

GIOVANNA RIBEIRO SOUTO

**EFEITO DO TABAGISMO NAS CÉLULAS DE
LANGERHANS E DENDRÍTICAS EM INDIVÍDUOS COM
GENGIVITE CRÔNICA**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2010

GIOVANNA RIBEIRO SOUTO

**EFEITO DO TABAGISMO NAS CÉLULAS DE
LANGERHANS E DENDRÍTICAS EM INDIVÍDUOS COM
GENGIVITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2010

S728e Souto, Giovanna Ribeiro
2010 Efeito do tabagismo nas células de langerhans e dendríticas
em indivíduos

T com gengivite crônica / Giovanna Ribeiro Souto. 2010.
73 f.:il.

Orientador: Ricardo Alves de Mesquita

Co-orientadora: Fernando de Oliveira Costa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas

Gerais,

Faculdade de Odontologia.

1. Tabagismo – Efeitos Adversos – Teses. 2. Células
Dendríticas -

Efeitos de Drogas - Teses. I. Mesquita, Ricardo Alves de .II.

Costa,

Fernando de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas

Gerais. Faculdade

de Odontologia . IV. Título.

BLACK

D047

DICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus amados pais pelo amor incondicional, alicerce e esforços dedicados à minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar o meu caminho.

Ao Professor Ricardo Mesquita pela orientação, incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Fernando, pela co-orientação, aprendizado e disponibilidade.

Ao Professor Vagner Santos, que me guiou no início da graduação a buscar a pesquisa, sempre disposto a ajudar.

Aos Professores Ricardo Gomez, Maria Cássia, Maria Auxiliadora e Tarcília pela confiança, carinho e aprendizado.

Ao Professor Mauro Henrique pelo auxílio na análise estatística.

Aos amigos e colegas de trabalho do Centro de Saúde Rio Branco pelo apoio, compreensão e incentivo. Em especial à Andréia pela flexibilidade, compreensão e disponibilidade muito importantes para realização deste trabalho.

À Heloísa e à Inês pela paciência e disponibilidade em todos os momentos.

Aos pacientes, que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

À Bruna, Carol, Jane, Janaína, Mariana e Tallita pela amizade verdadeira.

Ao Teco, pelo carinho e incentivo constantes durante toda essa jornada.

Aos padrinhos Riva e Denízia, e Arthur pelo carinho e apoio muito importantes e todos os meus familiares que sempre incentivam de alguma forma.

À Adriana, Alfonso Gala-García, Ana Carolina, Augusto, Cláudia, Daniela, Elizete, Fred, Fabrício, Jeane, João, Juliana, Marcelo, Paula, Renata, Sílvia, Tânia, Takeshi, Telma e Vanessa, em especial Aline e Patrícia pelo companheirismo e amizade construídos ao longo dessa trajetória.

Às minhas irmãs pelo amor fraterno.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e ao colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG pelo auxílio e apoio.

O sonho

“Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem

a importância das pessoas que passaram por suas vidas.”

Clarice Lispector

RESUMO

Introdução: Resultados contrastantes têm sido descritos na literatura considerando a contagem das células dendríticas (CD) na doença periodontal. Embora o fumo diminua o número de CD no tecido pulmonar, ainda não foi investigado o efeito do hábito de fumar nas células de Langerhans (CL) e CD na gengivite crônica.

Métodos: Amostras gengivais de indivíduos com gengivite crônica foram obtidas de 30 pacientes, fumantes (F) e não-fumantes (NF). A técnica imunoistoquímica foi utilizada para identificar as CL imaturas (CD1a+) e CD maduras (CD83+). O infiltrado inflamatório foi avaliado e contado. A densidade de células (número/mm²) foi calculada no epitélio bucal (EB), epitélio do sulco (ES) e lâmina própria (LP) para as células CD1a+ e na LP para as células CD83+. Estes resultados foram comparados entre os grupos. Este estudo avaliou se um maior número de cigarros e o tempo do hábito do fumo afetaram a densidade de células. Foram feitas correlações entre as densidades de CL e CD com densidade do infiltrado inflamatório, número de cigarros e tempo do hábito de fumar.

Resultados: As densidades do infiltrado inflamatório e das células CD1a+ do ES e da LP foram significativamente menores para os fumantes do que para os não-fumantes ($p < 0,05$). O mesmo não foi observado para as células CD1a+ do EB e células CD83+ da LP. O número de cigarros e tempo do hábito de fumar não afetaram a densidade de células. Não houve correlação significativa entre a densidade de CL, CD com infiltrado inflamatório, número de cigarros e tempo do hábito de fumar.

Conclusões: O hábito de fumar afeta a distribuição das CL e CD na gengivite crônica. Estes resultados podem explicar em parte diferenças na progressão da doença periodontal entre F e NF.

Palavras-chave: antígeno CD1a, antígeno CD83, células dendríticas, gengivite, células de Langerhans, fumo.

Effect of smoking in Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis

ABSTRACT

Background: Prior literature has shown contrasting results regarding dendritic cell (DC) counts in periodontal diseases. Although smoking does decrease the number of DC in the lungs, the effect of smoking on the quantitative distribution of Langerhans cells (LC) and DC within chronic gingivitis has not yet been investigated.

Methods: Gingival samples were obtained from 30 patients, smokers and non-smokers. Immunohistochemical staining was performed to identify CD1a+ immature LC and CD83+ mature DC. Inflammatory infiltrate was evaluated and counted. Density of the cells was calculated within the oral epithelium (OE), sulcular epithelium (SE), and lamina propria (LP) for CD1a+ cells and within the LP for CD83+ cells. These results were compared between the groups. This study sought to evaluate whether or not the high number of cigarettes and the time of smoking actually affected the density of cells. The correlations among the densities of LC and DC with the densities of inflammatory infiltrate, number of cigarettes, and time of smoking was performed.

Results: Density of inflammatory infiltrate and CD1a+ cells from SE and from LP was significantly lower for smokers than for non-smokers ($P < 0.05$). This was not a result for CD1a+ cells from OE and CD83+ cells from LP. The number of cigarettes and time of smoking did not affect the density of cells. No statistically significant correlation could be drawn between the density of LC and DC and Inflammatory infiltrate, number of cigarettes, and time of smoking.

Conclusions: Smoking proved to affect the quantitative distribution of LC and DC in chronic gingivitis.

Keywords: CD1a antigen, CD83 antigen, dendritic cells, gingivitis, Langerhans cells, smoking.

ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	- células dendríticas
CEP	- comitê de ética em pesquisa
CL	- células de Langerhans
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	- comitê de ética em pesquisa
DAB	- diaminobenzidina
EB	- epitélio bucal
ES	- epitélio do sulco
EUA	- Estados Unidos da América
F	- fumantes
FO	- Faculdade de Odontologia
HE	- hematoxilina e eosina
IL	- interleucina
LP	- lâmina própria
LPS	- lipopolissacarídeos
MA	- Macrófagos alveolares
NF	- não-fumantes
OPG	- osteoprotegerina
PBH	- Prefeitura Municipal de Belo Horizonte
PIC	- perda de inserção clínica

PMN	- polimorfonucleares neutrófilos
PS	- profundidade de sondagem
SS	- sangramento à sondagem
TNF	- fator de necrose tumoral
Tris-HCl	- hidroximetil aminometano e ácido clorídrico
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Imunopatologia da Doença Periodontal	13
2.2 Fumo e Doença Periodontal	16
2.3 As Células de Langerhans e Células Dendríticas	18
2.4 Células de Langerhans e Células Dendríticas na Doença Periodontal	21
2.5 Células de Langerhans, Células Dendríticas e o Fumo	25
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 METODOLOGIA	29
5.1 Desenho Experimental e População do Estudo	29
5.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	29
5.3 Análise da inflamação	30
5.4 Análise Imunoistoquímica	31
5.5 Análise da imuno-expressão e contagem das células	33
5.6 Análise estatística	34
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
ARTIGO - Quantitative analysis of Langerhans cells and dendritic cells in smokers and non-smokers with gingivitis chronic	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
8 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	69
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFMG	69
ANEXO B- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PBH	70
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	71

1. INTRODUÇÃO

A gengivite é uma doença crônica em resposta à presença de biofilme que pode evoluir para a periodontite. No entanto, nem todos os indivíduos com gengivite irão progredir para a periodontite, e nem todos os indivíduos com periodontite irão perder o dente [Lindhe et al., 1975; Cullinan et al., 2003]. Portanto, indivíduos podem responder de forma variável à presença do biofilme, mas os fatores que contribuem para a susceptibilidade do paciente são ainda pouco compreendidos [Loe et al., 1965; Ohlrich et al., 2009].

A resposta imunológica é característica em cada estágio da doença, e gengivite e periodontite possuem contagem de células inflamatórias distintas [Ohlrich et al., 2009]. Gemmell and Seymour [1995] mostraram um aumento na proporção de células T com um aumento do infiltrado inflamatório na gengivite. Em outro estudo, Gemmell & Seymour [1998] observaram um aumento na contagem de células T no sangue periférico, sugerindo que esta migração celular para a gengiva pode ocorrer durante o processo de gengivite.

Na progressão da gengivite para a periodontite é estabelecido que existe uma mudança de lesões predominantemente de linfócitos T para lesões de linfócitos B [Kinane and Mark Bartold, 2007]. Diferentes células apresentadoras de antígenos podem ser responsáveis por direcionar as células T para uma resposta mediada por células (Th1) ou para uma resposta humoral (Th2) [Berglundh and Donati, 2005; Kinane and Mark Bartold, 2007]. Possivelmente, isso ocorre através da apresentação de diferentes epítomos antigênicos que resultam na secreção de diferentes padrões de citocinas [Gemmell and Seymour, 2004]. Os fatores que levam aos diferentes tipos de resposta podem estar associados com mudanças na natureza microbiológica bem como a fatores de susceptibilidade genética e ambientais [Ohlrich et al., 2009].

Estudos epidemiológicos têm correlacionado positivamente a frequência e o consumo de cigarros com aumento dos níveis de risco para doença periodontal [Haber

et al., 1993; Grossi et al., 1995]. Uma expressão da doença mais grave entre os fumantes quando comparado com os ex-fumantes, e mais ainda com os que nunca fumaram, também é observada [Grossi et al., 1995; Papantonopoulos, 2004]. De acordo com Salvi et al. [1997], fumantes têm cinco vezes mais possibilidade de desenvolver periodontite severa do que não-fumantes. Apesar dos estudos apresentarem uma relação causal entre fumo e doença periodontal, ainda não se sabe ao certo o que acontece quando o tecido periodontal é exposto aos componentes do cigarro [Haber et al., 1993]. O mecanismo mais plausível para explicar essa relação é que os componentes do cigarro interagem com as células do indivíduo afetando a resposta inflamatória às mudanças microbiológicas [Grossi et al., 1995].

As células de Langerhans (CL), um subtipo de células dendríticas (CD) originados na medula óssea, tem sido encontradas em tecido gengival saudável e com doença [Dereka et al., 2004]. Na gengivite ou periodontite, CL imunocompetentes constituem uma rede de capturar antígenos, capazes de interiorizar antígenos patogênicos, levá-los aos nódulos linfáticos regionais e lá iniciar a proliferação de células T antígeno – específico [Barrett et al., 1996]. Estudos têm demonstrado a presença de numerosas CL imaturas CD1a+ e CD maduras CD83+ no epitélio e lâmina própria de gengiva saudável, gengivite crônica e periodontite crônica [Jotwani et al., 2001; Jotwani and Cutler, 2003].

Diferentes estudos mostram discrepâncias em relação ao número de CD na doença periodontal [Jotwani and Cutler, 2003]. É observado aumento na distribuição quantitativa na gengivite e periodontite [Newcomb et al., 1982, DiFranco et al., 1985, Hitzig et al., 1989], diminuição do número na gengivite e periodontite em comparação a tecidos saudáveis [Séguier et al., 2000b], ou nenhuma mudança quantitativa [Gemmell et al., 2002a] no epitélio gengival durante a inflamação. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que em alguns estudos as CD foram avaliadas por diferentes técnicas [Newcomb et al., 1982] ou marcadores [DiFranco et al., 1985; Hitzig et al., 1989; Séguier et al., 2000b; Gemmell et al., 2002a]. Além disso, tais

divergências podem ser explicadas pelas variações na idade [Zavala and Cavicchia, 2006] ou ainda pela ausência de estudos relacionando o hábito de fumar [Cury et al., 2008].

Estudos têm mostrado que o tabagismo diminui o número de CD no tecido pulmonar e que a exposição crônica ao tabaco prejudica a resposta imune contra infecções virais, além de aumentar a prevalência de doenças pulmonares obstrutivas crônicas em fumantes [Robbins et al., 2004; Tsoumakidou et al., 2007; Robbins et al., 2008].

As CL e CD são células encontradas na gengiva e por terem um papel importante na resposta imune celular contra patógenos periodontais, estimulando a migração de células inflamatórias para o local da inflamação, podem ter participação essencial na iniciação e no desenvolvimento da inflamação gengival. No entanto, a quantidade de CL e CD no tecido gengival ainda é controverso. Embora o fumo diminua o número de CD no pulmão, ainda não tem sido avaliado o efeito do fumo na distribuição quantitativa das CL e CD na gengivite crônica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Imunopatologia da Doença Periodontal

A gengivite é uma doença crônica em resposta à presença de biofilme. No entanto, indivíduos podem responder de forma variável à presença do biofilme, em relação a outros [Loe et al., 1965; Ohlrich et al., 2009]. Assim, sabe-se que a biofilme bacteriana é o agente etiológico da doença periodontal [Loe et al., 1965], porém os fatores que contribuem para a susceptibilidade do paciente são ainda pouco entendidos. Nem todos os indivíduos com gengivite irão progredir para a periodontite, e nem todos os indivíduos com periodontite irão perder o dente [Lindhe et al., 1975, Cullinan et al., 2003].

Durante algum tempo, os estudos focaram a identificação de patógenos periodontais específicos baseados no conceito de que a presença desses organismos predispõe ao desenvolvimento da doença. No entanto, Cullinan et al. [2003] demonstraram, em um estudo longitudinal, que existe uma grande volatilidade na aquisição e perda desses organismos, e que pessoas podem ter alguns desses patógenos e não manifestar a doença. Associado a isso, os fatores ambientais como o fumo e estresse tem um grande impacto na expressão da doença afetando a resposta do hospedeiro a esses patógenos [Ohlrich et al., 2009].

De acordo com Page e Schroeder [1976] o desenvolvimento da inflamação gengival é dividido em alguns estágios. A lesão inicial, estabelecida e progressiva, estágios seqüenciais da gengivite, seguido pela lesão avançada, como a manifestação clínica da periodontite.

A lesão inicial ocorre cerca de quatro dias após o acúmulo de biofilme, e é caracterizada pela formação de edema, aumento do fluido gengival, aumento de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e pouca destruição de tecido conjuntivo. Nesse estágio o infiltrado pode ocupar de 5 a 10% do tecido conjuntivo, mas ainda não é

cl clinicamente evidente. Aproximadamente de quatro a sete dias após o acúmulo de biofilme a doença se torna estabelecida. A lesão que primariamente era composta de PMN aumenta o número de macrófagos e linfócitos. Até o 21º dia, o número de linfócitos pode chegar a cerca de 85% do infiltrado, enquanto os macrófagos podem compor até 11% e além disso, mudanças vasculares se tornam mais evidentes. Essas mudanças são clinicamente observadas no período de 12 a 21 dias. Os linfócitos são predominantemente células T com uma relação CD4:CD8 de 2:1 [Page and Schroeder, 1976] e o aumento do número de CL é visto tanto no epitélio bucal como no sucular [Newcomb et al., 1982; Seymour et al., 1983; Seymour et al., 1988; Jotwani et al., 2001; Cury et al., 2008].

A gengivite pode ser considerada uma resposta imunológica bem controlada, mas devido à permanência do biofilme dental, a resposta imunológica persiste, ao invés de resolver. Dessa forma, a resposta inflamatória prolongada torna a gengivite uma lesão de natureza crônica. Contudo, quando o biofilme é removido, o tecido gengival repara e remodela, não havendo nenhum dano permanente ou alteração persistente na arquitetura tecidual [Ohlrich et al., 2009].

Em alguns pacientes a presença de fatores ambientais, susceptibilidade inata ou ambos levam a uma mudança na lesão de estabelecida para progressiva. Na progressiva observa-se a ocorrência de uma resposta imune adaptativa de células B. Além da produção de altos níveis de interleucina (IL)-1 e IL6 e subsequente destruição do tecido conjuntivo e perda de osso. A perpetuação desse processo inflamatório leva a uma contínua destruição tecidual. As alterações histológicas passam a ser observadas clinicamente, resultando em um quadro de periodontite [Gemmell et al., 1997]. É estabelecido que exista uma mudança de lesões predominantemente de linfócitos T para lesões de linfócitos B na progressão da gengivite para a periodontite [Kinane and Mark Bartold, 2007]. Durante o desenvolvimento da doença periodontal, ocorre uma mudança da imunidade mediada por células (Th1) para imunidade humoral (Th2) [Berglundh and Donati, 2005; Kinane and Mark Bartold, 2007].

Diferentes células apresentadoras de antígenos podem ser responsáveis por direcionar as células T para uma resposta do tipo Th1 ou Th2, possivelmente através da apresentação de diferentes epítomos antigênicos resultando na secreção de diferentes padrões de citocinas [Gemmell and Seymour, 2004]. Os fatores que levam uma lesão a apresentar características de uma resposta do tipo Th1 e outra resposta do tipo Th2 podem estar associados com mudanças na natureza microbiológica bem como fatores de susceptibilidade genética e ambientais. É importante considerar que esses fatores podem ser modificados e identificados clinicamente [Ohlrich et al., 2009].

A susceptibilidade à doença periodontal envolve a interação entre bactéria, fatores do hospedeiro e ambiental. É bem estabelecido que bactérias no biofilme sejam a causa da inflamação [Loe et al., 1965; Ohlrich et al., 2009]. No entanto, desde 1970 tem sido esclarecido que nem sempre a presença do biofilme resulta na progressão da doença. Três espécies de bactérias são consideradas como principais patógenos periodontais: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia*. Embora esse conceito tenha apoio geral, é também bem reconhecido que a presença destas bactérias patogênicas por si só não é suficiente para causar a doença [Seymour and Taylor, 2004].

Estudos indicam que existe uma importante contribuição genética para o desenvolvimento da periodontite crônica. Esses estudos sugerem que a genética pode, em parte, determinar as citocinas e o perfil de anticorpos e, conseqüentemente a susceptibilidade à determinados patógenos [Gemmell et al., 2002b; Gemmell et al., 2004; Gosling et al., 2005].

Apesar dos estudos mostrarem um aumento na susceptibilidade à doença periodontal associado ao polimorfismo de genes [Kinane et al., 2005], em alguns casos esse polimorfismo contribui, mas não é essencial na progressão da doença [Cullinan et al., 2001]. Estudos longitudinais mostraram interação direta entre o fumo, idade, *P. gingivalis* e a doença periodontal. Entretanto, esses fatores associados ao

genótipo positivo para IL-1 ou IL-10 podem aumentar em 80% o risco de desenvolver a doença. [Cullinan et al., 2001; Mullally, 2004].

Fatores do hospedeiro são de fundamental importância. Neste contexto, a maneira pelo qual a resposta do hospedeiro às bactérias ocorre é determinada pela natureza e controle das respostas imunes inata e adaptativa [Seymour and Taylor, 2004].

2.2 Fumo e Doença Periodontal

O fumo é um fator de risco para a doença periodontal [Mullally, 2004]. Essa afirmação é advinda de estudos epidemiológicos em que a frequência ou o consumo de certa quantidade de cigarros por um período de tempo foi positivamente correlacionado com aumento dos níveis do risco de doença periodontal [Palmer et al., 2005; Ojima and Hanioka, 2010]. A expressão da doença é também mais grave entre os fumantes quando comparado com ex-fumantes, enquanto baixo risco foi observado entre os que nunca fumaram [Harber et al., 1993; Grossi et al., 1995]. De acordo com Salvi et al. [1997], fumantes têm cinco vezes mais possibilidade de desenvolver periodontite severa do que não-fumantes.

Estudos têm mostrado que os pacientes fumantes respondem de forma menos favorável ao tratamento periodontal [Papantonopoulos, 2004; Heasman et al., 2006]. Observa-se uma redução na regeneração e cicatrização nas cirurgias de Regeneração Tecidual Guiada [Danesh-Mayer and Wikejö, 2001; Stavropoulos et al., 2004]. Além disso, esses pacientes apresentam um maior número de falhas de implantes [Jansson et al., 2005].

Apesar dos estudos apresentarem uma relação causal entre fumo e doença periodontal, ainda não se sabe ao certo o que acontece quando o tecido periodontal é exposto ao tabaco e porque a progressão da doença periodontal é diferente em fumantes, quando comparado com não-fumantes [Ojima and Hanioka, 2010]. O mecanismo mais plausível para explicar essa relação é que os componentes do

cigarro interagem com as células do indivíduo afetando a resposta inflamatória às mudanças microbiológicas [Palmer et al., 2005].

Mudanças na formação vascular e microcirculação podem influenciar na resposta inflamatória gengival [Ojima and Hanioka, 2010]. Estudos mostram que fumantes com doença periodontal têm menos sangramento gengival [Preber and Bergström, 1985] e inflamação clínica [Preber and Bergström, 1986] quando comparado com não-fumantes. Isso pode ser explicado pelo fato de que os produtos do cigarro, como a nicotina, causam uma significativa diminuição no número de vasos na gengiva inflamada de fumantes, comparado com não-fumantes [Rezavandi et al., 2002]. Além disso, o fumo pode causar diminuição do fluxo gengival, vasoconstrição [Morozumi et al., 2004] e a insuficiência na revascularização provocada pelo tabagismo pode contribuir com um atraso na cicatrização gengival, aumentando o risco de doença periodontal [Petropoulos et al., 2004].

Estudos têm mostrado que o fumo pode afetar o número de neutrófilos no fluido gengival [Guntsch et al., 2006], além de provocar efeitos deletérios na sua função como redução da viabilidade e fagocitose [Pauletto et al., 2000]. Além disso, também tem sido relatado que o fumo pode influenciar o número de linfócitos e a produção de anticorpos [Kraal et al., 1977; Kenny et al., 1977; Bennet and Read, 1982]. Linfócitos T CD4+ e CD8+ estavam diminuídos nos indivíduos fumantes após tratamento periodontal [Orbak et al., 2003]. Os níveis de IgG e IgA foram significativamente menores em fumantes comparado com não-fumantes e controles saudáveis indicando que o uso de cigarro pode estar associado com a supressão da função de células B e produção de imunoglobulina. As alterações nos níveis de anticorpos podem explicar o mecanismo potencial pelo qual o fumo exacerba a doença periodontal [Al-Ghamdi and Anil, 2007].

Alterações no metabolismo ósseo e do tecido conjuntivo também são observadas como efeitos do tabagismo. Estudos *in vitro* têm descritos evidências de que a nicotina pode suprimir a proliferação dos osteoblastos enquanto estimula a

atividade da fosfatase alcalina [Buduneli et al., 2008]. Observa-se em fumantes uma diminuição, tanto na saliva quanto no soro, da concentração da proteína osteoprotegerina (OPG). A OPG é importante na remodelação óssea, explicando o grande potencial para perda óssea entre os fumantes [Lappin et al., 2007; Buduneli et al., 2008].

Payne et al. [1996] demonstrou que a nicotina leva monócitos a liberarem prostaglandina E2 e IL-1 em resposta a polissacarídeos podendo contribuir para o aumento da destruição do tecido periodontal observada em fumantes, que na presença de atividade vasoconstritora e resposta hiperkeratótica ao estímulo físico (calor) e químico poderia explicar a apresentação clínica paradoxal de perda óssea e profundidade de bolsa severa sem sinais clínicos de inflamação grave.

O polimorfismo genético de interleucinas e de receptores antagonistas é considerado importante na resposta imune da doença periodontal. No entanto, o genótipo positivo, combinado com o hábito de fumar, aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença nesses indivíduos [Parkhill et al., 2000].

2.3 As células de Langerhans e Células Dendríticas

As CD são células da imunidade inata que servem como uma ponte para a resposta imune adaptativa. Para isso, no estágio imaturo, elas capturam micróbios e seus antígenos e, em seu estágio maduro, estimulam uma resposta de células-T para esses antígenos. Assim são as únicas células apresentadoras de antígenos capazes de iniciar uma resposta imune adaptativa [Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000].

Para que os linfócitos B e T reconheçam e respondam aos micróbios, estes devem ser capturados pelas células apresentadoras de antígenos. Assim, CD imaturas capturam e processam os antígenos em peptídeos que são associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), através do qual os peptídeos são apresentados ao linfócito T [Frelinger et al., 1979; Cutler et al., 2001; Kinane and

Lapin, 2002]. O recrutamento de leucócitos para a área de injúria ou infecção é essencial para uma eficiente defesa do hospedeiro, e a constante migração de monócitos e outros leucócitos para o sítio de infecção permite o repertório completo do sistema imune para proteger o hospedeiro contra uma variedade de antígenos [Katz et al., 1979].

Estudos mostram que as CL são derivadas de células progenitoras na medula óssea [Giacometti and Montagna, 1967; Mackenzie, 1975], e existem algumas evidências de que elas possuem a habilidade de dividir enquanto residem no epitélio [Gschnait and Brenner, 1979; Cutler and Jotwani, 2004; Girolomoni et al., 2002].

No tecido humano periférico são descritas três grupos de CD, as CL da linhagem mielóide, as CD intericiais e as CD linfóides/plasmocitóides [Cutler and Jotwani, 2004]. As CL são membros da família das CD que residem dentro da camada basal e suprabasal do epitélio da pele e mucosa. Elas servem como “sentinelas” da mucosa, alertando o sistema imune para a entrada de patógenos [Katz et al., 1979]. As CD intericiais estão presentes na derme da maioria dos órgãos, como rim pulmão e coração. As CD linfóides/plasmocitóides têm sido identificadas predominantemente no sangue [Cutler and Jotwani, 2004].

As CD assumem uma morfologia diferente dependendo do seu estágio de diferenciação. Na corrente sanguínea elas são indistinguíveis dos monócitos, mas na pele ou mucosa elas assumem uma morfologia estrelada, que permite torná-las mais eficiente no reconhecimento e na captura de antígenos. No seu estágio maduro, têm diminuição da expressão de suas moléculas de reconhecimento e captura de antígenos e tornam células apresentadoras de antígenos [Frelinger et al., 1979; Cutler et al., 2001; Kinane and Lappin, 2002;; Cutler and Jotwani, 2004]. Portanto, as CL são CD imaturas localizadas entre as células epiteliais da pele e mucosa bucal, nasal, vaginal, pulmonar e retal [Girolomoni et al., 2002]. As CD são identificadas em órgãos linfóides e não-linfóides, epiderme, epitélio e mucosa bucal incluindo gengiva [Lombardi et al,1993].

As CL foram descritas pela primeira vez em 1868 por Paul Langerhans, um estudante de medicina que descreveu uma população de células de forma dendrítica localizada no epitélio escamoso da epiderme [Romani et al., 2003]. Com a ajuda do microscópio eletrônico, Birberck et al. [1961] demonstrou nessas células a presença de grânulos intracitoplasmática com estrias transversais periódicas que hoje são considerados específicos de CL. Estas células representam cerca de 4% das células da epiderme no homem [Giacometti and Montagna, 1967] e estão presentes no epitélio bucal, localizado na camada espinhosa do epitélio queratinizado e não-queratinizado. Podem ser identificadas por microscopia eletrônica, histoquímica ou a análise imunoistoquímica [Nicolas and Schmitt, 1984; Romani et al., 2003;].

Os estudos de CD têm sido dificultados pela sua raridade *in vivo* e pela ausência de um marcador expressado em todos os membros da família das CD: CL, CD intericiais ou dérmicas e CD linfóides [Cutler et al., 2001]. As CL são identificadas pela expressão de CD1a e Langerina [Banchereau et al., 2000; Hunger et al., 2004] e estão localizadas nas camadas basal e suprabasal da epiderme [Katz et al., 1979] As CD intericiais são identificadas pela expressão de CD14, CD68 e fator XIIIa e estão presentes na derme da maioria dos órgãos [Holt,1993]. As CD linfóides são CD4+ e CD123+, e estão presentes no sangue e órgãos linfóides [Grouard et al., 1997]. As CD que contem o fator XIIIa representam uma subpopulação de CD dérmicas encontradas em forte associação com vasos sanguíneos. É uma potente célula apresentadora de antígeno [Dereka et al., 2004].

Células progenitoras hematopoiéticas CD34+ na presença de GM-CSF ou fator de necrose tumoral (TNF)- α diferenciam-se em CL CD1a+, CD intericiais fator XIIIa+ ou periféricas do sangue CD14+, onde ambas as populações são potentes estimuladores de células T [Zhou and Tedder, 1996; Caux et al., 1997]. A maturação de CD está relacionada à citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , ligante CD40 análogo da célula T (CD40L), bem como produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) [Riva et al., 1996; Riedl et al., 2000]. Durante a maturação,

as CD sofrem grandes mudanças funcionais e fenotípicas. Ocorre perda de receptores fagocíticos e endocíticos, aumento da expressão de moléculas (CD80 e CD86), necessários para estimular células T, e expressão de CD83, único marcador de CD maduras [Riva et al., 1996; Banchereau and Steinman, 1998].

O processo de migração das CD é induzido e regulado por citocinas epidérmicas que provocam mudanças fenotípicas necessárias para que as células deixem a pele e migram para o tecido linfóide. Além disso, as CD podem responder a determinadas quimiocinas, regulando a expressão de receptores. O receptor da quimiocina CCR7, que interage com citocinas do tecido linfóide promovendo a entrada de linfócitos T nos nódulos linfáticos, pode ser regulado pelas CD maduras [Cumberbatch et al., 2000].

A presença de numerosas CL imaturas CD1a+ e CD maduras CD83+ através de imunistoquímica foi demonstrada no epitélio e lâmina própria de gengiva saudável, gengivite crônica e periodontite crônica [Jotwani et al. 2001; Jotwani and Cutler, 2003]. Foi observada uma localização diferencial da subpopulação de CD na mucosa gengival, com CL imaturas CD1a+ localizadas no epitélio de gengiva saudável e inflamada e CD maduras CD83+ restritas à lâmina própria rica em células T. Cutler et al. [1999] observou in vitro evidências de que as CD imaturas (CD1a+) após entrar em contato com antígenos do P. Gingivalis, internaliza-os e se tornam CD maduras (CD83+). Além disso, é observado que estímulos como CD40L e TNF- α estimulam a aquisição da expressão de CD83 pelas CL [Riedl et al., 2000]. Também é sugerido que ambas as populações de CD dérmicas e de Langerhans contribuem para a população de CD CD83+ maduras [Jotwani et al., 2001].

2.4 Células de Langerhans e Células Dendríticas na Doença Periodontal

Durante as doenças periodontais como gengivite ou periodontite, CL imunocompetentes constituem uma rede de capturar antígenos, capazes de

interiorizar antígenos patogênicos, e levá-los aos nódulos linfáticos regionais e lá iniciar a proliferação de células T antígeno – específico [Barrett et al., 1996].

Newcomb et al. [1982], através da técnica de adenosina trifosfatase, observaram aumento significativo das CL no epitélio gengival com o aumento da inflamação associada a biofilme bacteriana, mantendo um nível inalterado após o 21º dia.

DiFranco et al. [1985] encontraram que as CL parecem com mais prolongamentos e melhor se desenvolvem morfológicamente na gengiva clinicamente inflamada do que na gengiva clinicamente normal. Além do mais, foram observadas cinco vezes mais CL na gengiva humana clinicamente inflamada do que na gengiva normal.

Séguier et al [2000a] observaram mudanças morfológicas nas CL durante sua migração pelo epitélio e também que, essas células na camada basal, podem representar tanto as células que migram do epitélio como as precursoras que vem a caminho do compartimento de epitelial. CL mais próximas da membrana basal parecem se tornar mais arredondadas e apresentando poucos prolongamentos dendríticos do que quando localizadas em camadas mais superiores do epitélio. Além do mais, a diminuição no tamanho e no número de prolongamentos dendríticos é principalmente notada nas CL de indivíduos com gengivite quando comparado com gengiva saudável. Essas características morfológicas são dependentes de uma maior severidade na inflamação.

Significante redução do número de CL foi observada em pacientes transplantados renais imunossuprimidos em uso de Azatioprina [Bergfelt et al., 1993]. Também foi encontrada uma densidade de CL epitelial menor em pacientes com crescimento gengival induzido por ciclosporina A comparado com pacientes com uma condição inflamatória da gengiva não-específica [Niimi et al., 1990].

A densidade de CL CD1a+ em mm² foi significativamente menor no grupo de pacientes com crescimento gengival induzido por nifedipina ou imunossuppressores do

que em pacientes com gengiva normal. Essa redução foi encontrada principalmente no epitélio do sulco. Além disso, as CL estavam localizadas na região suprabasal do epitélio gengival e no tecido conjuntivo, agrupadas predominantemente abaixo do epitélio [Nurmenniemi et al., 1999].

Séguier et al. [2000b] mostraram em seu estudo uma significativa diminuição no número de CL CD1a+ nos grupos de gengivite e periodontite quando comparado com o grupo controle. Nenhuma diferença foi encontrada no número de CL CD1a+ comparando os grupos gengivite e periodontite. Uma significativa correlação positiva foi observada entre a fração de área ocupada pelas fibras colágenas e o número de células CD1a positivas no grupo com periodontite. Além disso, foi observada uma diminuição no número de células CD1a positivas de acordo com a severidade da doença, estimada pelo infiltrado inflamatório e a fração de área ocupada pelas fibras colágenas. O autor sugere que a diminuição de tais células seja um mecanismo de evitar uma sobre estimulação do sistema imune.

No entanto, Gemmell et al. [2002a] não demonstraram diferenças nas CL CD1a+ no tecido epitelial em relação aos diferentes estágios clínicos, gengivite, periodontite e gengiva saudável, ou em relação a diferentes graus do infiltrado. Ao contrário do tecido epitelial, foram encontradas poucas células CD1a+ positivas no infiltrado do tecido conjuntivo. A porcentagem de CD CD83+ no infiltrado foi significativamente maior do que a porcentagem de CD1a+. Ao contrário das células CD1a+, não foram observadas células CD83+ no epitélio gengival.

Dereka et al. [2004] avaliaram a presença de CD fator XIIIa positivas e CL positivas para proteína S-100 no epitélio gengival e tecido conjuntivo de bolsas periodontais, antes e após terapia periodontal não-cirúrgica. Os resultados revelaram que o número de CD Fator XIIIa positivas diminuiu comparado com o controle após a remoção de biofilme e tártaro, instrução de higiene oral e raspagem e alisamento radicular em bolsas periodontais de 4-5mm, mas não nas de mais de 6mm de profundidade. O número de CL positivas para proteína S-100 diminuiu após tratamento

periodontal em bolsas com mais de 6mm. Estes resultados podem refletir uma tendência para redução destas duas subpopulações distintas de CD após terapia periodontal não-cirúrgica.

Zavala and Cavicchia [2006] avaliaram as mudanças relacionadas com a idade e as CL de epitélio gengival humano, a morfologia, densidade e distribuição intra-epitelial das CL que foram examinadas de diferentes grupos etários. Ele encontrou uma diminuição da densidade de CL com o aumento da idade e que em indivíduos jovens, a maioria das CL estavam localizadas na camada supra-basal. Nos indivíduos idosos as CL aparecem exclusivamente na camada basal. O autor sugere que devido à variação na disposição dessas células a habilidade de imuno-vigilância é menos ativa em pessoas idosas. Nenhuma diferença entre os sexos foi observada.

Diferentes estudos mostram discrepâncias em relação ao número de CL no epitélio gengival inflamado [Jotwani and Cutler, 2003] É observado número aumentado de CL com a inflamação [Newcomb et al, 1982; DiFranco et al., 1985, Hitzig et al., 1989], aumento do número no início da inflamação, seguido de diminuição [Moughal et al., 1992], diminuição do número [Séguier et al., 2000b] ou nenhuma mudança quantitativa [Gemmell et al., 2002a] no epitélio gengival durante a inflamação. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que em alguns estudos as CL foram avaliadas através da técnica ATPase [Newcomb et al, 1982] ou através de marcadores para os antígenos HLA-DR, OKT6 [DiFranco et al., 1985; Hitzig et al., 1989] e CD1a (clone O10) [Séguier et al., 2000b; Gemmell et al., 2002a]. Além disso, tais divergências podem ser explicadas pelas variações na idade [Zavala and Cavicchia, 2006], porque alguns sujeitos receberam instrução de higiene e profilaxia para obter o máximo de saúde clínica [Newcomb et al, 1982; Moughal et al., 1992] ou ainda pela ausência de estudos relacionando o hábito de fumar [Cury et al., 2008].

2.5 Células de Langerhans, Células Dendríticas e o Fumo

Macrófagos alveolares (MA) representam uma vasta população de células na superfície alveolar de pessoas saudáveis [Costabel et al., 1986]. Vários autores têm demonstrado que a função de apresentar antígenos em MA de fumantes está prejudicada em comparação com não-fumantes [Laughter et al., 1977]. De acordo com Pankow et al. [1991], a expressão do antígeno HLA-DR em MA de fumantes está reduzida.

O tabagismo está associado com o agravamento da asma e resposta reduzida à terapia com corticóides. Células dendríticas maduras CD83 são encontradas em um número significativamente menor em pacientes fumantes com asma do que em não-fumantes com asma. Nenhuma diferença é observada em relação ao número de CL CD1a+ [Tsoumakidou et al., 2007].

Por acreditar que as CD sejam indispensáveis para iniciação da resposta imune adaptativa, Robbins et al. [2004] pesquisou o impacto do fumo na resposta imune contra o adenovírus. Ele demonstrou que o tabagismo diminui o número de CD no tecido pulmonar e que a exposição crônica ao tabaco prejudica a resposta imune contra o adenovírus. Desta maneira, em parte, isto explica o aumento da prevalência de infecções virais e doenças pulmonares obstrutivas crônicas em fumantes.

Estudos em ratos mostram que a exposição ao fumo diminui o número de CD no pulmão e suprime a maturação de CD demonstrado pela redução da expressão de MHC classe II. Além disso, o fumo induz defeitos na função das CD que levam a prejuízos na função das células T CD4 [Robbins et al., 2008].

O tabagismo interfere no mecanismo de defesa respiratória, em ambas a imunidade inata e adaptativa. A nicotina, um dos principais constituintes do cigarro, suprime o sistema imune atuando como um agente anti-inflamatório [Sopori, 2002].

Bratke et al [2008], estudando moléculas superficiais associadas à função das CD mielóides das vias aéreas em fumantes e não-fumantes, não observaram diferenças na expressão do marcador CD83. No entanto, existiu um grande aumento

na expressão de Langerina e CD1a (marcadores de CL) nas CD mielóides de fumantes. Em contrapartida, as CD mielóides mostraram uma diminuição do receptor CCR7 nos fumantes.

Não têm sido observados estudos relacionando os efeitos do tabagismo na gengiva [Cury et al., 2008]. Contudo exames em biópsias de borda lateral de língua humana mostraram um aumento na densidade das CL em fumantes quando comparados com não-fumantes. O autor sugere que as CL respondem às toxinas externas, ou que mudanças físicas na barreira epitelial induzidas por tais mudanças necessite de mais células para manutenção da integridade do epitélio [Barrett et al., 1991].

3. JUSTIFICATIVA

As CL e CD constituem uma importante rede de capturar antígenos, levando-os aos nódulos linfáticos regionais onde estimula a proliferação de células T. Assim, apresentam um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imunológica contra patógenos periodontais, recrutando células inflamatórias para os tecidos gengivais. No entanto, uma série de estudos mostra discrepâncias em relação ao número de CL e dendríticas no epitélio gengival inflamado. Apesar de estudos mostrarem que o tabagismo diminui o número de CD no tecido pulmonar não se verificou ainda a influência do hábito de fumar na população de CL e CD em tecidos gengivais inflamados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar, por meio da técnica de imunohistoquímica, os efeitos do hábito de fumar na população de CL imaturas CD1a+ e CD maduras CD83+ no tecido gengival de pacientes com gengivite crônica.

4.2 Objetivos Específicos:

- Análise da densidade em mm^2 das CL imaturas CD1a+ presentes no epitélio do sulco, epitélio bucal e lâmina própria na gengivite crônica de indivíduos fumantes e não-fumantes.
- Análise da densidade em mm^2 das CD maduras CD83+ da lâmina própria na gengivite crônica de indivíduos fumantes e não-fumantes.
- Efeito do tabagismo no infiltrado inflamatório total e a relação do infiltrado com as CL imaturas CD1a+ e CD maduras CD83+.
- Avaliar o efeito do número de cigarros fumados e o tempo do hábito de fumar na densidade de células do infiltrado inflamatório, CD1a+ e CD83+.
- Análise da correlação entre a quantidade de cigarros e o tempo do hábito com o infiltrado inflamatório total, as CL imaturas CD1a+ e CD maduras CD83+.

5. METODOLOGIA

5.1. Desenho Experimental e População do Estudo

Foi realizado um estudo clínico-laboratorial em que biópsias de tecido gengival de indivíduos com gengivite crônica, fumantes (F) e não-fumantes (NF), foram analisadas histologicamente.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – (CEP-PBH) no dia 11 de setembro de 2009, sob o número 656/08 (anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – (COEP-UFMG) no dia 03 de março de 2010, sob o número 393/09 (anexo B). Os indivíduos F e NF eram portadores de gengivite crônica em tratamento no serviço de odontologia da PBH, Regional Venda Nova. Os pacientes foram esclarecidos da não-maleficência e da beneficência do tratamento e que poderiam negar a participação na pesquisa. Aqueles que interessaram em participar da pesquisa leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo C).

A população examinada consistiu de 15 indivíduos NF – 5 homens (média de idade 32 ± 6.3) e 10 mulheres (média de idade 35 ± 10.5) – e 15 indivíduos F – 6 homens (média de idade 36.5 ± 10.7) e 9 mulheres (média de idade 46.7 ± 4.3). Os indivíduos fumantes e não-fumantes que participaram do estudo relataram não apresentarem doenças sistêmicas crônicas.

5.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Os indivíduos elegíveis para este estudo receberam previamente um exame periodontal completo com coleta dos parâmetros clínicos de profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (PIC) e sangramento à sondagem (SS) em todos os dentes presentes na cavidade bucal. Indivíduos com presença de mais de 04 sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ e $PIC \geq 3\text{mm}$ foram categorizados como portadores de

periodontite [López et al., 2002] e foram excluídos do estudo. Os demais indivíduos com presença de sangramento à sondagem em mais de 25% dos sítios dentários, acúmulo de biofilme supragengival e ausência de PS e PIC \geq 4mm foram incluídos e categorizados como indivíduos com gengivite crônica [López 2005; Armitage, 2004]. Esses posteriormente foram dicotomizados em dois grupos de acordo com o hábito de fumar. Assim foram estabelecidos dois grupos: gengivite crônica fumante e gengivite crônica não-fumante.

O fragmento gengival foi removido nos indivíduos dos dois grupos durante o acerto de tecido mole em dente indicado para exodontia, por razões protéticas e ortodônticas, na presença de sangramento à sondagem que é indicador clínico de sítio periodontal com inflamação. Esse fragmento foi fixado em solução de formol tamponado (10%) e enviado para o Serviço de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG para inclusão do tecido em parafina e confecção de uma lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE). Foram confeccionadas lâminas com 3 μ m de espessura para estudo imunoistoquímico.

Foram considerados indivíduos fumantes aqueles que já consumiram mais de 100 cigarros durante a vida e continuam com o hábito de fumar [Tomar and Asma, 2000].

5.3 Análise da inflamação

A avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório foi realizada por um único observador. Foram contadas todas as células inflamatórias do infiltrado em seis campos consecutivos e representativos das lâminas coradas em HE (área total de 0, 5324 mm²). Os campos foram digitalizados através de um microscópio (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Gottingen, Germany) acoplado a um computador com um aumento de 400X. As células inflamatórias foram contadas em cada campo, utilizando as imagens digitalizadas, através do programa Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA). Para cada amostra gengival foi obtida a média de

células do infiltrado inflamatório por mm² e foi feita a comparação entre os grupos F e NF. Em seguida, os dados foram agrupados em percentis e as amostras foram categorizadas de acordo com o grau de inflamação: infiltrado inflamatório leve (até o 1º tercil); infiltrado inflamatório moderado (entre o 1º e o 2º tercil); infiltrado inflamatório intenso (acima do 2º tercil).

5.4. Análise Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímicas para a marcação das proteínas CD1a e CD83 foram realizadas pela técnica manual da streptavidina-biotina no Serviço de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG).

As lâminas foram lavadas em água corrente por 2 horas e banhadas por 4 horas em uma mistura de 30 gramas de gelatina (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 628) com 3 gramas de sulfato de cromo e potássio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 728) diluídos em três litros de água fervente aquecida por 30 minutos em microondas na potência 9. Em seguida as lâminas foram secas à temperatura ambiente por 24 horas. Foram obtidos, a partir de blocos de parafina, cortes histológicos de 3 µm de espessura, sendo estes estendidos sobre a lâmina previamente preparada e colocados em estufa a 55 °C durante 24 horas. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol: um de 60 minutos e outro de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) por 5 minutos cada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM (Lab Synth, Diadema, Brazil, A2270) pH= 6.0 e incubadas em panela de pressão (Mantra Inc, Índia) por 20 minutos a 98°C. Após a recuperação, essas lâminas foram mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, sendo lavadas em cinco banhos de água destilada.

A fim de inibir a peroxidase endógena, os cortes foram incubados em dois banhos de peróxido de hidrogênio a 10 volumes por 15 minutos cada, em seguida,

lavados em cinco banhos de água destilada. Seguiu-se então a incubação em três banhos em solução tampão com 2,42g de hidroximetil aminometano PA (Tris) (Nuclear, São Paulo, Brasil, código 318768) e 8,5g de cloreto de sódio PA (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 106) em 1000mL de água destilada (Tris-HCL), pH 7,4 por cinco minutos. Os cortes foram então incubados por uma hora, à temperatura ambiente, com os anticorpos primários monoclonais usados: anti-CD1a (clone O10; Dako, carpinteria, CA, EUA), pronto para uso, específico para CL imaturas, e anti-CD83 (clone HB15e; Serotec Ltd, Oxford, UK), diluição 1:150 e específico para CD madura. Após a incubação, os cortes foram submetidos a três banhos de solução tampão Tris-HCL, pH 7,4. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário, pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e lavagem em três banhos em solução tampão Tris-HCL, pH 7,4. As lâminas foram então incubadas em complexo terciário também pertencente ao Kit LSAB+ Peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos, sendo lavadas em três banhos em solução tampão Tris-HCL, pH 7,4. A revelação da reação foi executada com sistema de substrato cromógeno constituído de 1 gota de DAB-cromógena (3,3' diaminobenzidina em solução) em 1 ml de substrato tamponado (DAKO® Liquid DAB+Large volume substrate-chromogen solution, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA, código K3468) por 5 minutos (CD1a) ou 1 minuto (CD83). Seguiram-se 5 banhos de água destilada. A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Mayer por 15 segundos. Em seguida realizou-se um banho de água destilada e um banho de solução aquosa de hidróxido de amônio a 10%, sendo imediatamente lavadas em cinco banhos de água destilada. Seguiu-se a desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes: 70%, 90% e 100% por cinco minutos e mais duas vezes a 100% por dez minutos, diafanizadas em um banho de cinco e outro de dez minutos em

xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, EUA, código SP15-500).

5.5 Análise da imuno-expressão e contagem das células

A análise da imuno-expressão foi feita em toda a extensão do epitélio bucal (EB), epitélio do sulco (ES) e Lâmina própria (LP) para o anticorpo CD1a e na LP para o anticorpo CD83 de acordo com a densidade em mm^2 . As amostras foram comparadas entre os grupos F e NF, em seguida essa comparação foi feita considerando o grau de inflamação: infiltrado leve, infiltrado moderado e infiltrado intenso.

A densidade das células CD1a+ no EB, ES e LP e a densidade das células CD83+ na LP foram correlacionadas com as células do infiltrado inflamatório total. Em seguida, essas correlações foram feitas separadamente em cada grupo (F e NF).

O número de cigarros foram correlacionados com a densidade de células CD1a+ do EB, ES e LP, células CD83+ da LP e células do infiltrado inflamatório total. Também foi avaliado se o número de cigarros fumados afetava a densidade das células. Os indivíduos então foram agrupados e foi obtida a mediana de 15 (5-40) cigarros fumados. Foi feita uma comparação entre as amostras de indivíduos que fumavam até 15 cigarros por dia (grupo A) e os que fumavam mais de 15 cigarros por dia (grupo B) em relação à densidade de células CD1a+ do EB, ES e LP, células CD83+ da LP e células do infiltrado inflamatório total.

O tempo do hábito de fumar (anos) foi correlacionado com a densidade de células CD1a+ do EB, ES e LP, células CD83+ da LP e células do infiltrado inflamatório total. Também foi avaliado se o tempo do hábito de fumar afetava a densidade das células. Os indivíduos então foram agrupados e foi obtida a mediana de 20 (7-35) anos para o tempo do hábito de fumar. Foi feita uma comparação entre as amostras de indivíduos que fumavam até 20 anos (grupo C) e os que fumavam

mais de 20 anos (grupo D) em relação à densidade de células CD1a+ do EB, ES e LP, células CD83+ da LP e células do infiltrado inflamatório total.

Para análise da densidade de células positivas por mm² do anticorpo CD1a e CD83 os campos foram digitalizados através de um microscópio (Axioskop 2 Plus, Zeiss, Gottingen, Germany) acoplado a um computador com um aumento de 400X. A área do epitélio e da LP foram delimitados com mouse e a medida obtida através do Software AxioVision 4.2 (Microsoft, Carl Zeiss Vision GmbH, Gottingen, Germany). As células positivas foram contadas em cada campo, utilizando as imagens digitalizadas, através do programa Image Tool 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA). De cada imagem foi obtido o número de células positivas em relação à área em mm².

5.6 Análise estatística

O programa BioEstat® 4.0 [Ayres et al., 2005] foi usado para análise estatística. As amostras foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. O teste-t de Student e correlação de Pearson foram aplicados para as amostras com distribuição normal, o teste Mann-Whitney e correlação de Spearman para amostras com distribuição não-normal, e foram aceitos os níveis de significância de $p < 0.05$. As correlações foram graduadas em: fraca – $< 0,30$; moderada – $0,30-0,50$; e forte – $> 0,50$ [Cohen, 1988].

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO - Effect of smoking in Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis

TITLE: Effect of smoking in Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis

RUNNING TITLE: Smoking, Langerhans and dendritic cells.

ABSTRACT

Background: Prior literature has shown contrasting results regarding dendritic cell (DC) counts in periodontal diseases. Although smoking does decrease the number of DC in the lungs, the effect of smoking on the quantitative distribution of Langerhans cells (LC) and DC within chronic gingivitis has not yet been investigated.

Methods: Gingival samples were obtained from 30 patients, smokers and non-smokers. Immunohistochemical staining was performed to identify CD1a+ immature LC and CD83+ mature DC. Inflammatory infiltrate was evaluated and counted. Density of the cells was calculated within the oral epithelium (OE), sulcular epithelium (SE), and lamina propria (LP) for CD1a+ cells and within the LP for CD83+ cells. These results were compared between the groups. This study sought to evaluate whether or not the high number of cigarettes and the time of smoking actually affected the density of cells. The correlations among the densities of LC and DC with the densities of inflammatory infiltrate, number of cigarettes, and time of smoking was performed.

Results: The density of inflammatory infiltrate and CD1a+ cells from SE and LP was significantly lower for smokers than for non-smokers ($P < 0.05$). This result could not be identified for CD1a+ cells from OE and CD83+ cells from LP. The number of cigarettes and time of smoking did not affect the density of the cells. No statistically significant correlation could be drawn between the density of LC and DC and Inflammatory infiltrate, number of cigarettes, and time of smoking.

Conclusions: Smoking proved to affect the quantitative distribution of LC and DC in chronic gingivitis.

Keywords: CD1a antigen, CD83 antigen, dendritic cells, gingivitis, Langerhans cells, smoking.

Introduction

Gingivitis is a chronic condition which occurs in response to the presence of plaque biofilms, which in susceptible individuals tends to progress to periodontitis. Previous studies have shown that periodontitis patients display a cytokine profile which may favor a Th2 immune response. Periodontitis is currently regarded as a Th2-type disease^{1,2}. Therefore, the promoting phenotype Th2 may be an important risk factor¹⁻⁵. An elevated Th2 cytokine profile could be observed in smokers, suggesting that smoking may in fact induce the conversion of periodontal stability into a progressive disease⁵. Different antigen-presenting cells may be responsible for directing T-cells to a response from cell-mediated (Th1) or subtype humoral immunity (Th2)^{3, 4}. The mechanisms related to the different types of response may well be associated with changes in microbiological and genetic susceptibility, as well as in environmental factors⁶.

Dendritic cells (DC) occupy a unique niche in the innate immune system by serving as a “bridge” to the adaptive immune response. DC capture antigens in their immature state, process them into peptides, and present them to T-cells in their mature stage. Thus, DC are unique antigen-presenting cells able to begin an adaptive immune response^{7,8}. Langerhans cells (LC) constitute a subset of DC originating from bone marrow⁹. Prior studies have demonstrated the presence of CD1a+ immature LC and CD83+ mature DC through immunohistochemistry in the epithelium and lamina propria of healthy gingiva, chronic gingivitis, and periodontitis¹⁰⁻¹³.

The literature shows divergent results regarding the number of DC in periodontal diseases. Some studies report an increased quantity of these cells in gingivitis and periodontitis when compared with healthy periodontal tissues^{10,12,14,15}, whereas others present a decreased number according to the severity of the periodontal disease^{16,17}. In addition, no quantitative change in periodontitis, as compared to gingivitis and healthy periodontal tissues¹⁸, has been reported. These differences may well have been reached due to the fact that in some studies the number of DC was evaluated by

means of different techniques or markers^{10,14-18}. Moreover, the DC quantity has proven to change markedly with age¹⁹, and previous results have shown a decreased number of DC in the lungs²⁰⁻²². In these prior studies, the decrease of DC in smokers impairs the immune response against the adenovirus²⁰ and may render patients with asthma less responsive to corticosteroids and more susceptible to infection²¹. Although smoking decreases the number of DC in the lungs, the effect of smoking on the quantitative distribution of LC and DC in chronic gingivitis has not yet been thoroughly investigated. The goal of this study is to evaluate the effect of smoking on the quantitative distribution of CD1a+ and CD83+ cells in gingival tissues from individuals with chronic gingivitis. In addition, it also was evaluated whether or not the number of cigarettes and the time of smoking actually affected the density of CD1a+ and CD83+ cells.

Materials and methods

Patients and Gingival Samples

This study was approved by the Committee of Ethics in Research from Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/COEP - 656/08). The periodontal disease status was determined by probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), gingival bleeding (GB), and oral hygiene index. The presence of four or more teeth, with one or more sites containing PD \geq 4 mm and CAL \geq 3 mm within the same site, was diagnosed as periodontitis. These individuals were excluded from the study²³. Individuals who presented more than 25% of sites with GB, surfaces demonstrating supragingival plaque accumulation, and an absence of PD \geq 4 mm and CAL \geq 3 mm were diagnosed as chronic gingivitis²³⁻²⁵. The patients evaluated in this study reported no presence of systemic diseases or immunological abnormalities. The samples included 15 non-smokers (NS) (mean age = 33 \pm 7.2 years; 9 female and 6 male) and 15 smokers (S) (mean age = 43 \pm 9.2 years; 10 female and 5 male). The individuals were asked how

many cigarettes they smoked per day and classified according to Tomar and Asma criteria²⁶. Those who had smoked ≥ 100 cigarettes over their lifetime and those who had smoked up to the time of the study were defined as smokers. Non-smokers were defined as those who had not smoked ≥ 100 cigarettes in their lifetime²⁶. The tissue samples were obtained during tooth extractions for prosthetic or orthodontic reasons and diagnosed as regards chronic gingivitis²³⁻²⁵. The samples were set in 10% buffered formalin. The sections were stained with haematoxylin and eosin, and immunohistochemistry was performed.

Inflammatory assessment

Inflammatory infiltrate was measured using haematoxylin and eosin stained sections (Fig. 1A). The sections were digitalized using a microscope, [†] at 400X magnification, interfaced to a computer, and cell counts were taken during the sectioning by a blind examiner. The inflammatory infiltrate mean was determined by counting the number of inflammatory cells adjacent to the epithelium in 6 consecutive fields (total area of 0.5324 mm²) using a software program. [‡] Next, the mean number of cells per area unit (cell number/mm²) was obtained and a comparison was drawn between the S and NS groups. The data were then grouped into percentiles, and the samples were categorized according to the degree of inflammation: mild inflammatory infiltrate (within the 1st tertile), moderate inflammatory infiltrate (between the 1st and 2nd tertile), and intense inflammatory infiltrate (above the 2nd tertile).

Immunohistochemistry

[†] † Axioskop 2 Plus, Zeiss, Gottingen, Germany.

[‡] ‡ Image Tool, version 3.0. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA.

Immunohistochemical reaction was performed using the streptavidin-biotin standard protocol. Serial sections of 3 µm in thickness from paraffin-embedded blocks were deparaffinized and dehydrated. Specimens were immersed in a 10 mM antigen retrieval citrate buffer, §² pH=6.0, for 20 minutes at 98°C, and endogenous peroxidase activity was blocked using a 0.3% hydrogen peroxide. The following monoclonal antibodies were used: anti-CD1a (clone O10), || ready to use, specific for immature LC, and anti-CD83 (clone HB15e), ¶ dilution of 1:150 and specific for mature DC. Detection was performed using biotin-streptavidin-peroxidase method|| and a 3.3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride chromogen.# Mayer's haematoxilin was used for counter staining.

Immunoexpression analysis and cell counts

The density of immunolabeled cells (cell number/mm²) was calculated for CD1a and CD83. Positive cells counts were restricted to immunolabeled cells exhibiting a well-defined cell nucleus. The slices were digitized with a microscope, † at 400X magnification, interfaced to a computer. Cell counts were performed throughout the sections by blinded examiners. The areas were delineated using a mouse and measured using a software program.** The oral epithelium (OE), sulcular epithelium (SE), and lamina propria (LP) regions were evaluated for CD1a+ cells and the LP

² § Lab Synth, Diadema, Brazil.

|| Dako, Carpinteria, CA, EUA.

¶ Serotec Ltd, Oxford, UK.

DAB, Sigma Chemical, St. Louis, USA.

† Axioskop 2 Plus, Zeiss, Gottingen, Germany.

** Microsoft AxioVision, version 4.2. Carl Zeiss Vision GmbH, Gottingen, Germany.

region for CD83+ cells (Fig. 1A). The S and NS groups were compared according to the density of CD1a+ cells within the OE, SE, and LP, and to the density of CD83+ cells within the LP. Next, comparisons were drawn concerning the degree of inflammation: mild, moderate, and intense infiltrate.

The density of CD1a+ cells within the OE, SE, and LP, as well as the density of CD83+ cells within the LP, were correlated with the density of inflammatory infiltrate cells. Next, the correlations were made in each group (F and NF).

The density of CD1a+ cells within the OE, SE, and LP, and the density of CD83+ cells within the LP were compared according to the following comparison of smoking habits: (1) between group of individuals who had smoked up to 15 cigarettes per day (group A) and the group of individuals who had smoked more than 15 cigarettes per day (group B) and (2) between the group of individuals who had smoked up to 20 years (group C) and the group of individuals who had smoked for more than 20 years (group D). The densities of cells were also correlated with the numbers of cigarettes smoked and length of time of smoking (in years).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a software program ^{††3}. Normal distribution was tested using the Shapiro-wilks procedure. In samples with normal distribution, the Student's t-test and Pearson's correlations were applied. In samples presenting non-normal distributions, the Mann-Whitney test and Spearman's correlation were applied²⁷. The alpha level was set to 0.05. Correlation was graded according to the Cohen classification: weak, <0.30; moderate, 0.30-0.50; Strong, >0.50²⁸.

Results

Periodontal clinical parameters of the samples are presented in table 1. The inflammatory infiltrate mean was higher in the NS than in the S group (table 2).

³ ††BioEstat, version 4.0. Pará, Brasil.

Immature LC were clearly identified by their immunoreactivity to anti-CD1a. Cells detected in the OE and SE showed several cytoplasmic processes (Fig. 1B), whereas in the LP they were observed as rounded cells (Fig. 1C). A higher density of the CD1a+ cells within the SE ($P < 0.05$) and LP ($P < 0.05$) could be observed in NS than in S (table 1). A higher density of the CD1a+ cells within the OE could also be observed in NS than in S, but within the standards for statistical difference (table 2).

Mature DC were identified by their immunoreactivity to anti-CD83. CD83+ cells with dendritic morphology were detected in the LP (Fig. 1D), with no reactive cells observed within the epithelium. Although statistical difference was not demonstrated, NS samples showed a higher density of the CD83+ cells within the LP than did the S samples (table 2).

Density of the CD1a+ cells within the OE, SE, and LP, as well as CD83+ cells within the LP, in both the S and NS groups were clustered according to the degree of inflammation (table 3). A higher number of CD1a+ cells were observed in the NS sample within the LP, for mild and moderate infiltrate, and within the SE for intense infiltrate, when compared to S.

The inflammatory infiltrate was correlated with CD1a+ and CD83+ cells in the S, NS, and S+NS groups. The correlation with CD1a+ within the SE was strong and positive in the S+NS group ($p < 0.05$). Furthermore, most correlations proved to be weak or moderate.

The inflammatory infiltrate was correlated with CD1a+ and CD83+ cells according to the degree of inflammation (mild inflammatory infiltrate, moderate inflammatory infiltrate, and intense inflammatory infiltrate) in both the S and NS groups. In mild inflammatory infiltrate for the S group, the correlation was strong and negative for CD1a+ cells within the OE ($P > 0.05$), SE ($P < 0.05$), and LP ($P < 0.05$), and strong and positive for CD83+ cells within the LP ($P < 0.05$). For the NS group, the correlation was strong and positive for CD1a+ cells within the OE ($P > 0.05$), SE ($P > 0.05$), and LP ($P > 0.05$), and strong and negative for CD83+ cells within the LP ($P > 0.05$). In moderate

inflammatory infiltrate for the S group, the correlation was strong and positive for CD1a+ cells within the OE ($P>0.05$). For the NS group, the correlation was strong and positive for CD1a+ cells within the OE ($P>0.05$) and strong and negative for CD1a+ cells within the SE ($P<0.05$). In intense inflammatory infiltrate for the S group, the correlation was strong and positive for CD1a+ cells within the SE ($P>0.05$) and strong and negative for CD1a+ cells within the LP ($P>0.05$). For the NS group, the correlation was strong and positive for CD1a+ cells within the SE ($P<0.05$) and CD83+ cells within the LP ($P>0.05$). Furthermore, most correlations proved to be weak or moderate.

The correlation of the number of smoked cigarettes and the length of time of smoking with the inflammatory infiltrate, CD1a+, and CD83+ cells was weak.

There was no statistically significant difference between group A and group B, or between group C and group D, in relation to the density of inflammatory infiltrate and CD1a+ and CD83+ cells.

Discussion

In the present study, densities of inflammatory infiltrate and CD1a+ cells from SE and LP were lower in the S group than in the NS group. This was not observed for CD1a+ cells from OE and CD83+ cells from LP. These findings may explain divergent results found in the literature regarding DC counts in periodontal diseases^{10,12,14-17}. In these prior studies, despite previous results showing a decreased number of DC in the lungs of smokers, smoking habits were not considered²⁰⁻²². The decrease of DC in smokers impairs the immune response against adenovirus, explaining the increased prevalence of viral infections in chronic obstructive pulmonary disease among smokers²⁰. Furthermore, reductions in DC may render patients with asthma less responsive to corticosteroids and more susceptible to infection²¹.

Comparisons between S and NS were also performed according to the degree of inflammation. The number of cells remained lower in the S group in nearly all evaluated regions; however, a statistically significant difference could be observed for CD1a+

cells found within the LP, with mild or moderate inflammatory infiltrate, and CD1a+ cells within the SE, with intense inflammatory infiltrate. These results may be explained due to the small number of samples studied after the subdivision.

Tobacco smoking has been found to be the major environmental factor associated with periodontal disease in many studies²⁹⁻³¹. S patients have shown a reduction in clinical signs of gingivitis, such as bleeding, gingival redness, volume of gingival crevicular fluid^{31,32}, less bleeding in periodontitis³³, and poor response to non-surgical therapy³⁴. It has also been demonstrated that smoking can delay the inflammatory response in reaction to experimental chronic gingivitis³⁵. Although numerous studies²⁹⁻³⁴ have demonstrated the causal association between smoking and periodontal disease, few studies have actually shown what tends to occur when periodontal tissue is exposed to smoking. The most plausible mechanism that explains the relationship between smoking and periodontal disease is that smoking interacts with host cells and affects the inflammatory responses to microbial challenges^{30, 31}. Deleterious effects of smoking on the functions of polymorphonuclear neutrophils, including reduced viability and phagocytosis, were observed in periodontally healthy smokers³⁶. Lung macrophages in smokers tend to have a reduced capacity to produce cytokines and phagocytize microorganisms³⁷. In addition, small repeated vasoconstrictive attacks and impairment of revascularization due to smoking may contribute to a disruption of the immune response and a delay in the healing response, leading to an increased risk of periodontal disease³⁸. However, prior literature has not reported on the effect of smoking habits on CD1a+ and CD83+ cells in chronic gingivitis.

The accumulation of plaque at the gingival margin results in the development of gingivitis, a predominantly Th1 cell lesion that, in susceptible individuals and when mediated by Th2 cells, tends to progress to periodontitis^{1-5,39}. The presentation of a different antigenic epitope by means of an antigen-presenting cell can result in the secretion of different patterns of cytokines. Thus, the nature of the antigen-presenting cell can aid in determining the Th1/Th2 profile³. LC and DC are professional antigen-

presenting cells which capture microbes and their antigens while in the immature state and stimulate a T-cell response to these antigens in their mature state, in turn initiating primary and secondary T-cell responses⁷⁻⁹. The present study demonstrates a decrease in the quantitative distribution of CD1a+ and CD83+ cells in the gingival tissue of smokers. This decrease can impair beginning of the adaptive immune response¹⁹. In addition, defects in the function and reductions in the quantity of DC caused by smoke can induce a decrease in cytokine productions by CD4 T-cells²¹. However, the cytokines expression pattern produced by DC was not evaluated in this study. Future studies evaluating the effect of smoking on cytokines produced for LC and DC in gingivitis and periodontitis are warranted.

The correlation between the density of CD1a+ and CD83+ cells with density of inflammatory infiltrate cells was also evaluated. There was a strong correlation between the density of CD1a+ within the SE, with the density of the inflammatory infiltrate cells in the S+NS group. These results demonstrate that the density of CD1a+ within the SE may be influenced by the density of inflammatory infiltrate cells. Also, there was a strong correlation between the density of CD1a+ and CD83+ cells, with the density of the inflammatory infiltrate cells in the S and NS groups, especially in samples classified with mild inflammatory infiltrate. However, in some cases, the p value was greater than 0.05. This indicates that a correlation coefficient of zero is possible. This result may well be due to a sampling error^{28,40}.

The length of time of the smoking and the number of cigarettes smoked per day were correlated with the density of CD1a+ and CD83+ cells and inflammatory infiltrate cells. However, no significant correlation was found. It was originally expected that individuals with a prolonged time of smoking and a high number of cigarettes smoked would present a smaller density of cells. However, no statistically significant difference could be observed in the following cases: (1) when individuals who had smoked up to 15 cigarettes per day were compared with individuals who had smoked more than 15 cigarettes per day and (2) individuals who had smoked for up to 20 years were

compared with individuals who had smoked for more than 20 years. By contrast, clinical studies have shown a dose-dependent association when comparing the prevalence of periodontitis²⁶, alveolar bone loss⁴¹, and gingival bleeding^{42,43} with smoking.

Conclusion

Smokers tend to present a lower density of inflammatory infiltrate and CD1a+ cells from SE and from LP in chronic gingivitis. As LC and DC are antigen-presenting cells, which are key elements in determining the Th1/Th2 profile response in periodontal tissue^{3,4,12,13}, these results may contribute to explaining the differences in the progression of periodontal disease among S and NS.

Acknowledgements

The authors wish to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brasil) (301490/2007-4). Mesquita RA, Aguiar MCF and Costa FO are researchers funded by CNPq. The authors report no conflicts of interest related to this study.

References

1. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, et al. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997;32:115-119.
2. Fokkema SJ, Loos BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:374-378.
3. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007;43:278-293.
4. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;16:87-107.
5. De Heens GL, van der Velden U, Loos BG. Cigarette smoking enhances T cell activation and a Th2 immune response; an aspect of the pathophysiology in periodontal disease. *Cytokine.* 2009; 47:157-161.
6. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009;54:S2-10.
7. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-252.
8. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
9. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004;35:135-157.
10. Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *J Clin Periodontol.* 1982;9:297-304.
11. Dereka XE, Tosios KI, Chrysomali E, Angelopoulou E. Factor XIIIa+ dendritic cells and S-100 protein+ Langerhans' cells in adult periodontitis. *J Periodontal Res.* 2004;39:447-452.

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. *The Journal of Immunology* 2001;167; 4693-4700.
13. Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res.* 2003;82:736-741.
14. DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ Jr, Connelly E. Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol.* 1985;56:48-54.
15. Hitzig C, Monteil RA, Charbit Y, Teboul M. Quantification of T6+ and HLA/DR+ Langerhans cells in normal and inflamed human gingiva. *J Biol Buccale.* 1989;17:103-108.
16. 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.* 2000;45:441-452.
17. Cury PR, Furuse C, Rodrigues AE, Barbuto JA, Araújo VC, Araújo NS. Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis. *Braz Oral Res.* 2008;22:258-263.
18. Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;17:388-393.
19. Zavala WD, Cavicchia JC. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. *Arch Oral Biol.* 2006;51:1150-1155.
20. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, et al. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:202-211.
21. Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, et al. Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:919-925.

22. Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD. Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol.* 2008;180:6623-6628.
23. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2002;73:911-924.
24. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004;34:9-21.
25. López NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutiérrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol.* 2005;76:2144-2153.
26. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2000;7:743-751.
27. Ayres M, Ayres-Junior M, Ayres DL, Santos AS. Bioestat 4.0: Statistical applications in the areas of biological and medical sciences. 4 ed. Belém, Pará, Brasil. IOEPA; 2005: 39-52p (Portuguese).
28. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2a. ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Bisdale,USA. 1988: 559p.
29. Mullally BH: The influence of tobacco smoking on the onset of periodontitis in young persons. *Tob Induc Dis.* 2004;2:53-65.
30. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 16-23.
31. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol.* 2005;32:180-195.
32. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Marcantonio RA. The effect of smoking on gingival crevicular fluid volume during the treatment of gingivitis. *Acta Odontol Latinoam.* 2009;22:201-206.

33. Preber H, Bergström J. Occurrence of gingival bleeding on smoker and non-smoker patient. *Acta Odontol Scand* 1985;43:315-320.
34. Preber H, Bergström J. The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 1986;13:319-323.
35. Feldman RS, Alman JE, Chauncey HH. Periodontal disease indexes and tobacco smoking in healthy aging men. *Gerodontology*. 1987;3:43-46.
36. Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res*. 2006;41:184-188.
37. Barbour SE, Nakashima K, Zhang JB, et al. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8:437-460.
38. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2004;31:267-272.
39. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35: 21-41.
40. Dancey CP and Reidy J. Statistics without maths for psychology. 3 ed. Pearson education limited. Essex, England. 2004, 608p.
41. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995;66:23-29.
42. Dietrich T, Bernimoulin JP, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol*. 2004;75:16-22.
43. Bergström J, Boström L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *J Clin Periodontol*. 2001;28:680-685.

Figure 1

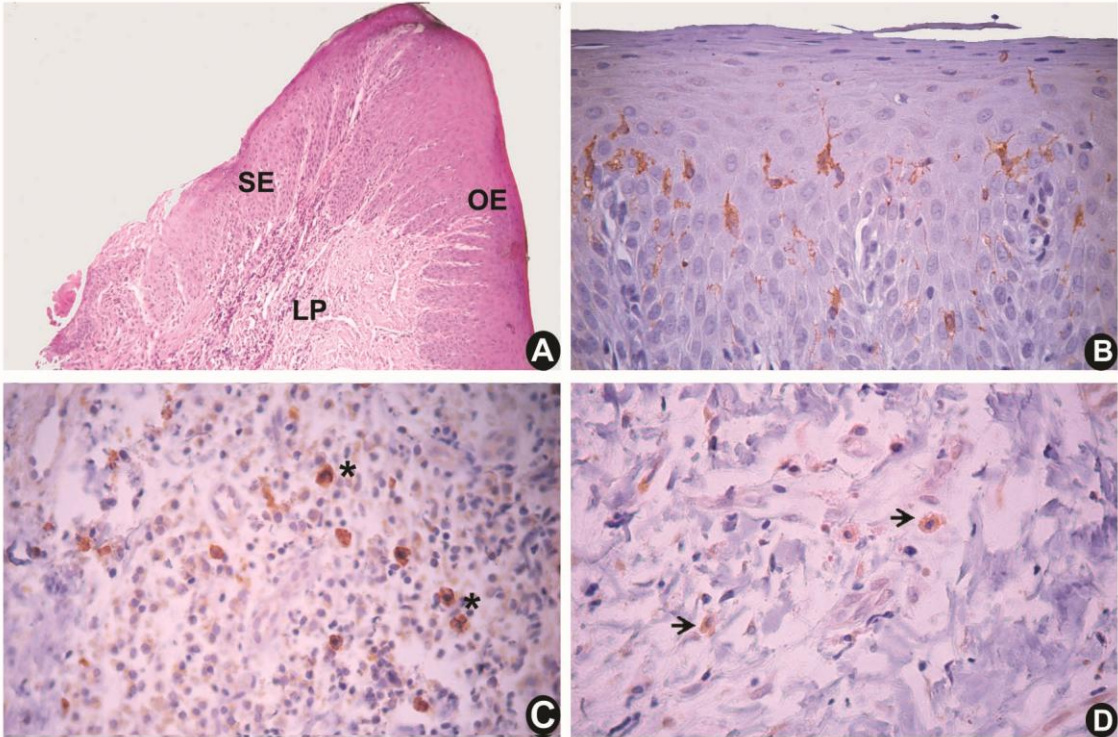


Figure Legend:

Figure 1 – A) Chronic gingivitis. It is possible to identify the oral epithelium (OE), sulcular epithelium (SE), and lamina propria (LP) (haematoxylin-eosin, 100x original magnification). B) Immunohistochemical staining for CD1a+. In the OE, the CD1a+ immature Langerhans cells are presented with dendritic cytoplasm (Streptavidin-biotin 400x original magnification). C) In the LP, the CD1a+ dendritic cells present an oval cytoplasm (asterisks, streptavidin-biotin 400x original magnification). D) Immunohistochemical staining for CD83+ mature dendritic cells in the LP are shown here. The cells present an oval cytoplasm (arrows, streptavidin-biotin 400x original magnification).

Tables

Tables

Table 1- The periodontal clinical parameters of the samples (n= 30).

Clinical Parameters	Descriptive values		
	mean	minimum	maximun
BOP* (% of sites)			
S†	39.9	25.3	81.3
NS‡	48.3	25.8	88.7
PPD§ (mm)			
S	1.96	1.49	2.32
NS	1.72	1.92	3.54
CAL (mm)			
S	2.89	3.17	4.18
NS	2.66	2.98	3.73
Number of Teeth			
S	24.2	20	32
NS	25.6	21	32

* Bleeding on probing

† Smoker

‡ Non-smoker

§ Probing pocket depth

|| Clinical attachment level

Table 2- Mean and median of the density of inflammatory infiltrate cells and CD1a+ cells within the oral epithelium, sulcular epithelium, and lamina propria, as well as CD83+ cells within the lamina propria for both the smokers and non-smokers groups

Region	S* group	NS† group
Inflammatory infiltrate	88 (41- 235)	149 (49- 220) [¶]
CD1a+ cells within OE‡	59.47 (± 28.96)	65.44 (± 23.22)
CD1a+ cells within SE§	9.29 (0.0- 68)	34.22 (14.35- 89) [¶]
CD1a+ cells within LP	15.93 (± 12)	38.76 (± 26.41) [#]
CD83+ cells within LP	5.58 (1.4-25.39)	6.98 (1.63-21.16)

* Smoker

† Non-Smoker

‡ Oral Epithelium

§ Sulcular Epithelium

|| Lamina Propria

¶ Mann-Whitney test (P<0.05)

Student's t-test (P<0.05)

Table 3- Mean and median of the density of CD1a+ cells within the oral epithelium, sulcular epithelium, and lamina propria, as well as CD83+ cells within the lamina propria for both the smokers and non-smokers groups according to the degree of inflammation.

Degree of inflammation	Region	S* group	NS† group
Mild inflammatory infiltrate	CD1a+ cells within OE‡	76 (± 35.9)	71.28 (± 21.49)
	CD1a+ cells within SE§	23.14 (± 22.7)	40.15 (± 28.68)
	CD1a+ cells within LP	16.68 (± 18.9)	45.98 (± 20.69)¶
	CD83+ cells within LP	11.01 (± 8.11)	10.64 (±5.44)
Moderate inflammatory infiltrate	CD1a+ cells within OE	50.48 (± 22.25)	59.57 (± 13.05)
	CD1a+ cells within SE	26.17 (± 33.64)	20.22 (±8.10)
	CD1a+ cells within LP	13.97 (± 11)	38.76 (± 17.63)¶
	CD83+ cells within LP	6.4 (± 6.4)	5.4 (± 5.09)
Intense inflammatory infiltrate	CD1a+ cells within OE	51.9 (± 25.22)	65.46 (± 34.18)
	CD1a+ cells within SE	8.34 (± 5.5)	57.29 (±16.51)¶
	CD1a+ cells within LP	15.78 (11.3-24.8)	18.0 (4.5-101.42)
	CD83+ cells within LP	4.95 (± 3.7)	12.18 (± 7.95)

* Smoker

† Non-Smoker

‡ Oral Epithelium

§ Sulcular Epithelium

|| Lamina Propria

¶ Student's t-test (P<0.05)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo observa-se que as densidades de células CD1a+ do ES e LP foram menores no grupo F quando comparado com grupo NF. No entanto, esse resultado não foi encontrado para células CD1a+ do EB e células CD83+ da LP. Divergentes resultados encontrados na literatura em relação à quantidade de CL e CD na doença periodontal podem ser explicados por esses achados.

As densidades de células do infiltrado inflamatório foram menores no grupo F quando comparado com grupo NF. Foi observado uma forte e positiva correlação entre as células do infiltrado inflamatório e as células CD1a+ do ES, podendo sugerir que as células CD1a+ do ES podem sofrer influência do infiltrado inflamatório. As demais correlações variaram de fraca a moderada.

Não foram observadas diferenças significativas nas densidades de células do infiltrado inflamatório, CD1a+, CD83+ em comparações feitas entre o grupo de indivíduos que fumavam até 15 cigarros por dia e o grupo de indivíduo que fumavam mais de 15 cigarros por dia, bem como entre o grupo de indivíduos que fumavam até 20 anos e o grupo de indivíduos que fumavam há mais de 20 anos.

As correlações variaram de fraca a moderada entre o número de cigarros e tempo do hábito de fumar com a densidade células do infiltrado inflamatório, CD1a+ e CD83+.

8 CONCLUSÕES

Os indivíduos fumantes têm menor densidade de células do infiltrado inflamatório e células CD1a+ do ES e LP na gengivite crônica. As CL e CD são células apresentadoras de antígenos, importantes na determinação do perfil de resposta Th1/Th2 em tecidos periodontais. Assim, estes achados podem contribuir, em parte, para explicar diferenças na progressão da doença periodontal entre F e NF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Ghamdi HS, Anil S. Serum antibody levels in smoker and non-smoker saudi subjects with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1043-1050.
2. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent*. 2000 Nov-Dec;79(6):31-35.
3. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34:9-21.
4. Ayres M, Ayres-Junior M, Ayres DL, Santos AS. *Bioestat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 4 ed. Belém, Pará, Brasil. IOEPA, 2005: 39-52.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-252.
7. Barrett AW, Cruchley AT, Williams DM. Oral mucosal Langerhans' cells. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(1):36-58.
8. Barrett AW, Williams DM, Scott J. Effect of tobacco and alcohol consumption on the Langerhans cell population of human lingual epithelium determined using a monoclonal antibody against HLADR. *J Oral Pathol Med*. 1991 Feb;20(2):49-52.
9. Bennet KR, Read PC. Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers and patients with minor aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1982; 53: 461-465.
10. Bergfelt L, Larkö O, Blohmé I. Skin disease in immunosuppressed patients in relation to epidermal Langerhans' cells. *Acta Derm Venereol*. 1993 Oct;73(5):330-334.

11. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;16 Suppl 6:87-107.
12. Birbeck MS, Breathnach AS, Overall JD. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cell) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1961;37:51–64.
13. Bratke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M. Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jun;38(6):655-660.
14. Buduneli N, Biyikoglu B, Sherrabeh S, Lappin DF: Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2008, 35:846-852.
15. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*. 1997 Aug 15;90(4):1458-1470.
16. Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2a edição. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, 1988, 567p.
17. Costabel U, Bross KJ, Andreesen R, Matthys H. HLA-DR antigens on human macrophages from bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax*. 1986 Apr;41(4):261-265.
18. Cullinan MP, Hamlet SM, Westerman B, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ. Acquisition and loss of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* over a 5-year period: effect of a triclosan/copolymer dentifrice. *J Clin Periodontol* 2003;30:516–541.
19. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, et al. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* 2001;28:1137–1144.

20. Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol*. 2000 Jul;25(5):413-418.
21. Cury PR, Furuse C, Rodrigues AE, Barbuto JA, Araújo VC, Araújo NS. Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis. *Braz Oral Res*. 2008 Jul-Sep;22(3):258-263.
22. Cutler CW, Jotwani R, Palucka KA, Davoust J, Bell D, Banchereau J. Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 1999 Oct;34(7):406-412.
23. Cutler CW, Jotwani R, Pulendran B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect Immun*. 2001 Aug;69(8):4703-4708.
24. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2004;35:135-157.
25. Danesh-Mayer MJ, Wikejö UM. Gingival recession defects and guided tissue regeneration: a review. *J Periodontal Res* 2001; 36: 341-354.
26. Dereka XE, Tosios KI, Chrysomali E, Angelopoulou E. Factor XIIIa+ dendritic cells and S-100 protein+ Langerhans' cells in adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 2004 Dec;39(6):447-452.
27. DiFranco CF, Toto PD, Rowden G, Gargiulo AW, Keene JJ Jr, Connelly E. Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. *J Periodontol*. 1985 Jan;56(1):48-54.
28. Frelinger JG, Hood L, Hill S, Frelinger JA. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature*. 1979 Nov 15;282(5736):161-163.
29. Gemmell E, Bird PS, Carter CL, Drysdale KE, Seymour GJ. Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the T and B cell responses to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 2002;128:238–244 b.
30. Gemmell E, Bird PS, Ford PJ, Ashman RB, Gosling P, Hu Y, Seymour GJ. Modulation of the antibody response by *Porphyromonas gingivalis* and

- Fusobacterium nucleatum* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Aug;19(4):247-251.
31. Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 Dec;17(6):388-393 a.
 32. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14:112–143.
 33. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res.* 1998 Jan;77(1):16-26.
 34. Gemmell E, Seymour GJ. Gamma delta T lymphocytes in human periodontal disease tissue. *J Periodontol.* 1995 Sep;66(9):780-785.
 35. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 21-41.
 36. Giacometti L, Montagna W. Langerhans cells: uptake of tritiated thymidine. *Science.* 1967 Jul 28;157(787):439-40.
 37. Girolomoni G, Caux C, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Ricciardi-Castagnoli P. Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2002 Jan;23(1):6-8.
 38. Gosling PT, Gemmell E, Carter CL, Bird PS, Seymour GJ. Immunohistological analysis of *Tannerella forsythia*-induced lesions in a murine model. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Feb;20(1):25-30.
 39. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontal* 1995; 66: 23-29.
 40. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185(6):1101-1111.

41. Gschnait F, Brenner W. Kinetics of epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 1979 Dec;73(6):566-569.
42. Guntch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E: Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res* 2006, 41:184-188.
43. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontal* 1993; 64: 16-23.
44. Heasman L, Stacey F, Preshave PM, Mccracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontal* 2006; 33: 241-253.
45. Hitzig C, Monteil RA, Charbit Y, Teboul M. Quantification of T6+ and HLA/DR+ Langerhans cells in normal and inflamed human gingiva. *J Biol Buccale.* 1989 Jun;17(2):103-108.
46. Holt PG. Pulmonary dendritic cell populations. *Adv Exp Med Biol.* 1993;169:557-562.
47. Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest.* 2004 Mar;113(5):701-708.
48. Jansson H, Hamberg K, De Bruyn H, Bratthall G. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failure in patient under periodontal maintenance. *Clin Implant Dent Relat Res Canada* 2005; 28:430-436.
49. Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res.* 2003 Sep;82(9):736-741.
50. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, Banchereau J, Cutler C W. Mature Dendritic Cells Infiltrate the T Cell-Rich Region of Oral

Mucosa in Chronic Periodontitis: In Situ, In Vivo, and In Vitro Studies. *The Journal of Immunology* 2001;167: 4693-4700.

51. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*. 1979 Nov 15;282(5736):164-166.
52. Kenny EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1977; 12: 227-234.
53. Kinane DF and Lappin DF. Immune process in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol* 2002; 7: 62-71.
54. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2007;43:278-293.
55. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;39:91–117.
56. Kraal JH, Chancellor MB, Brigdes RB, Bemis KG, Hawke JE. Variations in the gingival polymorphonuclear leukocytes migration rate induced by tobacco smoke. *J Periodont Res* 1977; 12: 242-249.
57. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WMM, Macpherson LMD: Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2007, 34:271-277.
58. Laughter AH, Martin RR, Twomey JJ. Lymphoproliferative responses to antigens mediated by human pulmonary alveolar macrophages. *J Lab Clin Med*. 1977 Jun;89(6):1326-1332.
59. Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res* 1975;10:243–255.
60. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177–187.

61. Lombardi T, Hauser C, Budtz-Jørgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med.* 1993 May;22(5):193-202.
62. López NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutiérrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2144-53.
63. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol.* 2002 Aug;73(8):911-924.
64. Mackenzie IC. Labelling of murine epidermal Langerhans cells with H3-thymidine. *Am J Anat.* 1975 Oct;144(2):127-136.
65. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H: Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2004, 31:267-272.
66. Mullally BH: The influence of tobacco smoking on the onset of periodontitis in young persons. *Tob Induc Dis* 2004, 2:53-65.
67. Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *J Clin Periodontol.* 1982 Jul;9(4):297-304.
68. Nicolas C, Schmitt D. [Langerhans cells: methods of identification]. *Pathol Biol (Paris).* 1984 Mar;16(3):199-208.
69. Niimi A, Tohnai I, Kaneda T, Takeuchi M, Nagura H. Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin A on gingival epithelium. *J Oral Pathol Med.* 1990 Oct;19(9):397-403.
70. Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuuttila ML. Density of CD1a-labeled Langerhans' cells in normal human gingiva and in nifedipine- and immunosuppressivemedication-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1999 Jul;70(7):752-756.

71. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009 Sep;54 Suppl 1:S2-10.
72. Ojima M, Hanioka T. Destructive effects of smoking on molecular and genetic factors of periodontal disease. *Tob Induc Dis.* 2010 Feb 20;8:4.
73. Orbak R, Erciyas K, Kaya H: Flow-cytometric analysis of T-lymphocyte subsets after different treatment methods in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Int Dent J* 2003, 53:159-164.
74. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976;34:235–249.
75. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA: Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005, 16:180-195.
76. Pankow W, Neumann K, Rüschoff J, Schröder R, von Wichert P. Reduction in HLA-DR antigen density on alveolar macrophages of smokers. *Lung.* 1991;169(5):255-262.
77. Papantonopoulos GH. Effect of periodontal therapy in smokers and non-smokers with advanced periodontal disease: results after maintenance therapy for minimum of 5 years. *J Periodontol, United States* 2004; 75 (6): 839-843.
78. Parkhill JM, Henning BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 682-689.
79. Pauletto NC, Liede K, Nieminen A, Larjava H, Uitto VJ: Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *J Periodontol* 2000, 71:58-62.
80. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. *J Periodontal Res* 1996; 31: 99-104.
81. Petropoulos G, McKay IJ, Hughes FJ: The association between neutrophil numbers and interleukin-1alpha concentrations in gingival crevicular fluid of

- smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004, 31:390-395.
82. Preber H, Bergström J. Cigarette and smoking in patients referred periodontal treatment. *Scand J Dent Res* 1986; 94: 102-108.
 83. Preber H, Bergström J. Occurrence of gingival bleeding on smoker and non-smoker patient. *Acta Odontol Scand* 1985; 43: 315-160.
 84. Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF: Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. *J Oral Pathol Med* 2002, 31:59-64.
 85. Riedl E, Stöckl J, Majdic O, Scheinecker C, Knapp W, Strobl H. Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4276-4284.
 86. Riva S, Nolli ML, Lutz MB, Citterio S, Girolomoni G, Winzler C, Ricciardi-Castagnoli P. Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. *J Inflamm*. 1996;46(2):98-105.
 87. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, Cox G, Stämpfli MR. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Feb;30(2):202-211.
 88. Robbins CS, Franco F, Mouded M, Cernadas M, Shapiro SD. Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6623-6628.
 89. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells -dendritic cells of the epidermis. *APMIS*. 2003 Jul-Aug;111(7-8):725-740.
 90. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:173–201.

91. 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.* 2000 Jun;45(6):441-452 b.
92. Séguier S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Quantitative morphological analysis of Langerhans cells in healthy and diseased human gingiva. *Arch Oral Biol.* 2000 Dec;45(12):1073-1081 a.
93. Seymour GJ, Gemmell E, Walsh LJ, Powell RN. Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin Exp Immunol* 1988;71:116–137.
94. Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF. Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol* 1983;54:522–528.
95. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2004;35:9-13
96. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002 May;2(5):372-377.
97. Stavropoulos A, Mardas N, Herrero F, Karring T. Smoking affects the outcomes of guide tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analyses of intrabony defects. *J Clin Periodontol, Denmark* 2004; 31(11): 945-950.
98. Streilein JW, Toews GT, Gilliam JN, Bergstresser PR. Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: the role of Langerhans cell density within epidermis. *J Invest Dermatol.* 1980 May;74(5):319-322.
99. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol.* 1980 Jan;124(1):445-453.
100. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2000 May;71(5):743-751

101. Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Siafakas NM, Barnes NC, Jeffery PK. Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 May 1;175(9):919-925.
102. Zavala WD, Cavicchia JC. Deterioration of the Langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging. *Arch Oral Biol*. 2006 Dec;51(12):1150-1155.
103. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2588-2592.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE

Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Parecer: 0393.0.203.410-09A

Pesquisador responsável: Ricardo Alves Mesquita

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte – CEP/SMSA/BH aprovou em 16 de setembro de 2009, o projeto de pesquisa intitulado “**Análise quantitativa das células de Langerhans e dendríticas em gengivite de fumantes e não fumantes**”, bem como seu termo de consentimento.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final deste, se em prazo inferior a um ano.



Celeste de Souza Rodrigues

Coordenadora do CEP/SMSA/BH

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS



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

Parecer nº. ETIC 0393.0.203.410-09

Interessado(a): **Prof. Ricardo Alves de Mesquita**
Depto. de Clínica, Patológica e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de março de 2010, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise quantitativa das células de Langerhans de dendríticas em gengiva de fumantes e não fumantes**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C – 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 gengivite crônica fumantes e não fumantes. Para isso precisamos analisar pequenos pedaços de gengiva que são removidos durante o acerto de tecido mole de dentes com indicação de extração. Gostaríamos de contar com sua colaboração, esclarecendo que:

A pesquisa consiste em preenchimento de prontuário odontológico onde deverão constar radiografias recentes do elemento indicado para exodontia.

Não há nenhum risco para o paciente uma vez que a remoção da gengiva em excesso após a cirurgia de exodontia é necessária para realizar a sutura da ferida. Estes pedaços de gengiva que seriam jogados fora é que irão fazer parte da pesquisa.

O atendimento será com material estéril, seguindo o protocolo de esterilização do serviço odontológico da Prefeitura de Belo Horizonte e da Faculdade de Odontologia da UFMG.

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

Todos os participantes poderão, a qualquer momento, desistir de fazer parte dessa pesquisa, e ainda assim continuarão a receber o tratamento proposto.

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.

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:

- Giovanna Ribeiro Souto 3227 – 5525/ 97692709
 - Ricardo Alves de Mesquita 3499-2499
 - Comitê de Ética em Pesquisa SMSA/PBH 3277- 5309
 - Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – sala 2005
- CEP: 31270-901 – BH –MG telefax (031) 3409-4592 – email; coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ estou ciente que tenho necessidade de extração de determinado elemento dentário e concordo em participar deste estudo. Estou ciente que durante a cirurgia de extração, 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 Mestrado em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG, desde que seja resguardado minha identidade.

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: _____