

## Quantidade elevada do fator de crescimento transformante beta em sítios com destruição tecidual, em pacientes com periodontite crônica

Edson Marcus Cezário<sup>1</sup>

Carlos Marcelo da S. Figueredo<sup>2</sup>

### Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar os níveis de TGF- $\beta$  presentes no fluido gengival de sítios com destruição tecidual (PP) de pacientes com periodontite crônica generalizada e compará-los aos níveis de TGF- $\beta$  de sítios com inflamação gengival, mas sem sinais de perda de inserção desses mesmos pacientes (GP) e de pacientes com gengivite somente (GG). A população era composta de 17 pacientes com periodontite crônica, com média de idade de 48,2 anos (DP $\pm$  7,5), e de 19 pacientes-controle, com média de idade de 48 anos (DP $\pm$  9), sem sinais clínicos de perda de inserção. Os parâmetros clínicos analisados foram: Índice de Placa (IP), Índice Gengival (IG), Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) e Nível de Inserção Clínica (NI). As amostras de fluido gengival foram coletadas com o método de lavagem intra-sulcular. Os níveis de TGF- $\beta$ , nas amostras coletadas, foram determinados através da técnica de ELISA. Os resultados mostram que a quantidade de TGF- $\beta$ , nos sítios PP (8,2 ng  $\pm$  DP9,7), foi significativamente maior do que em sítios GP (2,2 ng  $\pm$  DP4,3) ( $p < 0,001$ ). Não foram observadas diferenças significantes entre GP e GG (4,3ng, DP  $\pm$  9,1), e entre PP e GG. Conclui-se que a diferença significativa entre os níveis de TGF- $\beta$ , nos sítios PP, quando comparados aos sítios GP, sugere que essa citocina possui um papel significativo no processo de destruição tecidual em pacientes portadores de periodontite crônica.

**Palavras-chave:** TGF-beta. Periodontite. Doença periodontal.

### INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma doença de natureza multifatorial, em que a interação de uma infecção microbiana da superfície dental com os mecanismos de defesa dos tecidos adjacentes resulta em perda clínica de inserção, pela destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. (ASSUMA et al., 1998)

De acordo com Page e Schoreder (1976), a progressão da inflamação gengival, com base nas evidências clínicas e histopatológicas, divide-se em quatro fases: inicial, precoce, estabelecida e avançada. As lesões inicial e pre-

coce representam a histopatologia das fases clinicamente agudas ou iniciais da gengivite, enquanto a lesão estabelecida reflete a histopatologia da forma da gengivite crônica. A descrição histopatológica da lesão avançada reflete a progressão da gengivite para a periodontite. Diversas citocinas e fatores de crescimento, produzidos e liberados por células inflamatórias, desempenham um importante papel no processo tecidual e, conseqüentemente, na progressão da doença periodontal. Porém sua presença também é fundamental para o reparo

<sup>1</sup> Mestre em Periodontia pela UNIGRANRIO.

<sup>2</sup> Professor Adjunto de Periodontia da UNIGRANRIO e UERJ.

#### Correspondência para / Correspondence to:

Carlos Marcelo da S. Figueredo  
Av Marechal Henrique Lott 180 bl 1 apt 1904 - Barra da Tijuca.  
22631-370 Rio de Janeiro - RJ - Brasil.  
Email: cmfigueredo@hotmail.com

e a regeneração dos tecidos lesados pela doença. (KEHRL; WAKEFIELD; ROBERTS, 1986; HOCK; CANALIS, 1994; MARX; GARG, 1999)

Entre os fatores de crescimento, o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pode atuar tanto na cicatrização quanto na destruição tecidual (FAVA et al., 1991). No presente estudo, interessou-nos quantificar a presença do TGF- $\beta$  durante o processo de inflamação periodontal. A presença de TGF- $\beta$  em sítios com infecção e inflamação pode levar ao recrutamento, à aderência e à atividade dos leucócitos. (WAHL et al., 1991; ADAMS et al., 1991)

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar os níveis de TGF- $\beta$  no fluido gengival de sítios com destruição tecidual (PP) de pacientes com periodontite crônica generalizada e compará-los aos níveis de TGF- $\beta$  de sítios com inflamação gengival, mas sem sinais de perda de inserção desses mesmos pacientes (GP) e de pacientes atingidos apenas por gengivite (GG).

## MATERIAIS E MÉTODOS

A população foi constituída por 24 pacientes com periodontite crônica, com média de idade de 48,2 anos (DP+ 7,4) e pelo menos 5 bolsas com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm, e 19 pacientes-controle, com média de idade de 48,1 anos (DP+ 9,5), sem sinais clínicos de perda de inserção. Os participantes do estudo não apresentavam doenças sistêmicas ou infecções e forneceram consentimento informal para participarem do estudo.

### Parâmetros clínicos

A presença de placa supragengival (IP) e inflamação gengival (IG) foi registrada antes da coleta, utilizando-se o critério de Silness e Löe (1964). Apenas sítios com um valor de IG de 1 ou 2 foram incluídos. Em sítios sem inflamação gengival (valor 0), o volume de fluido gengival foi insuficiente para permitir a medição, enquanto sítios muito inflamados (IG=3) apresentavam contaminação com sangue. O registro da profundidade da bolsa à sondagem foi realizada

com uma sonda periodontal calibrada, tipo Hufridy<sup>®</sup>, que foi mantida paralela ao longo eixo do dente, registrando o milímetro mais próximo.

### Coleta

No grupo de pacientes com periodontite, 3-6 sítios com bolsas > 5 mm (sítios PP) e 3-6 sítios com bolsas rasas (GP) foram utilizados para a coleta. No grupo-controle, 3-6 sítios com inflamação gengival (GG) foram utilizados. O fluido gengival (GCF) foi coletado através de lavagem do sulco ou bolsa, pelo método de Salonen & Paunio (1991) com algumas modificações. Cada bolsa foi lavada 5 vezes, com 5 ml de PBS e contínua aspiração. Todas as amostras obtidas de sítios de mesma categoria, em cada pessoa, foram reunidas e diluídas com PBS até 1ml. Amostras contaminadas com sangue foram descartadas. As amostras foram imediatamente centrifugadas em 3000g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70° C e mantidos dessa forma até a sua análise.

### Análise do TGF- $\beta$

O conteúdo do TGF- $\beta$ , nas amostras de fluido crevicular gengival, foi medido com um Kit ELISA comercialmente disponível (Quantikine, R & D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). Logo em seguida, as amostras foram diluídas 100 vezes com diluente calibrador e adicionadas a uma placa coberta previamente com anticorpos monoclonais contra TGF- $\beta$ . Para o antígeno ligado, havia um anticorpo policlonal conjugado a uma enzima. Finalmente, o substrato era adicionado. A absorção de cor era lida a 405nm, em um espectrofotômetro, após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente.

### Análise estatística

A significância de diferenças entre pacientes com periodontite e controles foram calculados com teste de *Mann Whitney* e as diferenças entre as categorias de sítios em pacientes com periodontite com o teste de *Wilcoxon signed-rank*.

## RESULTADOS

Os resultados clínicos mostraram que os índices de placa e de inflamação gengival foram similares em sítios com periodontite (PP) e sítios com gengivite (GG) de pacientes portadores apenas de gengivite, mas ligeiramente mais baixos em bolsas rasas (GP) de pacientes com periodontite (TABELA 1).

A quantidade de TGF- $\beta$  no fluido gengival de sítios com perda de inserção (PP) de pacientes com periodontite (8.2, DP  $\pm$  9.7) foi significativamente maior ( $p= 0.001$ ) que nas amostras de pacientes GP (2.2, DP $\pm$  4.3). Não foram encontradas diferenças significativas entre a quantidade de TGF- $\beta$  entre PP e GG (4.3, DP $\pm$  9.1) e entre GP e GG.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observada uma quantidade significativamente elevada de TGF- $\beta$  nos sítios PP, quando comparados aos sítios GP. Esses resultados sugerem um possível papel dessa citocina no processo de destruição periodontal.

O TGF- $\beta$  foi identificado em sítios inflamatórios crônicos e demonstrou apresentar propriedades pró-inflamatórias, promovendo quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e

linfócitos (LIN et al., 2000; SUAREZ et al., 2004). No estudo de Buduneli e colaboradores (2001), avaliou-se a quantidade de TGF- $\beta_1$  no fluido gengival de pacientes tratados com Ciclosporina A e notou-se que ele estava aumentado nos sítios com gengivite, se comparados aos sítios saudáveis, mostrando sua relação com o processo inflamatório.

De acordo com Skaleric e colaboradores (1997), sítios com inflamação moderada e severa podem apresentar níveis elevados de TGF- $\beta$  no fluido gengival, o que suporta os nossos achados. Além disso, o TGF- $\beta$  pode aumentar a expressão de integrina e a adesão de leucócitos para o endotélio e a matriz extracelular (WAHL et al., 1991). Sabe-se que os leucócitos constituem até 47% das células no sulco gengival (SHARRY; KRASSE, 1960), sendo que os PMNs podem constituir cerca de 95% das células inflamatórias no fluido, seguidos de 3% de monócitos e 2% de linfócitos (ATTSTRÖM, 1970). Tal fenômeno pode potencializar o processo inflamatório durante a gengivite.

As principais células produtoras de TGF- $\beta$  são as plaquetas, os linfócitos e os neutrófilos (ANITUA, 1999; SUAREZ et al., 2004). Os monócitos também podem interferir na quantidade de TGF- $\beta$  tecidual. Wahl e colaboradores (1991) mostraram que, em monócitos, depois de ativados por *Fusobacterium nucleatum*, ocorria o aumento dos níveis de TGF- $\beta$ . Sendo

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) para Índice Gengival (IG), Índice de Placa (IP), Profundidade de Bolsa à Sondagem (PBS) e Fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) nas três categorias.

	GG (n = 19)	<i>p1</i>	GP (n = 17)	<i>p2</i>	PP (n = 17)	<i>p3</i>
IG	1,3 ( $\pm$ 0,4)	N.S	1,3 ( $\pm$ 0,4)	N.S	1,8 ( $\pm$ 0,3)	N.S
IP	1,7 ( $\pm$ 0,5)	N.S	1,5 ( $\pm$ 0,6)	N.S	2,1 ( $\pm$ 0,5)	N.S
PBS	2,1 ( $\pm$ 0,4)	N.S	1,7 ( $\pm$ 0,1)	<0,0001	6,2 ( $\pm$ 0,8)	<0, 0001
TGF- $\beta$	4,3 ( $\pm$ 9,1)	N.S	2,2 ( $\pm$ 4,3)	0,001	8,2 ( $\pm$ 7,1)	N.S

Nota: *p1*: indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e GP calculados com teste de U Mann-Whitney  
*p2*: indica a probabilidade da diferença entre sítios GP e PP calculados pelo teste Wilcoxon.  
*p3*: indica a probabilidade da diferença entre sítios GG e PP calculados com teste U Mann-Whitney.  
 N.S: não significante

assim, um longo período de tempo de acúmulo de placa na área dento-gengival pode levar uma maior atração e degranulação de leucócitos.

Conclui-se que a diferença significativa entre os níveis de TGF- $\beta$  nos sítios PP, quando

comparados aos sítios GP, sugere que essa citocina possui um papel significativo no processo de destruição tecidual em pacientes portadores de periodontite crônica.

### *Increased amounts of TGF-beta in sites with tissue destruction from patients having chronic periodontitis*

#### **Abstract**

*The aim of this study was to evaluate the levels of TGF- $\beta$  in tissue destruction sites in patients with chronic generalized periodontitis (PP) and to compare with gingival inflammation sites, without tissue destruction in the same patients (GP) and in patients with only gingivitis (GG). The test group consisted of 17 patients with chronic periodontitis, with the average age of 48,2, (DP  $\pm$  7,5 years), with chronic periodontitis. The control group was formed by 19 subjects, with the average age of 48 (DP  $\pm$  9), with chronic inflamed gingiva without signs of periodontal destruction. The analyzed clinical parameters were Plaque Index (PI), Gingival Index (GI), Pocket Probing Depth (PPD) and Attachment Level (AL). GCF samples were collected by a method of washing the furrows. The levels of TGF- $\beta$  have been measured total with specific antibodies and analyzed by ELISA. The results showed that the amounts of TGF- $\beta$  were significantly higher in PP sites (8,2ng  $\pm$  DP 9,7) when compared with GP (2,2ng  $\pm$  DP 4,3) ( $p < 0,001$ ). There was no significant difference between GP e GG (4,3 ng, DP  $\pm$  9,1), and between PP e GG. In conclusion, the higher amounts of TGF- $\beta$  observed in PP when compared with GP suggested that this cytokine played an important role in the process of tissue destruction in patients with chronic periodontitis.*

**Keywords:** TGF-beta. Periodontitis. Periodontal disease.

#### **REFERÊNCIAS**

- ADAMS, D.H. et al. Transforming growth factor-b induces human T lymphocyte migration in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, v.147, p.609-612, 1991.
- ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.14, p.529-535, 1999.
- ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.160, p.403-409, 1998.
- ATTSTRÖM, R. Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronical inflamed gingivae. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.5, p.42-47, 1970.
- BUDUNELI, N. et al. Evaluation of transforming growth factor-beta 1 level in crevicular fluid of cyclosporin-A treated patients. **J. Periodontol.**, Chicago, v.72, n.4, p.526-531, Apr. 2001.
- FAVA, R.A. et al. Transforming growth factor b1 (TGF-b1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-driven synovial inflammation and hyperplasia. **J. Exp. Med.**, New York, v.173, p.1121-1132, 1991.
- HOCK, J.; CANALIS, E. Platelet-derived growth factor enhances bone replication, but not differentiated function of osteoblasts.

- Endocrinology**, Baltimore, v.134, p.1423-1428, 1994.
- KEHRL, J.H.; WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B. Production of transforming growth factor- $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp. Med.**, New York, v.163, p.1037, 1986.
- LIN, S.K. et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor- $\beta$  1 in induced rat periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.6, p.335-340, 2000.
- MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hiperbaric oxygen. In: JENSEN, Ole T. **The sinus bone graft**. Chicago: Quintessence, 1999. p.183-189.
- PAGE, R.; SCHROEDER, H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. **Lab. Invest.**, Hagerstown, v.34, p.235-249, 1976.
- SALONEN, J.I.; PAUNIO, K.U. An intracrevicular washing method for collection of crevicular contents. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.99, n.5, p.406-412, 1991.
- SHARRY, J.J.; KRASSE, B. Observations on the origin of salivary leukocytes. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.18, p.347-348, 1960.
- SILNESS, J.; LÖE, H. Periodontal disease in pregnancy II: Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.22, p.121-135, 1964.
- SKALERIC, U. et al. Changes in TGF- $\beta$  1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.105, n.2, p.136-142, 1997.
- SUAREZ, L.J. et al. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.75, n.9, p.1209-1215, 2004.
- WAHL, S.M. et al. TGF- $\beta$  in development and inflammation of oral tissues. In: HAMADA, S.; HOLT, S.C.; MCGHEE, J.R. (Ed.). **Periodontal disease: pathogens and host immune responses**. Tokyo: Quintessence, 1991. p.321-327.

Recebido em / Received: 03/05/2004

Aceito em / Accepted: 05/11/2004