes, exames de sangue contendo contagem de CD4 e CD8, plaquetas e carga viral.

2- Somente poderão ser atendidos os pacientes com avaliação e liberação do médico responsável, como qualquer outro procedimento do serviço uma vez que envolve procedimentos cirúrgicos que apenas se realizam nestas condições.

3- Não há nenhum risco para o paciente uma vez que o tratamento o qual será submetido é um procedimento de rotina na clínica de tratamento da gengiva. As cirurgias da gengiva estão indicadas durante o tratamento e a remoção do material também está previsto na técnica cirúrgica. Não existe a proposta de nenhum tratamento ou técnica nova. Estes pedaços de gengiva que seriam jogados fora é que irão fazer parte da pesquisa.

4- O atendimento será com material estéril, seguindo o protocolo de esterilização do serviço odontológico do CTR/DIP e da FO-UFMG.

5- Não há nenhum gasto por conta do paciente e também nenhuma remuneração.

6- Não há nenhum risco para o paciente, pois trata-se de um tratamento clínico de rotina e aqueles com alguma deficiência de saúde, serão encaminhados para o atendimento médico e posteriormente atendidos, desde que com liberação médica.

7- Como todo tratamento da gengiva, uma boa escovação dentária por parte do paciente é fundamental. Caso o mesmo não consiga um controle ótimo, a inflamação irá retornar.

8- O benefício deste tratamento é a remoção da causa da inflamação, para não ocorrer o sangramento gengival e controlar a perda óssea, que se não tratada poderá levar a perda do dente.

9- Todos os participantes poderão, a qualquer momento, desistir de fazer parte dessa pesquisa, sem prejudicar o tratamento da gengiva.

10- Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente, em hipótese alguma, e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

11- Também os dados coletados de cada paciente poderão ser excluídos, a qualquer momento, a critério do sujeito dessa pesquisa.

Desde já agradecemos sua colaboração. Os telefones dos pesquisadores para quaisquer esclarecimentos são:

- Takeshi kato Segundo 3241-1258
- Ricardo Alves de Mesquita 3499-2478
- Comitê de Ética em Pesquisa SMSA/PBH 3277- 8222.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ estou ciente que possuo inflamação gengival e necessito de tratamento da gengiva. Concordo em participar deste estudo que visa a remoção da causa da inflamação que é o tártaro. Durante o tratamento, os casos mais graves necessitam de cirurgia; é durante a cirurgia que pequenas partes de gengiva serão retiradas como parte da técnica cirúrgica. Este material que seria jogado fora é que será avaliado na pesquisa. Neste fragmento gengival serão avaliados as células da inflamação presentes e seu número, para posterior comparação com o outro grupo de pacientes.

Após entender os objetivos e métodos da pesquisa acima descritos, voluntariamente autorizo e aceito participar desta pesquisa, que faz parte do Doutorado em Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG, desde que seja resguardado minha identidade.

Tenho pleno conhecimento de que o principal objetivo é o tratamento periodontal e remoção da biópsia. Dou pleno direito de uso, para fins de pesquisa e de divulgação de jornais e/ou revistas científicas especializadas no País e no Exterior.

Assinatura do paciente ou responsável

Documento de Identidade: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 514/07

Interessado (a): Prof. Fernando de Oliveira Costa
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, no dia 11 de março de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Imunofenotipagem da doença periodontal em pacientes saudáveis e soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana”** com a recomendação de que seja alterado o número de telefone do Comitê no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP/UFMG