



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Roberta Rocha Pedreira

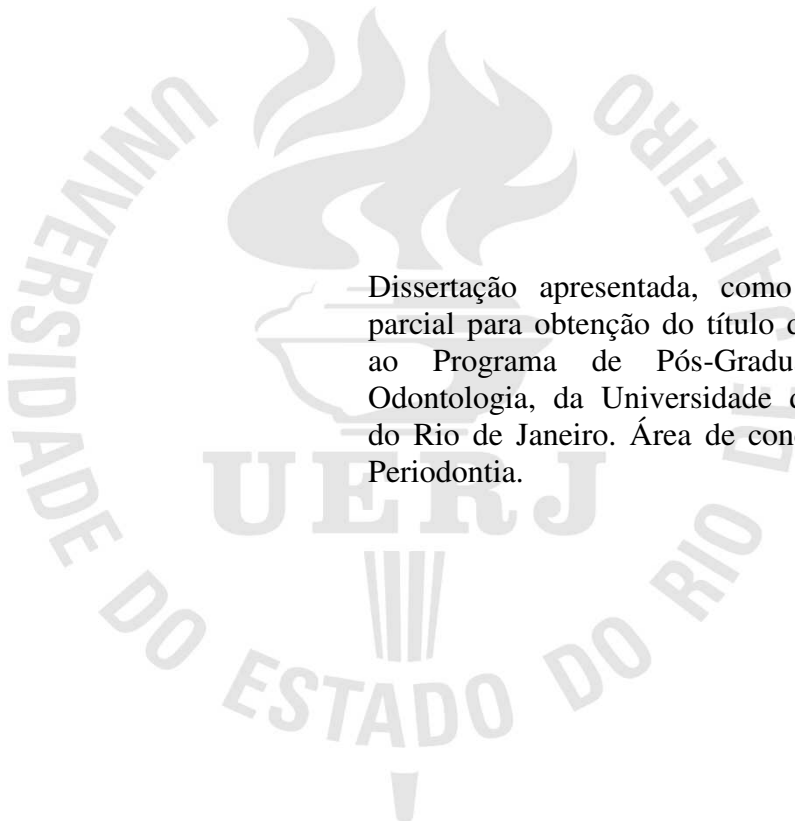
**Nível de IL-4 no fluido gengival e no soro dos indivíduos com doença
inflamatória intestinal com periodontite**

Rio de Janeiro

2009

Roberta Rocha Pedreira

**Nível de IL-4 no fluido gengival e no soro dos indivíduos com doença inflamatória
intestinal com periodontite**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

P371 Pedreira, Roberta Rocha.
 O nível de IL-4 no fluido gengival e no soro dos indivíduos com doença
 inflamatória intestinal com periodontite./ Roberta Rocha Pedreira - 2009.
 83 f.

 Orientador: Carlos Marcelo da Silva Figueredo.
 Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
 Faculdade de Odontologia.

 1. Periodontite. 2. Intestinos – Doenças inflamatórias. 3. Interleucina-4.
 I. Figueredo, Carlos Marcelo da Silva. II. Universidade do Estado do Rio
 de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Roberta Rocha Pedreira

Nível de IL-4 no fluido gengival e no soro dos indivíduos com doença inflamatória intestinal com periodontite

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 7 de dezembro de 2009.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Marília da Silva Pereira Bittencourt
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Magali Silveira Monteiro Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que tanto se dedicaram a minha formação moral, ética, emocional e educacional. Que com tanto amor e carinho conseguiram fazer com que três crianças que algumas vezes se desentendiam, crescessem e se tornassem melhores amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve ao meu lado, me oferecendo saúde, família e oportunidade de continuar a estudar.

À minha família pelo constante apoio e incentivo recebido ao longo dos anos, na busca do aprimoramento profissional. Em especial, ao meu marido e companheiro de todas as horas, que com carinho e paciência compartilhou as tarefas pessoais, para que tal objetivo pudesse ser cumprido com a devida dedicação.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, que com tamanha consciência colaboraram para que o conhecimento avance. Agradeço a toda equipe do departamento de Gastroenterologia dos hospitais Clementino Fraga Filho da UFRJ e Pedro Ernesto da UERJ, que nos receberam para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Carlos Marcelo da Silva Figueredo – meu orientador, que nos momentos de dificuldades, iluminava o caminho para que os próximos passos pudessem ser dados. Ao Professor Ricardo Guimarães Fischer sempre tão dedicado à formação de um mestre capaz de refletir e analisar os fatos de forma coerente. Aos professores que com grande dedicação compartilharam seus conhecimentos durante o curso, com objetivo de formação de mestres capazes de se dedicar à profissão, na qual é responsável em grande parte pelo crescimento de um país – o Professor.

Às amigas, Fernanda Brito, Juliana Santos Menegat e Fabiana Cervo de Barros que fizeram parte da equipe que realizou este trabalho. À Maria Jorginete da Silva que sempre me auxiliou com tanto carinho no atendimento clínico. E aos amigos e colegas que me apoiaram e incentivaram durante o curso.

Só tem convicções aquele que não aprofundou nada.

Cioran

RESUMO

PEDREIRA, Roberta Rocha. *O nível de IL-4 no fluido gengival e no soro dos pacientes com doença inflamatória intestinal com periodontite*. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O objetivo desta dissertação foi avaliar os níveis de IL-4 no fluido gengival (GCF) de sítios com doença periodontal de pacientes com doença intestinal inflamatória (DII) e compará-los aos níveis encontrados em indivíduos sistemicamente saudáveis. Como objetivo secundário, avaliamos os níveis da IL-4 no soro desses pacientes. A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina, produzida por células Th2, macrófagos e monócitos, tem propriedades anti-inflamatórias capacidade de induzir apoptose em monócitos. Foi demonstrado em biópsias intestinais menor concentração células T secretoras de IL-4 e de RNAm de IL-4 transcrito nos indivíduos com DII em comparação com controles sadios. Nosso grupo observou uma maior prevalência de doença periodontal nos indivíduos com doença de Crohn. Os 45 indivíduos foram divididos em três grupos: doença de Crohn(DC) n=15, Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) n=15 e grupo controle (GC) n=15. O exame periodontal foi realizado em seis sítios por dente, quanto aos seguintes parâmetros clínicos: profundidade de bolsa (PB), nível de inserção(NI), presença de placa, sangramento à sondagem. Em cada paciente, o fluido de 4 sítios com periodontite ($PB \geq 5$ mm e $NI \geq 3$ mm) e de 4 sítios com gengivite ($PB \leq 3$ mm e $NI \leq 1$ mm) foram coletados através de pontas de papel absorvente pré-fabricadas. O volume do fluido foi determinado pelo Periotron 8000®. O sistema LUMINEX® foi utilizado na mensuração da IL-4. Para as características clínicas dos indivíduos avaliados, houve diferença significativa no número de ex-fumantes entre os grupos RCUI e GC. Quanto aos parâmetros clínicos periodontais avaliados em todos os dentes houve diferença na profundidade de bolsa entre os pacientes com DII e o controle, e para os dentes selecionados para coleta houve diferença na profundidade de bolsa entre os grupos de DC e GC nos sítios de gengivite. Nos sítios com gengivite, a quantidade total de IL-4 foi significativamente menor no grupo RCUI do que no grupo GC ($p=0.016$). Nos sítios com periodontite, a quantidade total de IL-4 foi significativamente menor no grupo DC do que no grupo GC ($p=0.029$). Não encontramos diferença nos níveis de IL-4 no soro entre todos os grupos. Concluindo, os níveis da IL-4 estavam mais baixos nos sítios com periodontite dos pacientes com doença inflamatória intestinal quando comparados aos controles, por outro lado não houve diferença na expressão no soro, indicando que uma possível baixa dessa citocina no fluido gengival pode estar relacionada com a patogenia da periodontite nesses pacientes.

Palavras-chave: Periodontite. Doença Inflamatória intestinal. Interleucina 4.

ABSTRACT

PEDREIRA, Roberta Rocha. *IL-4 levels in gingival crevicular fluid of periodontal disease sites and in serum of Inflammatory Bowel Disease patients*. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Our aim was to evaluate IL-4 levels in gingival crevicular fluid (GCF) of periodontal disease sites in Inflammatory Bowel Disease (IBD) patients and compared to systemic healthy controls. Interleukin 4 (IL-4) is produced by Th2 cells, macrophages and monocytes, it has anti-inflammatory properties and promotes apoptosis in monocytes. As a secondary goal, we evaluated serum IL-4 levels. Compared to healthy controls, low levels of T cell secreting IL-4 in bowel biopsies, and low levels of IL-4 RNA transcript in IBD patients were demonstrated. Furthermore, our group observed periodontal disease prevalence was higher in Crohn disease patients. Forty-five individuals were allocated in three groups: Crohn disease (CD) n=15, Idiopathic Ulcerative Colitis (IUC) n=15, and healthy group (GC) n=15. Probing depth (PD), attachment levels (AL), plaque presence, and blood on probing was examined in six sites per tooth. In every subject, GCF from 4 gingivitis sites ($PPD \leq 3\text{mm}$ and $CAL \leq 1\text{mm}$) and from 4 periodontitis sites ($PPD \geq 5\text{mm}$ and $CAL \geq 3\text{mm}$) was collected with filter strips. The data were reported as total amount, and concentration IL-4 were analyzed by the Luminex® analyzer. Gingival crevicular fluid volume was determined by Periotron 8000®. Serum IL-4 levels were determined by ELISA. IUC presented a higher number of former smokers than GC. There was a difference in probe depth between the IBD group and control. When gingival crevicular fluid teeth selected were analyzed, the difference was shown only between CD and GC in gingivitis sites. In gingivitis sites, the total amount of IL-4 was significantly lower in the UC group than in the CG group ($p=0.016$). In periodontitis sites, the total amount of IL-4 was significantly lower in the CD group than in the CG group ($p=0.029$). The total amount of IL-4 was lower in the UC group than in the CD group ($p=0.077$). Similarly, IL-4 concentrations in both CD ($p=0.096$) and UC ($p=0.064$) groups were lower than in CG. In conclusion, IBD patients had lower IL-4 levels in the GCF than healthy controls. Serum IL-4 levels showed no difference for all groups. Furthermore, IL-4 levels were lower in periodontitis sites from inflammatory bowel disease subjects; however, changes in IL-4 levels were not presented in serum levels, indicating IL-4 lower levels could be related to periodontal pathogenesis in these individuals.

Keywords: Periodontitis. Inflammatory Bowel Disease. Interleukin 4.

LISTA DE TABELAS

Tabela1-	Características clínicas dos pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e controles.....	27
Tabela 2-	Parâmetros clínicos periodontais dos dentes selecionados para coleta de fluido gengival nos sítios com gengivite nos pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e do grupo controle.....	28
Tabela 3-	Parâmetros clínicos periodontais dos dentes selecionados para coleta de fluido gengival nos sítios com periodontite nos pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e do grupo controle....	28
Tabela 4-	Análise dos níveis de IL-4 no fluido gengival dos sítios com gengivite dos pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e controle.....	29
Tabela5-	Análise dos níveis de IL-4 no fluido gengival dos sítios com periodontite dos pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e controle.....	29
Tabela 6-	Comparação da quantidade dos mediadores inflamatórios no fluido gengival dos sítios com gengivite e periodontite em pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa idiopática e controle.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
ELISA	EnzymeLinkedImmunosorbentassay
GC	Grupo controle
GCF	Fluido gengival
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
kDa	quilodalton
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
ND	Não- detectado
NI	Nível de inserção
PB	Profundidade de bolsa
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
ra	Receptor antagonista
RCUI	Retocolite ulcerativa idiopática
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SS	Sangramento à sondagem
Th	T auxiliares
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1	Doença intestinal inflamatória.....	14
1.2	Doença Periodontal.....	15
1.3	Papel da Il-4 na resposta inflamatória.....	16
1.4	IL-4 na Doença Periodontal.....	17
1.5	IL-4 na Doença inflamatória intestinal.....	19
2	OBJETIVO.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Indivíduos Selecionados.....	21
3.2	Crterios de inclusão e exclusão testadas.....	21
3.3	Aspectos éticos.....	21
3.4	Coleta dos dados.....	22
3.5	Exame clínico.....	22
3.6	Coleta de sangue.....	23
3.7	Coleta do fluido gengival.....	23
3.8	Análise por LUMINEX.....	24
3.9	Análise estatística.....	24
4	RESULTADOS.....	25
4.1	Características clínicas e periodontais.....	25
4.2	Análise do fluido gengival e do soro.....	25
5	DISCUSSÃO.....	31
6	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	APÊNDICE A- Inter-relação entre a doença periodontal e a doença de Crohn (Artigo).....	42
	APÊNDICE B-Índice elevado de CPOD em pacientes com Doença inflamatória intestinal (Artigo).....	43
	APÊNDICE C- Prevalência de periodontite em pacientes com doença inflamatória intestinal (Artigo).....	44
	APÊNDICE D- Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and	

serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. (Artigo).....	45
ANEXO A -Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ.....	46
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRJ.....	47

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença multifatorial que resulta da interação entre as bactérias que colonizam a superfície radicular e os mecanismos de defesa do hospedeiro^{1, 2}. Embora a prevalência de patógenos periodontais na população em geral seja moderada à alta, é reconhecido que os indivíduos não são igualmente suscetíveis ao desenvolvimento da doença³⁻⁵. Isto é, a presença bacteriana é fundamental para indução da resposta inflamatória nos tecidos periodontais, mas sua presença por si só, não é suficiente para destruição tecidual¹.

Vários estudos têm sido realizados com objetivo de esclarecer as causas e mecanismos que podem resultar nesta suscetibilidade aumentada em alguns indivíduos⁶. Entre os possíveis mecanismos estudados estão os relacionados à genética⁷ e às alterações quantitativas de citocinas no fluido gengival, responsáveis pela resposta imune do hospedeiro⁸. O equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias parece ser importante para o estabelecimento e progressão da doença periodontal. Cochran⁹ mostra uma relação positiva entre a quantidade aumentada de citocinas pró-inflamatórias e a destruição periodontal, enquanto que Giannopoulou e colaboradores¹⁰ mostram que o dano periodontal pode estar relacionado à redução das citocinas antiinflamatórias. A alteração no equilíbrio das citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias também foi demonstrada por Gemmell e colaboradores² e Loos e Tjoa¹¹.

A Interleucina-4 (IL-4) é uma das citocinas antiinflamatórias comumente estudadas, que apresenta a capacidade de diminuir a produção de citocinas IL-1, fator de necrose tumoral α (TNF α) e IL-6 em monócitos do sangue periférico de humanos^{12, 13}. Esta citocina apresenta-se diminuída no fluido gengival de indivíduos com periodontite e seu aumento tem sido relacionado com a remissão da doença periodontal¹⁴.

A IL-4 parece ter um importante papel em outras doenças crônico-inflamatórias, como por exemplo, artrite¹⁵ e a doença inflamatória intestinal (DII)¹⁶. A doença inflamatória intestinal é dividida em duas entidades principais: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI). Ambas possuem similaridades em relação aos sintomas, mas também possuem muitas diferenças. Elas se diferenciam quanto à localização no intestino, pois a Retocolite Ulcerativa Idiopática geralmente acomete as partes mais baixas do cólon e o reto, mas podem acometer todo cólon. Já a doença de Crohn acomete com mais frequência o

intestino delgado, mas pode acometer a boca, esôfago, estômago, duodeno apêndice e ânus¹⁷. A colite ulcerativa também se diferencia da doença de Crohn no aspecto histológico, pois a inflamação na Retocolite ulcerativa Idiopática é superficial e limitada ao cólon, enquanto a inflamação na doença de Crohn geralmente é transmural, multifocal, e pode ter granuloma. Os mecanismos imunes da Retocolite Ulcerativa Idiopática e da doença de Crohn parecem ser distintos. Geralmente a doença de Crohn é considerada um processo inflamatório de resposta Th1 com grande expressão de interferon gama (INF γ) e IL-2 que irá induzir a expressão da citocina IL-12. Já a colite ulcerativa é atípica, há grande expressão de IL-5 e IL-13, citocinas comumente associadas à resposta Th2, entretanto a citocina IL-4 tipicamente Th2, não aparece aumentada e há grande concentração de INF γ ¹⁸.

Como o trabalho realizado por nosso grupo mostra que a prevalência da periodontite está aumentada entre os indivíduos com DII¹⁹, resolvemos avaliar se há alteração nos níveis de IL-4 no fluido gengival dos pacientes com DII com periodontite. Sendo assim, o objetivo desta dissertação foi avaliar os níveis de IL-4 no fluido gengival (GCF) de sítios com doença periodontal de pacientes com doença inflamatória intestinal e compará-los aos níveis encontrados em indivíduos sistemicamente saudáveis. Como objetivo secundário, avaliamos os níveis da IL-4 no soro desses pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:216-48.
2. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:112-43.
3. 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 Nov;10(5):243-55.
4. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.
5. Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF, Loos BG, van Steenberghe TJ, van der Velden U. Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1998 Aug;25(8):677-86.
6. Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43:278-93.
7. Baker PJ. Genetic control of the immune response in pathogenesis. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2042-6.
8. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol*. 2006 Apr;144(1):35-40.
9. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1569-76.
10. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol*. 2003 Feb;30(2):145-53.

11. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol* 2000. 2005;39:53-72.
12. Essner R, Rhoades K, McBride WH, Morton DL, Economou JS. IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol*. 1989 Jun 1;142(11):3857-61.
13. Donnelly RP, Fenton MJ, Finbloom DS, Gerrard TL. Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol*. 1990 Jul 15;145(2):569-75.
14. Pradeep AR, Yoopa Y, Swat PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodont Res*. 2008 Nov 43; 6: 712–716
15. Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis*. 2009 Jan;15(1):82-7.
16. Karttunen R, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Decreased mucosal interleukin-4 (IL-4) production in gut inflammation. *J Clin Pathol*. 1994 Nov;47(11):1015-8.
17. Yun J, Xu CT, Pan BR. Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World J Gastroenterol*. 2009 Feb 21;15(7):788-803.
18. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):2058-69.
19. Brito F, de Barros FC, Zaltman C, Carvalho AT, Carneiro AJ, Fischer RG, e colaboradores. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Jun;35(6):555-60.
20. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut*. 2000 Mar;46(3):336-43.
21. Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis*. 2009 Feb;10(1):1-6.

22. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009 Jan-Mar;46(1):20-5.
23. MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 2000 Jan;51(1):2-9.
24. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33.
25. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med*. 2002 Dec;252(6):475-96.
26. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2009 Feb;106(8):123-33.
27. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jan;15(1):79-94.
28. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):54-64.
29. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(3):517-32, v-vi.
30. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999 Jan;70(1):13-29.
31. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000*. 2002;29:31-69.
32. Morris AJ, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J*. 2001 Aug 25;191(4):186-92.
33. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):1-36.

34. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):1033-41.
35. Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK, Yamamoto M, DiFabio S, e colaboradores. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissues produce interleukin (IL)-5 and IL-6 but not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol*. 1993 Apr;142(4):1239-50.
36. Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol*. 1994:28-38.
37. Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol*. 1998 Oct;69(10):1098-104.
38. Reinhardt RA, McDonald TL, Bolton RW, DuBois LM, Kaldahl WB. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol*. 1989 Jan;60(1):44-50.
39. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med*. 1994 Sep;23(8):347-53.
40. Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, e colaboradores. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 1994 Sep;65(9):807-13.
41. Aoyagi T, Sugawara-Aoyagi M, Yamazaki K, Hara K. Interleukin 4 (IL-4) and IL-6-producing memory T-cells in peripheral blood and gingival tissue in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Oct;10(5):304-10.
42. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 1997 Jan;107(1):166-74.

43. Bartova J, Kratka-Opatrna Z, Prochazkova J, Krejsa O, Duskova J, Mrklas L, e colaboradores. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators Inflamm*. 2000;9(2):115-20.
44. Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol*. 2001 Feb;123(2):294-300.
45. Bonder CS, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12 production. Role of a functional interleukin-2 receptor gamma-chain. *Immunology*. 1999 Apr;96(4):529-36.
46. Teloni R, Giannoni F, Rossi P, Nisini R, Gagliardi MC. Interleukin-4 inhibits cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E production by human mature dendritic cells. *Immunology*. 2007 Jan;120(1):83-9.
47. Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, e colaboradores. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 1992 Jun;127:183-204.
48. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarstrom L, e colaboradores. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol*. 1989 Jul;19(7):1311-5.
49. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*. 1992 Jul 24;257(5069):548-51.
50. O'Garra A. Interleukins and the immune system 2. *Lancet*. 1989 May 6;1(8645):1003-5.
51. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3803-7.
52. Blau HM, Springer ML. Gene therapy--a novel form of drug delivery. *N Engl J Med*. 1995 Nov 2;333(18):1204-7.

53. Rocken M, Muller KM, Saurat JH, Muller I, Louis JA, Cerottini JC, e colaboradores. Central role for TCR/CD3 ligation in the differentiation of CD4+ T cells toward A Th1 or Th2 functional phenotype. *J Immunol.* 1992 Jan 1;148(1):47-54.
54. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol.* 1997;17(1):1-32.
55. Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw.* 1997 Dec;8(4):333-44.
56. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses.* 1992 Dec;39(4):319-22.
57. Yamamoto M, Kawabata K, Fujihashi K, McGhee JR, Van Dyke TE, Bamberg TV, e colaboradores. Absence of exogenous interleukin-4-induced apoptosis of gingival macrophages may contribute to chronic inflammation in periodontal diseases. *Am J Pathol.* 1996 Jan;148(1):331-9.
58. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.
59. Couturier C, Haeffner-Cavaillon N, Caroff M, Kazatchkine MD. Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes. *J Immunol.* 1991 Sep 15;147(6):1899-904.
60. Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol.* 1988;33(4):237-43.
61. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, Toriya Y, Iijima T, Maki K, e colaboradores. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med.* 1996 Sep;25(8):449-55.
62. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007 Jan;23(1):1-7.

63. Leon F, Smythies LE, Smith PD, Kelsall BL. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol.* 2006;579:117-32.
64. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol.* 1995 Sep;101(3):428-35.
65. Kucharzik T, Luger N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol.* 1996 Jun;104(3):483-90.
66. Kucharzik T, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jan;111(1):152-7.
67. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976 Mar;70(3):439-44.
68. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J.* 1955 Oct 29;2(4947):1041-8.
69. de Jager W, Rijkers GT. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison. *Methods.* 2006 Apr;38(4):294-303.
70. Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, e colaboradores. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Jan 4;36(5):1037-44.
71. Lash GE, Scaife PJ, Innes BA, Otun HA, Robson SC, Searle RF, e colaboradores. Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLight and FAST Quant. *J Immunol Methods.* 2006 Feb 20;309(1-2):205-8.
72. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, e colaboradores. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2003 Jul;30(7):616-23.

73. Ikezawa I, Tai H, Shimada Y, Komatsu Y, Galicia JC, Yoshie H. Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and 2 in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(10):1047-54.
74. Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Sep;28(9):840-7.
75. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003;32:50-8.
76. Ustun K, Alptekin NO. The effect of tobacco smoking on gingival crevicular fluid volume. *Eur J Dent*. 2007 Oct;1(4):236-9.
77. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol*. 2004 Oct;31(10):894-902.
78. Reddy RP, Tremaine WJ. Is there a threshold for the deleterious effect of smoking in Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S16-7.
79. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007 Dec 14;13(46):6134-9.
80. Burkett LW. *Oral Medicine Diagnosis and Treatment*, 6th edn. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott, 1972: 273–282.
81. Safkan B, Knuuttila M. Corticosteroid therapy and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984 Sep;11(8):515-22.