

CID FERRAZ, C. D.

**DINÂMICA DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NA CAVIDADE
BUCAL DE HUMANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Biologia e Patologia Buco Dental.

PIRACICABA - SP
- 1987 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM
AUXÍLIO DA FAPESP - Biomedicina
82/1757-8.

A G R A D E C I M E N T O S

Além de agradecer a todos que tomaram parte direta ou não no presente estudo, aos colegas, pais e esposa, gostaria de um agradecimento especial a três pessoas que sempre me auxiliaram, principalmente na vida profissional e acadêmica. O **Prof. Dr. Antonio Césio de Pádua Lima**, exemplo de amigo, homem e professor, que por primeiro me acolheu e conferiu uma atenção toda especial, e que tenho o prazer de estar até hoje ao seu lado, recebendo seus valiosos ensinamentos. O **Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann**, pesquisador emérito e meu grande orientador na Noruega, aonde além de toda instrução científica, sempre me amparou juntamente com a Marily, em todos os momentos quando por lá estive. E finalmente, o **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, amigo orientador e destacado cientista, com o qual tive o enorme prazer de conviver durante toda a duração do presente estudo, recebendo ainda, sua total e dedicada orientação. Portanto, a vocês:

PROF. DR. ANTONIO CESIO DE PADUA LIMA

PROF. DR. RUI VICENTE OPPERMANN

PROF. DR. OSLEI PAES DE ALMEIDA

M U I T O O B R I G A D O

INDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. Neutrófilo	03
2.2. Epitélio juncional	05
2.3. Epitélio sulcular	08
2.4. Sulco clínico e sulco histológico	09
2.5. Presença de neutrófilos na cavidade bucal .	10
2.6. Migração dos PMN para a cavidade bucal	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	32
6. RESUMO	38
7. ABSTRACT	39
8. BIBLIOGRAFIA	40
APÊNDICE	49

1. INTRODUÇÃO

Está bem estabelecido que os leucócitos presentes na saliva são oriundos do tecido gengival e que migram constantemente através do epitélio juncional para a cavidade bucal (MILLER et alii, 1984; SHARRY & KRASSE, 1960). A migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) para a cavidade bucal é contínua, apresentando variações quantitativas nos diferentes períodos do dia (SCHIÖTT & LÖE, 1970). 95% destes leucócitos são polimorfonucleares e existem evidências de que participam na manutenção e destruição das doenças periodontais (MUHLEMANN et alii, 1954; TAICHMAN et alii, 1966, 1976, 1977). Assim sendo, a diminuição ou aumento da migração celular através do sulco gengival, pode ser importante no desenvolvimento da doença periodontal. Os fatores que controlam a migração de leucócitos para o sulco gengival ainda não são conhecidos. Embora substâncias quimiotáticas estejam presentes na placa bacteriana (GOLUB et alii, 1981; LAREAU et alii, 1984; WILTON & ALMEIDA, 1980), outros fatores têm sido relatados como atuantes na migração leucocitária. YAMASAKI et alii (1979) demonstraram a presença de PMN no epitélio juncional de ratos convencionais e "germ free" e GARANT (1976) re-

velou a presença de neutrófilos em ratos gnotobióticos. Além disso, o melhor conhecimento da dinâmica da migração de leucócitos para a cavidade bucal, pode colaborar para o melhor entendimento da participação destas células na manutenção da saúde bucal e dos fatores que controlam esta migração. Neste trabalho, foi estudado, em seres humanos, a dinâmica da migração leucocitária para a cavidade bucal durante as 24 horas do dia e discutida a influência do sono, neste processo de migração celular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEUTRÓFILO

A importância dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) como elementos de defesa está bem estabelecida e, alterações destas células podem levar a infecções graves, que muitas vezes causam a morte do indivíduo, como ocorre nos casos de agranulocitose, neutropenia, síndrome de Chediak - Higashi e doença granulomatosa (MURPHY, 1976). Essas alterações podem ocorrer nas várias etapas de formação ou função dos PMN, como: maturação na medula óssea; liberação para circulação; aderência à parede vascular; migração; fagocitose; desgranulação e digestão.

No indivíduo adulto existem cerca de 20 a 30 bilhões de PMN na circulação sanguínea, correspondendo a 60% dos leucócitos circulantes. Para cada PMN circulante, existem 50-100 células maduras na medula óssea. O neutrófilo permanece na circulação por tempo relativamente curto (6 a 12 horas); calculando-se que no homem 50-100 ml de neutrófilos são eliminados diariamente, provavelmente através da pele, pulmões e mucosas (HIRSH, 1965).

A principal função dos neutrófilos é a fagocitose, cuja importância foi ressaltada por METCHNIKOFF (1893) em seus trabalhos clássicos sobre inflamação. O mecanismo é análogo ao da pinocitose, e consiste na invaginação da membrana celular formando um fagossomo ou pinossomo (BESTERMAN & LOW, 1983). A fagocitose envolve basicamente duas fases: aderência da partícula à superfície da célula e internalização da partícula. Na aderência há participação de receptores para a região Fc da molécula IgG e C3b do complemento (SCRIBNER & FAHNEY, 1976).

O citoplasma dos PMN contém grande quantidade de glicogênio, que serve como fonte de energia através da via glicolítica, independente do oxigênio. Isto é importante por que os PMN frequentemente atuam em áreas de inflamação aguda e necrose.

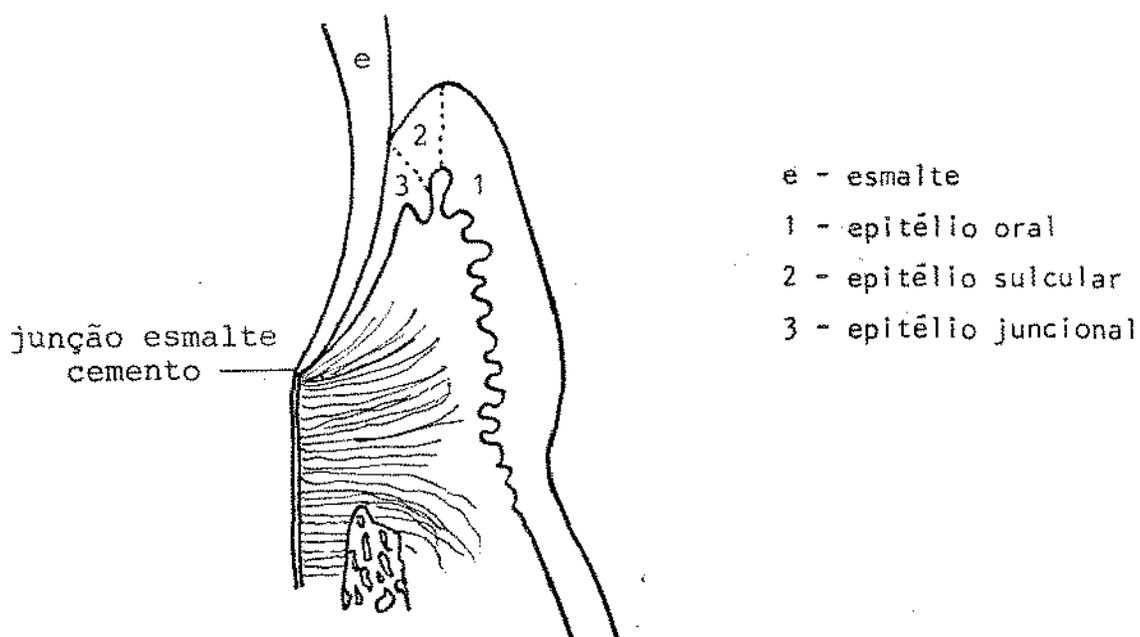
Os PMN realizam a fagocitose principalmente no território extravascular, e há portanto necessidade da migração para os tecidos. Inicialmente há marginação junto ao endotélio vascular por mecanismos ainda não bem conhecidos (CLIFF, 1966; HERSH & BODEY, 1970), e posteriormente os neutrófilos emitem pseudópodos por entre as células endoteliais, ultrapassando a membrana basal e alcançando o território extravascular (MARCHESI & FLOREY, 1960). É muito discutido os mecanismos que mediam a quimiotaxia "in vivo", e estudos "in vitro", mostram que diversas substâncias são quimiotéticas para os PMN, desde que haja um gradiente de concentração (McCUTCHEON, 1946; KELLER & JORKIN, 1968; BOYDEN, 1962; KELLER et

alii, 1974; YAMASAKI et alii, 1979). As proteases existentes nos glânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, são liberados não apenas durante a fagocitose, mas também na migração celular (TAICHMAN et alii, 1976). Estas enzimas tem inúmeras atividades no território inflamado, e WEDMORE & WILLIAMS (1981) descreveram a possível participação dos neutrófilos no controle da permeabilidade vascular.

2.2. EPITÉLIO JUNCIONAL

O epitélio juncional é a porção gengival que estabelece a união entre a gengiva e o dente (Esq. 1). Em dentes saudáveis, nunca acometidos de doenças periodontais, o epitélio juncional estende-se da união esmalte-cimento até 2 a 3 mm em direção oclusal ou incisal. Em dentes portadores de doenças periodontais, onde ocorreu recessão gengival, o epitélio juncional está localizado sobre a superfície radicular. Histologicamente, o epitélio juncional é formado por epitélio escamoso estratificado não queratinizado, apresentando 15 a 30 camadas de células na porção coronária e apenas uma camada de células na porção apical. As células são geralmente cuboidais, tornando-se achatadas, com núcleo e citoplasma alongados, nas proximidades das superfícies dos dentes. A interface tecido conjuntivo/epitélio juncional, apresenta-se sem interdigitações, exceto na porção mais coronária do epitélio juncional (LISTGARTEN, 1972). Os espaços intercelula-

res no epitélio juncional são maiores que no epitélio oral e representam 1/5 do volume tecidual (SCHRÖEDER & MUNZEL - PEDRAZOLLI, 1970). Nos espaços intercelulares são encontrados vários tipos celulares, como os PMN, macrófagos, linfócitos B e T e mastócitos (SCHLUGER *et alii*, 1981).



Esquema 1. Diagrama gengival no sentido longitudinal. O epitélio gengival é formado pelo epitélio oral, sulcular e juncional.

Pode-se considerar o epitélio juncional como tendo três superfícies: uma superfície interna, em contato com o dente; uma externa, que estabelece contato com o tecido conjuntivo e uma coronária correspondente a porção apical do sulco gengival (Esq. 1). O epitélio juncional em condições normais não sofre queratinização e apresenta camada basal com cê

lulas cuboidais e uma camada similar a espinhosa.

As células basais estabelecem união com o tecido conjuntivo através de hemidesmosomas, podendo ser observadas a nível de microscopia eletrônica as lâminas lúcida e densa, além de tonofilamentos (SCHRÖEDER, 1969; FRANK & CIMA-SONI, 1970). Na região próxima ao dente, também existem hemidesmosomas e lâmina basal que unem o epitélio à superfície dental (LISTGARTEN, 1966; ITO *et alii*, 1967; SCHRÖEDER & LISTGARTEN, 1971). A lâmina basal voltada para o dente tem sido denominada lâmina basal interna, para ser distinguida da lâmina basal externa que une o epitélio juncional ao tecido conjuntivo (SCHRÖEDER & LISTGARTEN, 1971). A lâmina basal interna, ao contrário da lâmina basal externa, não apresenta as camadas lúcida e densa evidentes a nível de microscopia eletrônica.

MESSIER & LEBLOND (1960) relataram que sob condições normais a proporção das células que deixam a camada germinativa igualam-se a descamação celular que ocorre na superfície do tecido. Se esta proporção for mantida constante, um epitélio mais espesso necessitará de número maior de divisões mitóticas na camada basal que um epitélio delgado. Já no epitélio gengival humano existem grandes variações dimensionais entre a camada basal de determinada área do epitélio oral e do epitélio juncional. Em decorrência de tal fenômeno, LÖE & KARRING (1966) sugeriram que, para se obter uma detalhada descrição da atividade mitótica deveria ser deter-

minado um índice expresso pelo número de células que estão em processo de mitose por milímetro quadrado da superfície epitelial. Uma das principais vantagens desse índice mitótico seria a capacidade de descrever a proporção de descamação baseado na atividade mitótica da camada germinativa (SKOUGAARD, 1970). Com essas explicações sobre renovação celular, pode-se dizer que o grau de descamação na superfície do epitélio juncional é muito mais intensa quando comparada com a superfície do epitélio oral. SKOUGAARD em 1965, descreveu que a proporção de descamação celular, expressa como o número de células esfoliadas por unidade de área de determinada superfície, é muito maior (6 a 25 vezes) na superfície coronária do epitélio juncional.

A descamação celular do epitélio juncional deve ser relevante, se não for um dos principais fatores que controlam a passagem dos PMN para o sulco gengival. Deve ser ainda salientado que de 2% a 64% do volume da porção coronária do epitélio juncional é ocupado por PMN, os quais seriam os primeiros a atingir o sulco gengival (LISTGARTEN, 1972).

2.3. EPITÉLIO SULCULAR

O epitélio sulcular estende-se da porção coronária do epitélio juncional até a margem gengival. Histologicamente, a porção apical do epitélio sulcular é similar ao epitélio juncional, e é caracterizado pela presença de leucócitos.

citos nos amplos espaços intercelulares, não apresentando tendência a queratinização. As células superficiais do epitélio sulcular se descamam para o interior do sulco gengival. Nesta área, como os espaços intercelulares não são tão amplos, há baixo número de polimorfonucleares quando comparados ao epitélio juncional. É devido a esse aspecto morfológico que o epitélio sulcular é menos permeável que o juncional (TOLLO, 1975). Conseqüentemente, a porção apical do sulco gengival, formada pela porção coronária do epitélio juncional, é a região mais permeável do sulco e a principal porta de entrada dos leucócitos para a cavidade bucal (SHARRY & KRASSE, 1960; LÖE, 1961; EGELBERG, 1963; WHIRIGHT, 1964; ATTSTRÖM, 1970; ATTSTRÖM & EGELBERG, 1970).

O epitélio oral é formado de epitélio escamoso estratificado queratinizado ou paraqueratinizado, estendendo-se da junção muco-gengival à margem gengival. A parte do epitélio voltada para o tecido conjuntivo é caracterizada por projeções de várias extensões e espessuras, que se interseccionam de várias formas e que em alguns casos ficam mais ou menos paralelas uma as outras até a margem gengival (KARRING & LÖE, 1970). O epitélio oral da gengiva marginal e inserida é constituído por quatro camadas; basal, espinhosa, granulosa e córnea.

2.4. SULCO CLÍNICO E SULCO HISTOLÓGICO

Histologicamente, o sulco gengival é um espaço

real e sêptico, com 0,5 mm ou menos de profundidade. Limita-se internamente com o dente, apicalmente com a porção coronária do epitélio juncional, externamente com o epitélio sulcular e coronariamente com o meio bucal. As características estruturais desta região sugerem que o epitélio juncional é a porção mais permeável do epitélio do sulco. Devido a esta característica, o epitélio juncional é facilmente penetrável através de sondas ou mesmo fitas de acetato de celulose. Esta penetração ocorre geralmente no epitélio juncional e é facilitada pela menor aderência entre as células epiteliais (SCHROEDER & LISTGARTEN, 1971). A profundidade do sulco gengival clínico, pode ser definida como o espaço compreendido entre a margem gengival e a extremidade final da sonda periodontal, quando esta é posicionada com leve pressão. Existem várias influências que determinam a penetração da sonda periodontal, por exemplo: espessura da sonda, pressão, grau inflamatório do tecido conjuntivo, grau de degradação das fibras colágenas, espessura do epitélio juncional e curvatura do dente (van der VELDEN, 1979, 1980, 1982; van der VELDEN & JENSEN, 1981; van der VELDEN & VRIES, 1978, 1980).

2.5. PRESENÇA DE NEUTRÓFILOS NA CAVIDADE BUCAL

A presença e função dos neutrófilos na cavidade bucal têm sido extensivamente estudadas, e o assunto foi

revisado por MILLER em 1984. Em 1937, ALLEN & DICKEY estudaram a presença de leucócitos na cavidade bucal em indivíduos portadores de leucemia, e CALONNIUS em 1958, determinou o número de leucócitos polimorfonucleares na saliva de seres humanos.

KLINKHAMER (1963) também descreveu leucócitos na cavidade bucal de pacientes com idades entre 25 e 45 anos, apresentando boa saúde periodontal. Os leucócitos foram coletados através de uma sequência de 10 bochechos de curta duração (27 segundos) em diferentes tubos, centrifugados e processados para contagem em câmara de Neubauer. 90% dos leucócitos eram polimorfonucleares e o número total de leucócitos apresentou uma curva descendente até o quinto tubo, mantendo-se razoavelmente constante até o décimo tubo. Outro dado relevante do referido trabalho foi a variação das contagens nos diferentes dias. O mesmo autor em 1968 e 1969 com colaborador, empregou uma solução hipertônica para bochechos e denominou os PMN coletados como "orogranulócitos". Após o 5º bochecho, foi determinado que o número de células era diretamente proporcional ao número de dentes da boca dos participantes.

ATTSTRÖM (1970) estudou a presença de leucócitos no sulco gengival saudável de estudantes de Odontologia. As células foram coletadas através da técnica denominada "Sti reflex", colocando-se uma fita de acetato de celulose, 3 mm de largura e 25 mm de comprimento, sobre a gengiva e o dente, no sentido do longo eixo do mesmo. Um estimulador gengival

de borracha, foi movimentado firmemente sobre a fita no sentido ocluso-apical durante 5 vezes, com o objetivo de pressionar o material do sulco gengival sobre a fita de acetato de celulose. 95% a 97% das células foram neutrófilos polimorfonuclares, 1% a 2% linfócitos e 2% a 3% macrófagos. Desta forma, demonstrou-se que mesmo um periodonto saudável, mantido sobre rigoroso controle de placa bacteriana, apresenta leucócitos no sulco gengival.

Em 1970, LANTZMAN & MICHMAN, determinaram o número de leucócitos da cavidade oral de 30 indivíduos de ambos os sexos, antes e após a extração de todos os dentes. Três meses após a extração, o número de leucócitos na cavidade oral diminuiu acentuadamente. Estes resultados mostraram que o sulco gengival é a porção principal de entrada dos PMN para a boca (WHRIGHT, 1962). Por outro lado, a saliva coletada diretamente dos ductos salivares praticamente não contém leucócitos (RAUCH, 1959).

A migração de PMN para a cavidade bucal através do sulco gengival foi também demonstrada por SCHIOTT & LOE (1970). Sete estudantes de Odontologia, de ambos os sexos, tomaram parte no estudo. Foram confeccionadas moldeiras de acrílico, para as arcadas superior e inferior de cada participante. Estas moldeiras estendiam-se 5 mm da margem gengival em direção apical, o que evitou a saída dos PNM para o meio bucal. Cada participante bochechou 10 vezes durante 30 segundos com 5 ml de solução de HANK. As amostras foram coletadas separadamente em tubos de ensaio graduados. As conta-

gens foram feitas na câmara de Burker-Turk. O número de leucócitos por mililitro, multiplicado pelo volume total da amostra forneceu o número de leucócitos por amostra. A média do número de leucócitos das amostras 6 a 10, foi considerada como o número de células que atingiam a cavidade bucal durante 30 segundos. O experimento foi desenvolvido da seguinte maneira: Foram realizados 10 bochechos para contagem; as moldeiras foram posicionadas e mantidas nas arcadas durante 5 minutos. Após as remoções destas, 10 bochechos foram realizados e coletados para posterior contagem. O número de leucócitos acumulados nas moldeiras foram calculados e os resultados comparados com o número total de leucócitos obtidos nas primeiras 5 amostras da última série de bochechos. Os resultados mostraram que o número de leucócitos acumulados nas moldeiras durante determinado tempo aproximou-se do número de leucócitos coletados durante o mesmo período sem as moldeiras, indicando que a principal via de acesso dos PMN, é o sulco gengival.

Os dados da literatura mostram que o número de leucócitos varia de indivíduo para indivíduo, de dia para dia, e nos diferentes períodos deste, segundo SCHIÖTT & LÖE (1970) e KLINKHAMER (1963), e ainda varia de acordo com a saúde gengival segundo RAESTE (1978) e SKOUGAARD et alii (1969). Além dessas variáveis existem acentuadas modificações no número de leucócitos de acordo com vários estudos, por exemplo: a porcentagem dos PMN no experimento de KENNEY et alii (1979)

foi inferior ao demonstrado por ATTSTRÖM (1970), o qual foi similar ao estudo de SKAPSKI & LEHNER (1976).

Outras variações ocorreram diante de diferentes quadros inflamatórios gengivais, ou seja: de $0,03 \times 10^6$ PMN coletados por minuto em estudantes de Odontologia com excelente higiene oral (SCHIÖTT & LÖE, 1970), para $0,06 \times 10^6$ PMN coletados por minuto em crianças com dentição primária e pouca gengivite (COX et alii, 1974), e $5,0 \times 10^6$ PMN coletados por minuto em pacientes portadores de periodontite e severa inflamação (RAESTE et alii, 1978).

2.6. MIGRAÇÃO DOS PMN PARA A CAVIDADE BUCAL

ATTSTRÖM & EGELBERG (1970) marcaram os PMN circulantes de cães através de injeção endovenosa de carvão coloidal e observaram que as células poderiam ser coletadas no sulco gengival após 30 minutos, indicando que a principal via de acesso dos PMN para a boca é o sulco gengival.

SCULLY (1980) administrou endovenosamente em macacos leucócitos marcados com In^{111} . Após 20 minutos um número significativo de PMN marcados foram detectados no fluido crevicular, demonstrando que a maioria dos leucócitos atingiram a cavidade bucal através do sulco gengival e somente pequenas porções ultrapassaram a mucosa oral.

Várias substâncias quimiotáticas para os PMN estão presentes na placa bacteriana e saliva (TEMPEL et alii,

1970; LINDHE & HELLDEN, 1972; HELLDEN & KAHNBERG, 1973; MILLER et alii, 1975). KRAAL & LOESCHE (1974) estudando o potencial quimiotático da placa bacteriana e saliva, verificaram que a placa apresentou atividade quimiotática superior em relação a saliva. Provavelmente devido a atividade da placa bacteriana, SCHRÖEDER (1970), encontrou uma alta concentração de PMN na porção coronária do epitélio juncional. Estas células além de migrarem ativamente do epitélio juncional para o sulco gengival (SCHIÖTT & LÖE, 1970), poderiam ser conduzidas para a cavidade oral através da descamação das células do epitélio juncional.

Estudos desenvolvidos em animais experimentais tem conferido evidencia à função dos PMNs nas doenças periodontais. Em ratos monoinfectados, a resposta dos PMNs à placa bacteriana resultou na formação de uma barreira de neutrófilos entre a placa e o tecido do hospedeiro (GARANT, 1976). Em cães, ATTSTRÖM & SCHRÖEDER (1979), sugeriram um possível papel dos PMNs na prevenção da formação da placa bacteriana subgengival.

OS PMNs encontrados no sulco gengival são células que apresentam viabilidade (SKAPSKI & LEHNER, 1976), com forte reação a desidrogenase succinica, sugerindo alta atividade metabólica (LANGE & SCHRÖEDER, 1971). Os PMNs do sulco podem apresentar microorganismos no citoplasma (ATTSTRÖM, 1970), mas a extensão da atividade celular com relação a bactéria, não está bem esclarecida. A viabilidade e função dos PMNs encontrados na saliva não estão bem definidas, entretanto estas células

lulas podem apresentar atividade fagocitária "in vivo" (ROVELSTAD, 1964) e "in vitro" (KENNEY et alii, 1977).

SCULLY (1980) estudou em animais experimentais a função dos PMNs no sulco gengival e saliva. Cerca de 80% dos PMNs encontrados no sulco gengival e pouco menos de 50% na saliva, apresentaram viabilidade. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a saliva apresentou toxicidade aos PMNs coletados do sangue ao redor de 60 minutos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Participaram deste trabalho quatro indivíduos, dois do sexo masculino e dois do feminino, com idade de 24 a 32 anos. Os participantes tinham índices de placa e gengival próximos a zero, e os únicos dentes ausentes eram os terceiros molares.

A coleta dos leucócitos presentes na cavidade bucal foi feita através de bochechos com solução fisiológica de NaCl a 0,9% da seguinte maneira: os participantes tinham à frente um relógio marcador de segundos, um funil e oito tubos de ensaio, cada um contendo 15 ml de solução fisiológica. Os participantes foram orientados para realizar os bochechos, movimentando o conteúdo do primeiro tubo compassadamente da região lingual para vestibular e vice-versa, durante 20 segundos e a solução era então transferida para o primeiro tubo com auxílio do funil. Imediatamente a solução do segundo tubo de ensaio era conduzida a cavidade bucal e o mesmo procedimento repetido até o oitavo tubo.

O material de cada tubo de ensaio foi centrifugado a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado resuspenso em 0,5 ml de solução fisio-

lógica, acrescentando-se o mesmo volume do líquido de Turk. A contagem geral dos leucócitos de cada tubo foi feita com auxílio da câmara de Neubauer e objetiva de 40 X. A soma do número de leucócitos presentes nos oito tubos, indicava o total presente na boca.

No primeiro experimento piloto foi determinada a quantificação das células de um participante (C.M.S.F.) no período 13:30-18:00 horas, com intervalos de 30 minutos, entre uma e outra sequência de 8 bochechos, totalizando portanto 10 amostras de cada um dos oito tubos.

No segundo experimento piloto foi feita a contagem dos leucócitos da boca nos tempos de 5, 10, 20, 25, 30, 60 e 90 minutos, após a redução do número de leucócitos da boca a praticamente zero, através de oito bochechos consecutivos com solução fisiológica de NaCl a 0,9% da seguinte maneira: transcorridos 5 minutos após reduzir o número de células próximo a zero, uma sequência de 8 bochechos era feita para quantificar as células migradas nesse período. Após 10 minutos nova sequência era realizada até atingir 30 minutos. Também foram coletadas as células migradas após 60 e 90 minutos como acima descrito.

Posteriormente foi realizada a quantificação das células durante as 24 horas do dia, as quais foram divididas em 4 períodos: 06:00-12:00; 12:00-18:00; 18:00 - 24:00; 24:00-06:00 horas. Em todos quatro períodos a sequência de 8 bochechos era feita de 30 em 30 minutos e somente um período por dia era concluído. Para a quantificação das células no

período 06:00-12:00 horas, todos os participantes ficaram acordados durante a noite.

No experimento seguinte os participantes dormiam das 21:00 as 05:30 horas, acordavam, realizavam 8 bochechos consecutivos, os quais foram descartados, para a eliminação das células na boca. As 06:00 horas foi realizada a primeira sequência de 8 bochechos para quantificação das células, a qual prosseguiu até as 18:00 horas, sempre de 30 em 30 minutos.

Para estudar a influência do sono sobre a migração leucocitária foram realizados 2 experimentos. No primeiro os participantes realizavam a sequência de 8 bochechos antes de dormir, que correspondia ao tempo zero. Após duas horas de sono, os participantes acordavam com auxílio de um despertador e realizavam a sequência de bochechos para quantificação. Em outro dia, os participantes dormiam 3 horas e a sequência descrita anteriormente era novamente repetida, até atingir 8 horas de sono. Foi realizado somente um período por noite. No segundo experimento, os participantes também realizavam a sequência de 8 bochechos, imediatamente antes de dormir, determinando desta forma o tempo denominado zero. Após duas horas de sono, os participantes acordavam com o auxílio de um despertador e realizavam a sequência de 8 bochechos, os quais foram descartados. Em seguida, o despertador era regulado para funcionar após 30 minutos, e o participante voltava a dormir durante este período. Quando o alarme era acionado, a sequência de 8 bochechos era realizada para quantificar as

células que migraram durante 30 minutos após duas horas de sono. Esses passos foram repetidos com 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas de sono, e num mesmo dia realizou-se apenas uma quantificação de células. Todas as coletas feitas durante a noite foram guardadas em geladeira e processadas as 08:00 horas.

4. RESULTADOS

Fazendo-se oito bochechos consecutivos com 15 ml de solução fisiológica foi possível coletar praticamente todos os leucócitos presentes na cavidade bucal (Fig. 1). No primeiro bochecho coletou-se cerca de 40% das células, as quais foram diminuindo gradativamente, chegando a ser praticamente desprezível a partir do oitavo tubo.

A quantificação de leucócitos na boca, entre 5 a 90 minutos, após a redução de seu número próximo a zero, mostrou que há um aumento progressivo atingindo um máximo após 20-30 minutos, não apresentando variações consideráveis posteriormente (Fig. 2). Para um mesmo participante, os resultados apresentaram pequena variação quando os experimentos foram realizados em dias diferentes, mantendo-se mesmo horário (Tab. 1). O gráfico da migração leucocitária durante as 24 horas do dia, com os participantes acordados apresentaram padrão semelhante, embora houvesse variações quantitativas evidentes (Fig. 3). O participante número 4, por exemplo, apresentou praticamente a metade do número de células em relação ao participante número 1.

A quantidade de células sofreu pequenas oscilações durante as 24 horas do dia, entretanto, quando os participantes dormiam durante a noite, o ritmo de migração diminuiu consideravelmente nas primeiras horas da manhã, aumentando gradativamente e atingindo o máximo em torno das 10:00 horas, permanecendo constante nos demais períodos (Fig. 4). Embora persistissem as variações entre os participantes, pode-se claramente observar que nas primeiras horas da manhã a migração foi menos intensa em todos eles.

O número de leucócitos na cavidade bucal aumentou consideravelmente após duas a oito horas de sono. Praticamente duplicou após duas horas de sono, e permaneceu sem maiores variações até oito horas, indicando que atingiu rapidamente o valor máximo, que foi mantido nos demais períodos (Fig.5). O participante número 2, por exemplo, que apresentou 624×10^4 leucócitos na boca as 13:00 horas, teve este número aumentado para 1.240×10^4 após duas horas de sono.

Quando os participantes dormiam de 2 a 8 horas, eram acordados, e realizavam a sequência de 8 bochechos, os quais eram descartados, e voltavam a dormir durante apenas 30 minutos, o número de células apresentou curvas descendentes (Fig. 6), isto sugeriu que a migração de leucócitos para a boca é menor durante o sono do que durante o dia, e que diminuiu a medida que o período de sono foi aumentado. Com os dados obtidos nas Figuras 3, 4 e 6, construiu-se a Figura 7, que mostra o número de células durante as 24 horas do dia, com interferência do sono, e em intervalos de 30 em 30 minutos. Como

descrito anteriormente, o número de células diminui com as horas de sono; e após acordar aumenta gradativamente até atingir o máximo após 3-4 horas, mantendo-se o mesmo nível posteriormente.

No apêndice poderão ser encontrados os valores originais usados neste trabalho para confecção da tabela e figuras.

Tabela 1 - Número de leucócitos ($\times 10^4$) coletados do paciente número 2 às 14:00 horas em 3 dias diferentes.

Tubos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	\bar{X}	\pm d.p.
10	324	296	285	301,6	\pm 20,1
20	129	134	190	151,0	\pm 33,8
30	93	84	90	89,0	\pm 4,5
40	64	43	53	53,3	\pm 10,5
50	28	38	44	36,6	\pm 8,0
60	45	19	29	31,0	\pm 2,5
70	31	23	22	25,3	\pm 4,9
80	19	17	11	15,6	\pm 4,1
TOTAL	733	654	724	703,6	\pm 43,2

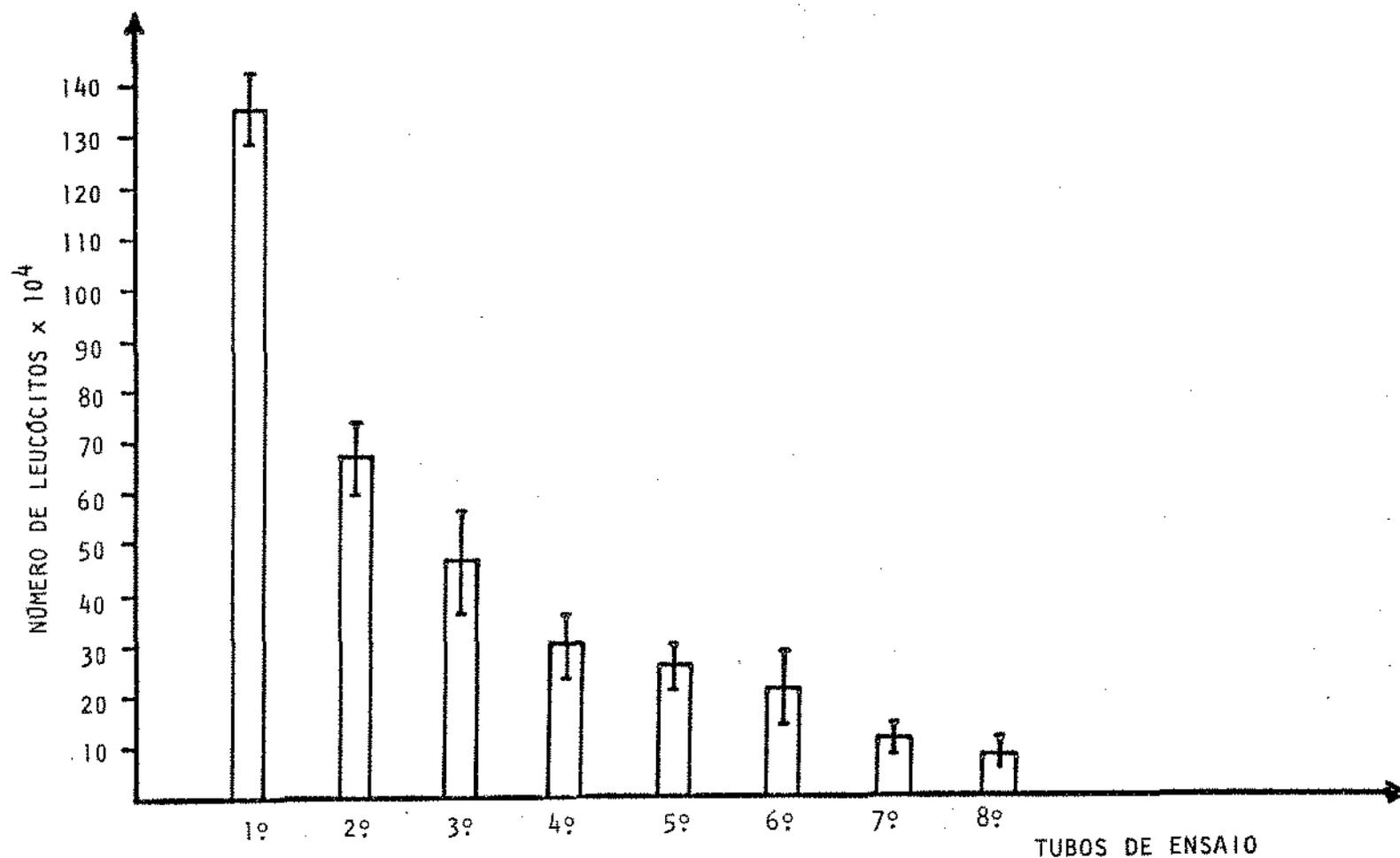


Figura 1. Média e desvio padrão de leucócitos coletados da cavidade oral do participante número 4. Cada média corresponde a um total de 10 coletas, feitas de 30 em 30 minutos, no período da tarde. As células foram coletadas através do bochecho de 15 ml de solução fisiológica, durante 20 segundos, por oito vezes consecutivas.

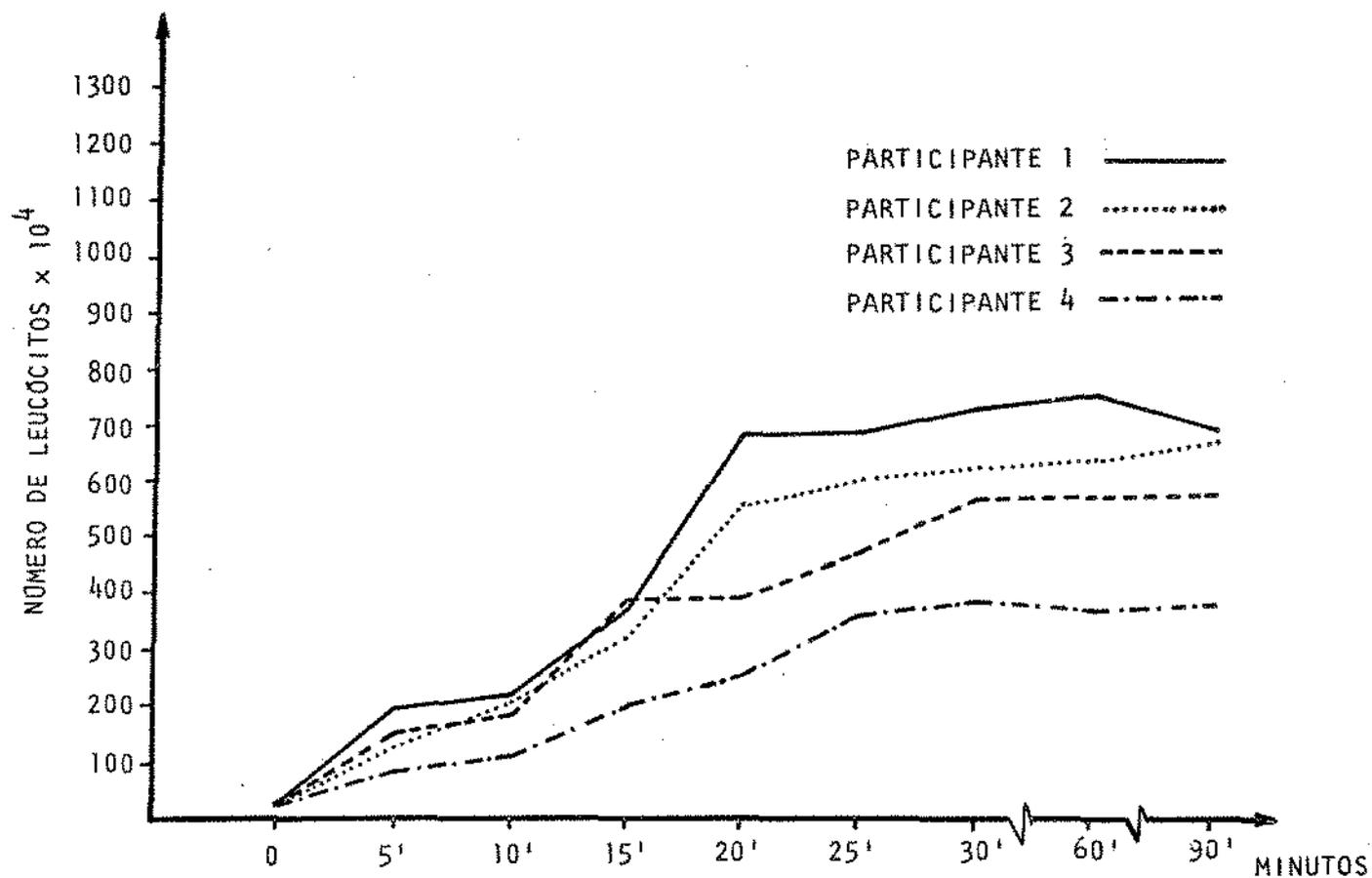


Figura 2. Total de leucócitos ($\times 10^4$) dos quatro participantes em diferentes intervalos de tempo. O valor do tempo zero corresponde ao número de células presentes no oitavo tubo, quando da lavagem da boca para a retirada dos leucócitos presentes, imediatamente antes do início do experimento. O valor para cada tempo corresponde ao total de leucócitos coletados após 8 bochechos consecutivos, com duração de 20 segundos cada um, com 15 ml de solução fisiológica.

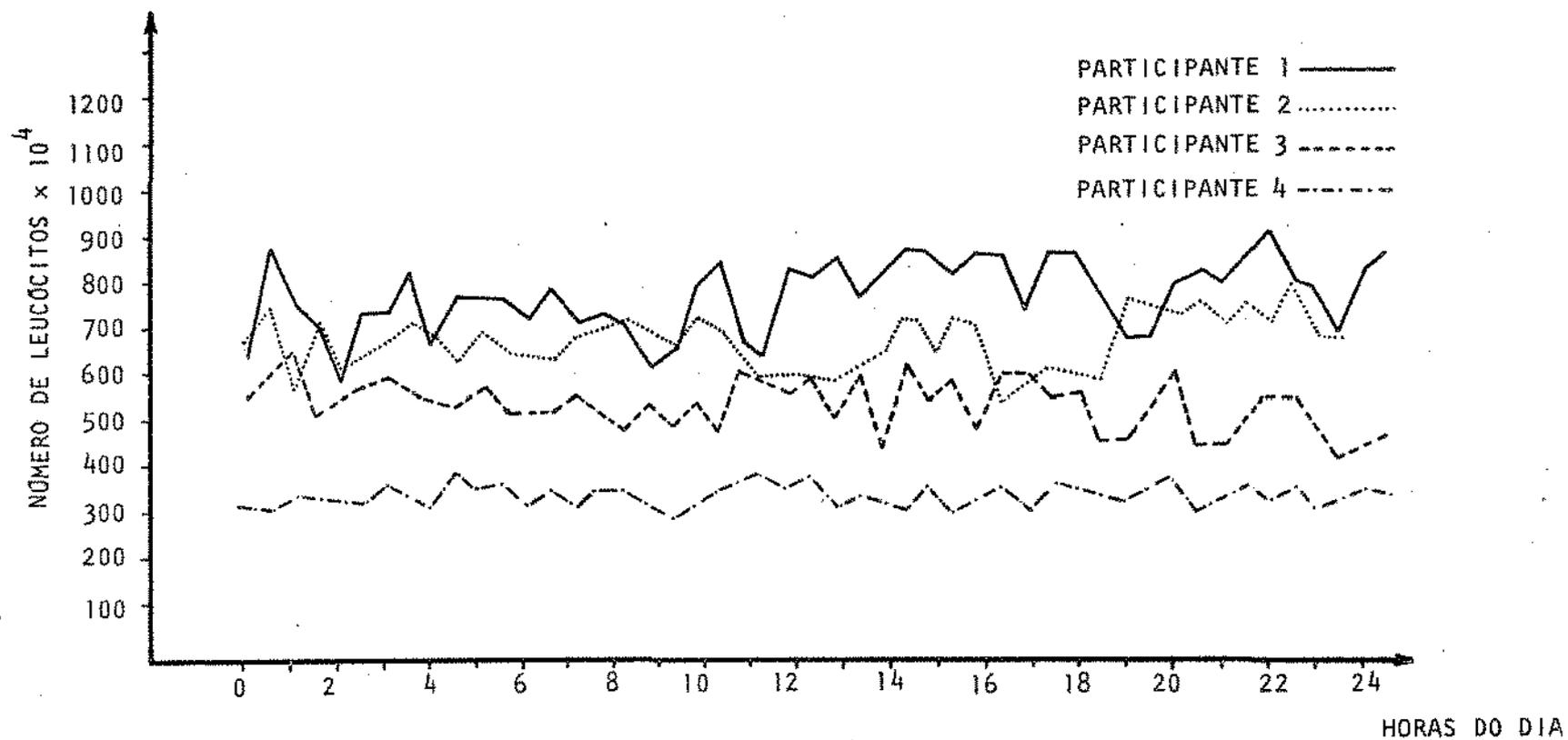


Figura 3. Total de leucócitos ($\times 10^4$) na cavidade oral dos quatro participantes durante as 24 horas do dia, sem influência do sono. A coleta e contagem das células foram feitas de 30 em 30 minutos. Para o período das 06:00-12:00 horas os participantes ficaram acordados durante a noite.

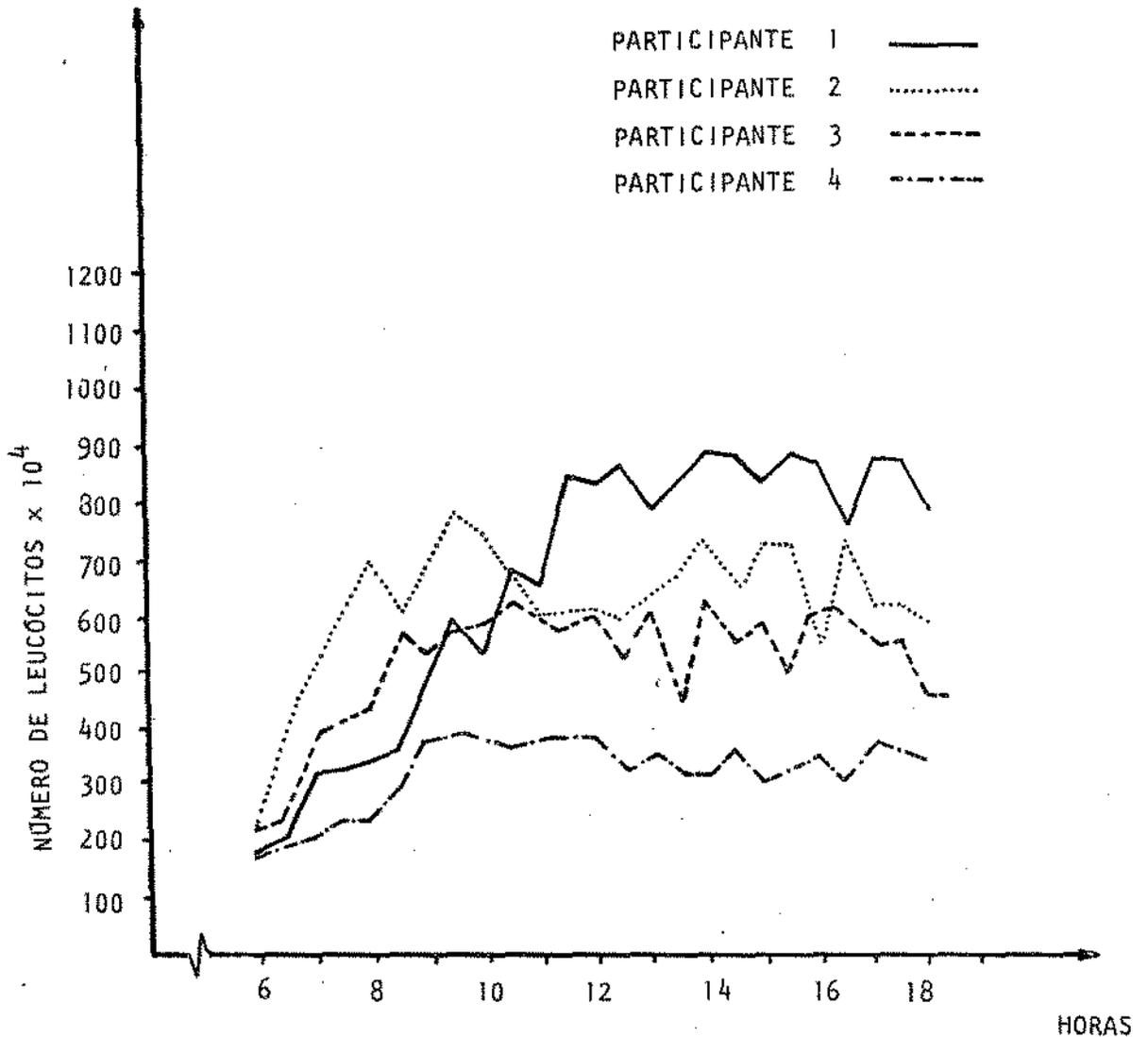


Figura 4. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) dos quatro participantes no período das 06:00-18:00 horas. Os participantes dormiram das 21:00-05:30 horas. Assim que os participantes acordavam, realizavam 8 bochechos consecutivos para eliminação das células presentes na boca, posteriormente, a coleta era feita de 30 em 30 minutos e os leucócitos quantificados.

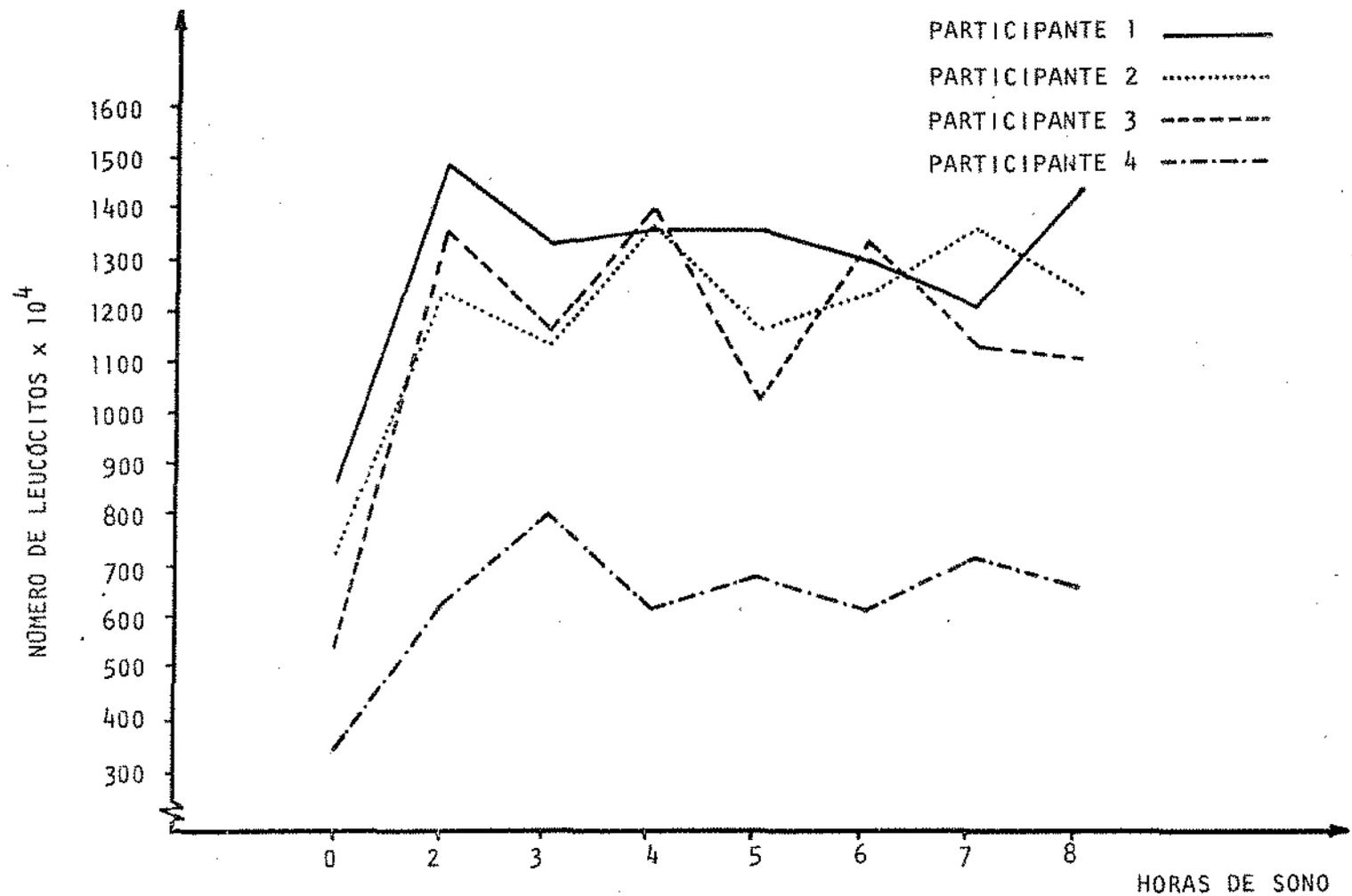


Figura 5. Número total de leucócitos na cavidade oral dos 4 participantes, após 2 a 8 horas de sono. 0 tempo zero corresponde ao número de células imediatamente antes de dormir.

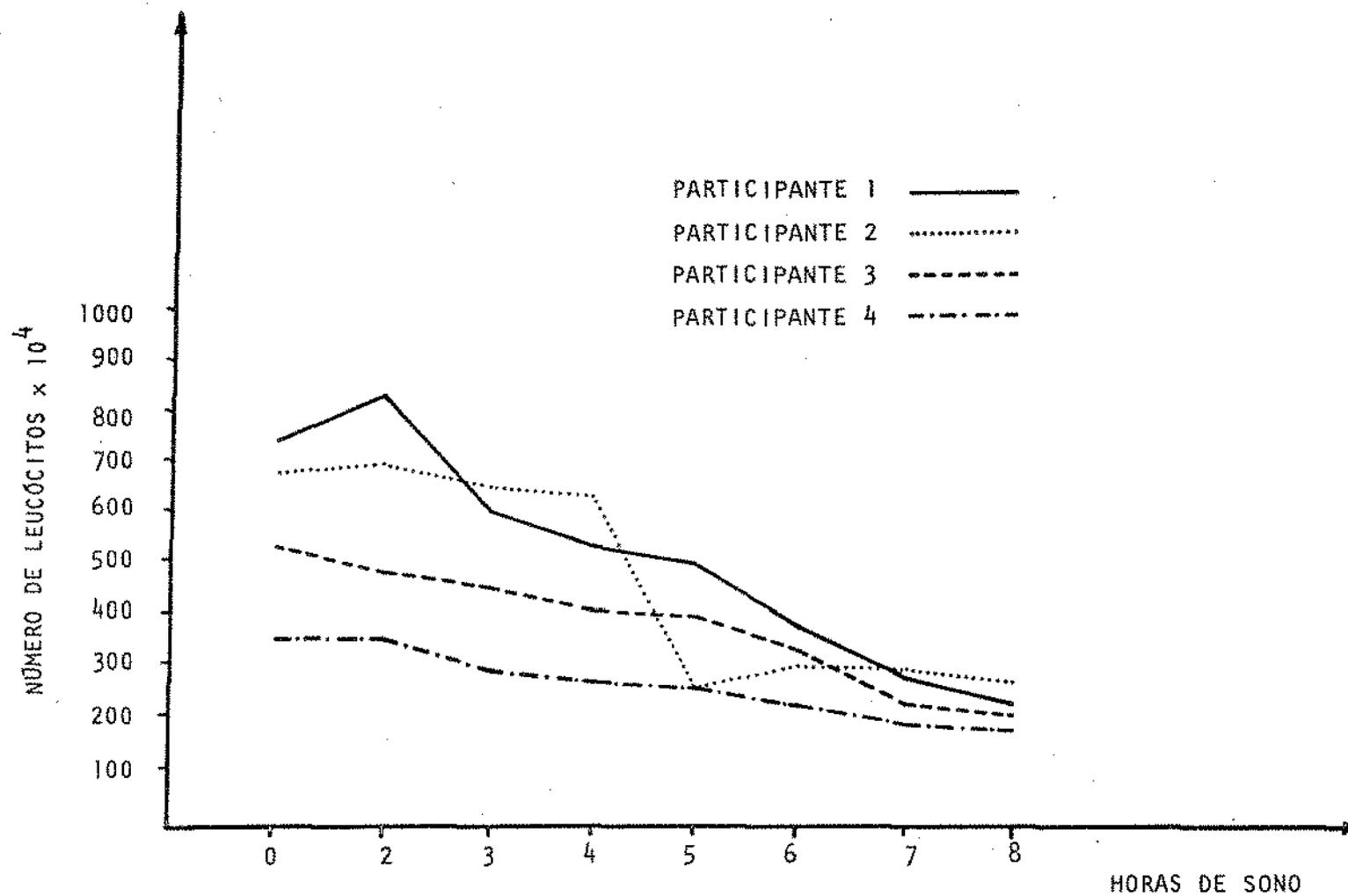


Figura 6. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) dos quatro participantes após 30 minutos de sono. Cada valor foi obtido da seguinte forma: os participantes dormiam de 2 a 8 horas; eram acordados e as células da boca retiradas através de 8 bochechos consecutivos e descartadas. Os participantes voltavam a dormir durante 30 minutos, quando então as células eram novamente coletadas e quantificadas. O tempo zero foi obtido quando os participantes ainda estavam acordados, imediatamente antes de iniciar o período de sono.

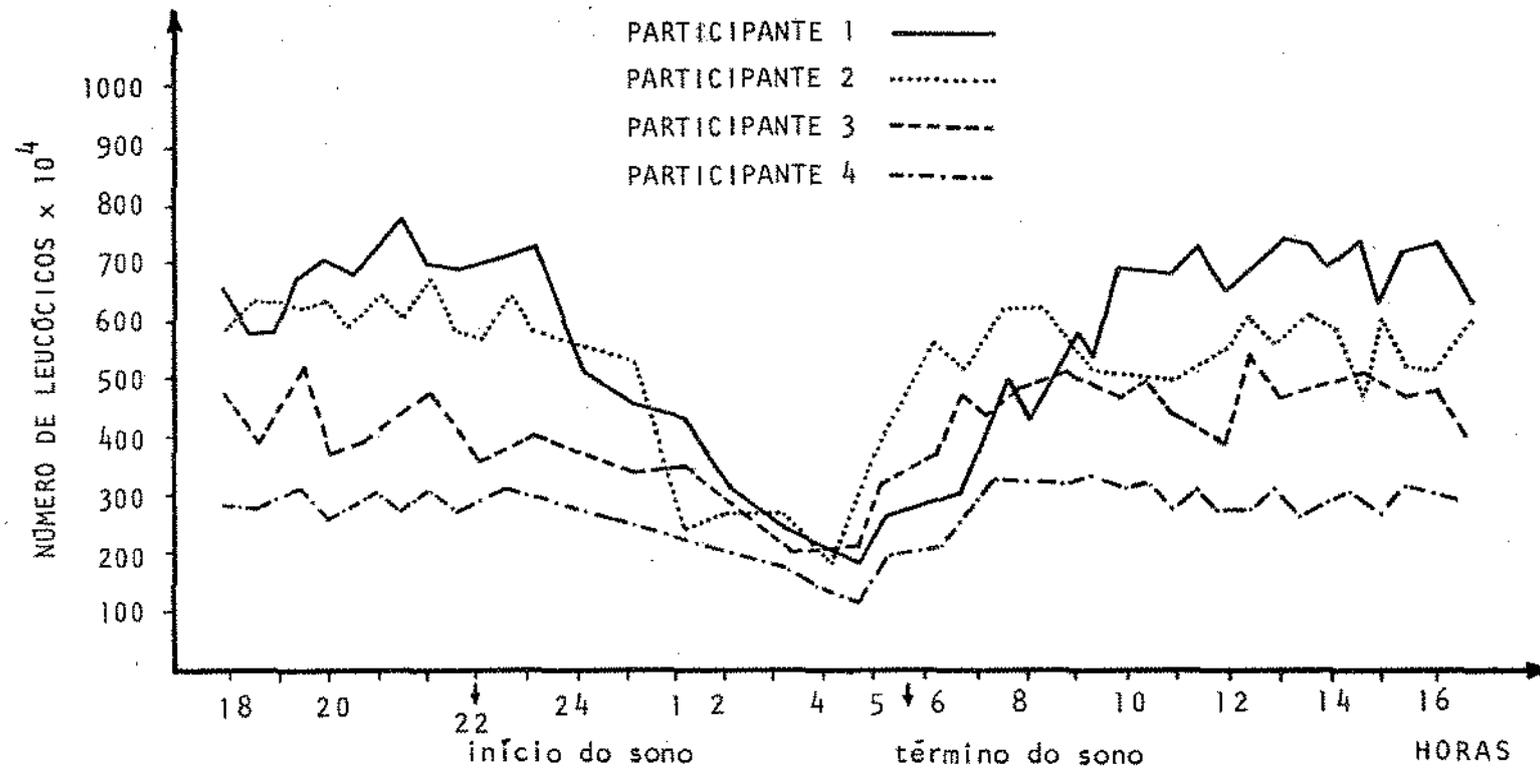


Figura 7. Gráfico construído a partir das figuras 3, 4 e 6, mostrando o número de células durante as 24 horas do dia, com interferência do sono, e em intervalos de 30 em 30 minutos.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com apenas 4 participantes, entretanto, as modificações quantitativas do número de leucócitos na cavidade bucal, quando presentes, puderam ser bem evidenciadas. Todos os participantes mantiveram durante os experimentos o mesmo controle de placa bacteriana e hábitos alimentares semelhantes. As células foram quantificadas em intervalos de 30 minutos, permitindo um grande número de observações para cada participante, tornando-se dispensável repetições de um mesmo experimento. Vários autores utilizaram o mesmo intervalo de tempo para os estudos dos leucócitos da boca, e parece que realmente, 30 minutos é o período mínimo necessário para que os leucócitos atinjam um número máximo (KLINKHAMER, 1963; KOWASHI *et alii*, 1980; RAESTE *et alii*, 1977). Resultados semelhantes foram também descritos por SKAPSKI & LEHNER (1976), que estudaram a dinâmica da migração celular coletando os leucócitos diretamente do sulco gengival.

Volumes inferiores a 15 ml de solução fisiológica foram testados para bochechos, mas os resultados não mostraram reprodutibilidade. O método utilizado permitiu provavelmente a coleta dos leucócitos da saliva, da superfície da

mucosa bucal e também dos presentes no sulco gengival, pois se gundo LISTGARTEN (1972), o sulco é um espaço que permite penetração de soluções. A coleta e quantificação das células do sulco gengival pelo método de SKAPSKI & LEHNER (1976), talvez fosse mais indicado do que o método usado neste trabalho. Entretanto, a coleta das células da saliva é mais simples e prático, e talvez mais adequado para um trabalho extenso, onde foi necessário quantificar os leucócitos de 30 em 30 minutos. Seria, de qualquer forma, interessante um estudo com parativo empregando-se os dois métodos.

Embora apenas quatro participantes tenham toma do parte no estudo, os resultados mostraram que houve uma evidente variação no número de leucócitos na cavidade bucal nos diferentes períodos do dia, e que as variações entre os 4 participantes foram apenas quantitativas, mantendo-se a mesma dinâmica de migração. Os resultados do presente estudo mostraram que o sono é fator fundamental na taxa de migração de leucócitos para a boca, sugerindo que no homem existe um ritmo circadiano na migração de leucócitos para a boca através do epi t \acute{e} lio juncional. Não são conhecidas as razões para a variação individual quantitativa, mas fatores como quantidade de saliva, profundidade do sulco e conseqüentemente extensão do epi t \acute{e} lio sulcular e juncional devem ser importantes.

SCHIÖTT & LÖE (1970) demonstraram que a migração de leucócitos aumentou de 4 a 5 vezes durante a manhã decrescendo durante o período 18:00-24:00 horas. Os resultados deste trabalho, no período 18:00-24:00 horas não corroboram os

resultados de SCHIÖTT & LÖE (1970), visto que, não houve variações significativas neste período. Na realidade, desde que não haja interferência do sono, a migração não se modifica acentuadamente durante as 24 horas do dia. Isto ficou bem evidente quando os participantes ficaram acordados durante a noite, com o número de leucócitos permanecendo relativamente constante, e sem apresentar o característico baixo número de células nas primeiras horas da manhã. Entretanto, após duas horas de sono, o número de leucócitos na boca é duas a três vezes maior, e este valor é mantido até 8 horas de sono. Paradoxalmente, apesar de durante o sono o número de células na boca estar aumentado, a taxa de migração parece estar diminuída. Isto pode ser explicado considerando-se os mecanismos de eliminação das células da cavidade bucal, que basicamente estão relacionados com a deglutição da saliva. Durante o sono a secreção salivar diminui acentuadamente (JENKINS, 1978), e é através da saliva que as células são conduzidas para as diversas partes da cavidade bucal, e finalmente deglutidas. Durante as 24 horas do dia há um total de 590 deglutições, sendo 50 durante o sono (JENKINS, 1978). Pode-se deduzir que durante o sono o número de deglutições é aproximadamente 10,8 vezes menor em relação ao período em que o indivíduo está acordado.

Os resultados mostraram também que durante o sono a diminuição de migração é mais acentuada a medida que aumentam as horas de sono. O período mínimo de sono foi de 2 horas, pois foi difícil conseguir que os participantes dormissem 30 minutos ou uma hora, realizassem bochechos e voltassem a

dormir por mais 30 minutos. Resultados confiáveis foram obtidos apenas a partir de duas horas de sono. Portanto, durante o sono migram menos células, as quais provavelmente permanecem na boca por mais tempo. Conseqüentemente, é possível que a capacidade de fagocitose destas células, principalmente PMN, esteja diminuída, em consequência do maior grau de degeneração, aumentando com isso a liberação de enzimas lisossômicas. Como os PMN podem atuar protegendo ou destruindo as estruturas periodontais, é possível que durante a noite o grau de proteção seja menor do que durante o dia, a despeito do maior número de células estarem presentes na região do sulco gengival. Para melhor esclarecimento destas hipóteses seriam interessantes estudos envolvendo viabilidade e capacidade de fagocitose dos PMN coletados diretamente do sulco, após determinados períodos de sono.

A placa bacteriana contém várias substâncias quimiotáticas para os neutrófilos, e é considerada como importante fator que atua na migração leucocitária através do epitélio juncional. Algumas substâncias da placa, como por exemplo lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicoico (LTA), são capazes de provocar aumento de migração leucocitária (GOLUB et alii, 1981; LAREAU et alii, 1984; WILTON & ALMEIDA, 1980). Entretanto, em 1979, YAMASAKI et alii, demonstraram que em ratos "germ free" o ritmo de migração é semelhante ao que ocorre em ratos normais, indicando que além dos componentes da placa bacteriana, outros fatores devem ser importantes. A migração celular inicia-se logo após a erupção do dente, e a variação diá

ria que ocorre sugere que possa apresentar ritmo circadiano, e portanto, controlado por fatores endógenos, semelhante ao que ocorre com outra atividade fisiológica, como atividade mitótica do epitélio gengival (MUHLEMANN et alii, 1954), números de eosinófilos circulantes (HIRSH, 1965), e a própria produção de saliva (JENKINS, 1978). Não deve ser esquecido que a saliva também apresenta efeitos quimiotáticos para os neutrófilos (DIETZ, 1939; JENKINS, 1978), apesar do sulco ser domínio do fluído gengival.

Outro fator que pode apresentar correlação com a migração celular é a descamação do epitélio juncional. O "turn over" do epitélio juncional de macacos é de $4,6 \pm 1,2$ dias, aproximadamente o dobro do epitélio gengival bucal que é de $8,9 \pm 3,4$ dias (SKOUGAARD, 1970). LISTGARTEN (1972), calculou que a taxa de descamação, expressa como número de células descamadas por unidade de superfície é de 50 a 100 vezes mais rápida no epitélio juncional do que no oral. Esta descamação deve ser veículo importante para conduzir os leucócitos no epitélio juncional para a boca, entretanto, é difícil correlacionar com os dados de migração apresentados neste trabalho.

Os corticosteróides atuam praticamente em todas as fases do processo inflamatório. A concentração sérica é variável, atingindo os menores valores no período da manhã, e portanto, parece não ter relação com a diminuição da migração de PMN pelo sulco gengival, como foi demonstrado neste trabalho. Isto pode estar de acordo com LABELLE & SCHAFFER (1966),

que relataram que a administração de cortisona não apresentou efeito na incidência e severidade das doenças periodontais (KROHN, 1958).

Nas doenças periodontais há aumento na quantidade de fluido gengival (CIMASONI, 1974; KOWASHI et alii, 1980), e de neutrófilos (SCHIÖTT & LOE, 1970). Na inflamação aguda, de um modo geral, os dois eventos podem ocorrer independentemente, visto que, os mediadores químicos são diferentes. Por outro lado, existem evidências de que o neutrófilo, célula principal da inflamação aguda, pode ser mediador do aumento da permeabilidade vascular (MILLER et alii, 1984; MURPHY, 1976), e é possível que no sulco gengival isto seja relevante, pois os dois fenômenos ocorrem concomitantemente. Seria interessante, principalmente nos horários em que há variação do número de neutrófilos na boca, fazer-se o estudo quantitativo da formação do fluido gengival.

Concluindo, gostaríamos de enfatizar que a possibilidade da existência de ritmo circadiano na migração de PMN através da gengiva, pode ser interessante não apenas sob o ponto de vista da biologia do periodonto, como também clinicamente. A maior ou menor intensidade de migração ou acúmulo de PMN no sulco gengival, pode ser acompanhado de períodos diários de maior ou menor destruição das estruturas periodontais.

6. RESUMO

Leucócitos polimorfonucleares (PMN) da cavidade oral de quatro indivíduos foram quantificados durante as 24 horas do dia, em intervalos de 30 minutos. Com os participantes acordados, o número de PMN apresentou pequenas variações nos diferentes períodos do dia. Nas primeiras 3-4 horas, após oito horas de sono, a quantidade de células na boca foi menor do que nos diferentes períodos do dia. Durante o sono, o número de leucócitos coletados da boca foi praticamente o dobro do que encontrado com os participantes acordados, e paradoxalmente a migração para a boca foi menor. Estes resultados indicam que a migração de leucócitos para a boca, através do epitélio juncional, é influenciada pelo sono.

7. ABSTRACT

Oral polymorphonuclear leukocytes (PMN) from four healthy human subjects, with no evidence of gingival inflammation, were quantified at intervals of 30 minutes during 24 hours. When the subjects were awake, the number of PMN collected from the mouth showed small variations. During the first 3-4 hours, following 8 hours of sleep, the number of PMN was smaller than the other periods of the day. During sleep, the number of oral leukocytes was nearly twice the value compared to when the individual was awake, and paradoxically there was a decrease in the migration of PMN into the oral cavity. These results suggest that the migration of PMN into the mouth is influenced by sleep.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, K.D.A. & DICKEY, L. Saliva cell count in myelogenous leukemia. Amm. Journal of Roentgenology, 38: 57-61, 1937.
- ATTSTRÖM, R. Presence of leukocytes in crevices of healthy and cronically inflamed gingivae. J. Periodont. Res., 5: 42-47, 1970.
- ATTSTRÖM, R. & EGELBERG, J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. J. Periodont. Res., 5: 48-53, 1970.
- ATTSTRÖM, R. & SCHROEDER, H.E. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. Scand. J. dent. Res., 87: 7-23, 1979.
- BESTERMAN, J.M. & LOW, R.B. Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. Biochem. J., 210: 1-13, 1983.
- BOYDEN, S. The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med., 115: 453-466, 1962.
- CALONIUS, P.E.B. The leukocyte count in saliva. Oral Surg., 11: 43-46, 1958.

- CIMASONI, G. The crevicular fluid. In: Monographs in Oral Science. Myers, H.M. ed., Vol. 3 Chap. VI, p.30-45, Basel: Karger, 1974.
- CLIFF, W.J. The acute inflammatory reaction in the rabbit ear chamber with particular reference to the phenomenon of leukocyte migration. J. Exp. Med., 124: 543-554, 1966.
- COX, M.O.; CRAWFORD, J.J.; LUNDELAD, R.L.; McFALL, W.T. Oral leukocytes and gingivitis in the primary dentition. J. Periodont. Res., 9: 23-28, 1974.
- DIETZ, A.K. The chemotatic influence of human saliva upon leukocytes. J. dent. Res., 18: 361-369, 1939.
- EGELBERG, J. Diffusion of histamine into the gingival crevice and through the crevicular epithelium. Acta Odont. Scand., 21: 271-279, 1963.
- FRANK, R.M. & CIMASONI, G. Ultrastructure de l'épithélium cliniquement normal der sillon et de la jonction gingivo-dentaires. Z. Zellforsch., 109: 356-375, 1970.
- GARANT, P.R. Plaque - neutrophil interaction in monoinfected rats as visualized by transmission electron microscopy. J. Periodont., 47: 132-138, 1976.
- GOLUB, L.M.; IACONO, V.J.; NICOLL, G.; RAMAMURTHY, N.; KASLICKR, S. The response of human sulcular leukocytes to a chemotatic challenge. A new in vivo assay. J. Periodont. Res., 16: 171-179, 1981.
- HELLDEN, L.; KAHNBERG, K.E. Chemotatic activity in experimental gingivitis. Scand. J. dent. Res., 81: 424 - 432, 1973.

- HERSH, E.M. & BODEY, G.P. Leukocytic mechanisms in inflammations. Ann. Rev. Med., 21: 105-132, 1970.
- HIRSH, J.G. Neutrophil and eosinophil leukocytes in the inflammatory process. Ed. Zweifach, E.W.; Grant, L.; McCluskey, R.T. Academic Press, p.245-280, New York, 1965.
- ITO, H.; ENOMOTO, S.; KOBAYASKI, K. Electron microscopic study of the human epithelial attachment. Bull. Tokyo med. dent. Univ., 14: 267-273, 1967.
- JENKINS, G.N. The physiology and biochemistry of the mouth. 4th ed. Blackwell Scientific Publications. p.501-541. London, 1978.
- KARRING, T. & LOE, H. The three dimensional concept of the epithelium connective tissue boundary of gingiva. Acta odont. Scand., 28: 917-923, 1970.
- KELLER, H.N.; HESS, M.W.; COTTIER, H. The in vitro assessment of leukocyte chemotaxis. Antibiot. Chemoth., 19: 112 - 118, 1974.
- KELLER, H.N. & JORKINS, E. Chemotaxis of leukocytes. Experientia, 24: 641-652, 1968.
- KENNEY, E.B.; KRAAL, J.H.; SAXE, S.R.; JONES, J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. J. Periodont. Res., 12: 227-234, 1977.
- KLINKHAMER, J.M. Human oral leukocytes. Periodontics, 3: 109-117, 1963.
- KLINKHAMER, J.M. Quantitative evaluation of gingivitis and periodontal disease. I - The orogranulocytic migratory rate. Periodontics, 6: 207-211, 1968.

- KLINKHAMER, J.M. & ZIMMERMAN, S. Function and viability of OMR as a measure of oral health. J. dent. Res., 48: 709-715, 1969.
- KOWASHI, Y.; FRANÇOIS, J.; CIMASONI, G. Sulcular polymorphonuclear leukocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res., 15: 151-158, 1980.
- KRAAL, J.H. & LOESCHE, W.J. Rabbit polymorphonuclear leukocyte migration in vitro in response to dental plaque. J. Periodont. Res. 9: 1-9, 1974.
- KROHN, S. The effect of the administration of steroid hormones on the gingival tissues. Journal of Periodontics, 29: 300-308, 1958.
- LABELLE, R.E. & SCHAFFER, E.M. The effects of cortisone and induced local factors on the periodontium of the albino rat. J. Periodont., 37: 483-490, 1966.
- LANGE, D. & SCHOROEDER, H.E. Cytochemistry and ultrastructure of gingival sulcus cells. Helvetica odont. acta supplement, 15: 65-86, 1971.
- LANTZMAN, E. & MUCHMAN, J. Leukocyte counts in the saliva of adults before and after extraction of teeth. Oral Surg. 30: 766-773, 1970.
- LAREAU, D.E.; HERZBERG, M.C.; NELSON, R.C. Human neutrophil migration under agarose to bacteria associated with the development of gingivitis. J. Periodont., 55: 540-549, 1984.
- LINDHE, J. & HELLDE, L. Neutrophil chemotactic activity elaborated by human dental plaque. J. Periodont. Res., 7: 297-303, 1972.

- LISTGARTEN, M.A. Electron microscopic study of the dento-gingival junction of man. Amer. J. Anat., 119: 147-169, 1966.
- LISTGARTEN, N.A. Normal development, structure, physiology and repair of gingival epithelium. Oral Science Reviews, 1: 3-67, 1972.
- LØE, H. Physiological aspects of the gingival pocket. An experiment study. Acta odont Scand., 19: 387-393, 1961.
- MARCHESI, V.T. & FLOREY, H.W. Electron microscopi observation on the emigration of leukocytes. J. Exp. Physiol. 45: 343-353, 1960.
- MCCUTCHEON, M. Chemotaxis in leukocytes. Physiology Review, 26: 319-336, 1946.
- MESSIER, E. & LEBLOND, C.P. Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine- H^3 into male rats and mice. Amer. J. Anat., 106: 247-256, 1960.
- METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation. Traduzido por F.A. e E.H. Starling. Paul Trench and Co., London, 1893.
- MILLER, D.R.; LAMSTER, I.B.; CHASENS, A.I. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. J. Clin. Periodont., 11: 1-15, 1984.
- MILLER, R.L.; FOLKE, L.E.A.; UMANA, C.R. Chemotatic ability of dental plaque upon autologous or heterologous human polymorphonuclear. J. Periodont., 46: 409-414, 1975.

- MUHLEMANN, H.R.; ZANDER, H.A.; WALKER, F. Mitotic activity in the periodontal tissues of the rat molar. J. dent. Res., 33: 459-467, 1954.
- MURPHY, P. The neutrophil. Plenum Medical Book Company, p. 33-83 i 125-194. London, 1976.
- RAESTE, A.M. & AURA, A. Rate of migration of oral leukocytes in patients with periodontitis. Scand. J. dent. Res., 86: 43-51, 1978.
- RAESTE, A.M.; TAPAMILA, T.; TUPAKKA, R. Leukocyte migration into the healthy dentulous mouth. A study in children, adolescents and adults. J. Periodont. Res., 12: 444 - 449, 1977.
- RAUCH, S. Die speicheldrüsen des menschen. Georg Thieme Verlag. p.46-57. Stuttgart, 1959.
- ROVELSTAD, G.H. Polymorphonuclear leukocyte function in a human periodontal disease. J. Amer. dent. Assoc., 68: 364-373, 1964.
- SCHIÖTT, C.R. & LÖE, H. The origin and variation in number of leukocytes in the human saliva. J. Periodont. Res., 5: 36-41, 1970.
- SCHLUGER, S.; YOUDELIS, R.A.; PAGE, R.C. Periodontia: fenômenos básicos, tratamento e inter relações oclusais e restauradoras. 1ª ed., Ed. Interamericana Ltda., p.188 - 226, Rio de Janeiro, 1981.
- SCHROEDER, H.E. Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva. Helv. Odont. Acta., 13: 65-79, 1969.

- SCHROEDER, H.E. & LISTGARTEN, M.A. Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. In: Monographs in Development Biology. 2nd ed., Wolsky A.S., Karger, Basel, 1971.
- SCHROEDER, H.E. & MÜNZEL-PEDRAZZOLI, S. Morphometric analysis comparing junctional and oral epithelium of normal human gingiva. Helv. Odont. Acta., 14: 53-66, 1970.
- SCRIBNER, D.J. & FAHRNEY, D. Neutrophil receptors for IgG and complement. Their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. J. Immunol., 116: 892-897, 1976.
- SCULLY, C.M. Transport and function of polymorphonuclear leukocytes in crevicular fluid. In: The borderland between caries and periodontal disease II. Eds. Lehenr, T., Cima-soni, G., Academic Press. p.69-81, London, 1980.
- SHARRY, J.J. & KRASSE, B. Observations on the origin of salivary leukocytes. Acta. odont. Scand., 18: 347-358, 1960.
- SKAPSKI, H. & LEHNER, T. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. J. Periodont. Res., 11: 19-24, 1976.
- SKOUGAARD, M. Cell population kinetics of the gingival epithelium. International Sciences Publication, Copenhagen, Denmark, 1965.
- SKOUGAARD, M. Cell renewal with special reference to the gingival epithelium. In: Advances in Oral Biology. Vol. 4, ed. Staple, P.H., p.261-288. Academic Press, New York, 1970.

- TEMPEL, T.R.; SNYDERMAN, R.; JORDAN, H.V.; MERGENHAGEN, S.E. Factors from saliva and oral bacteria chemotactic for polymorphonuclear leukocytes: their possible role in gingival inflammation. J. Periodont., 41: 71-80, 1970.
- TAICHMAN, N.S.; FREEDMAN, H.L.; URIUHARA, T. Inflammation and tissue injury. I - The response to intradermal injections of human dento gingival plaque in normal and leukopenic rabbits. Arch. oral Biol., 11: 1385-1392, 1966.
- TAICHMAN, N.S. & McARTHUR, W.P. Interaction of inflammatory cells and oral bacteria: release of lysosomal hydrolases from rabbit polymorphonuclear leukocytes exposed to Gram positive plaque bacteria. Arch. oral Biol., 21: 258 -263, 1976.
- TAICHMAN, N.S.; TSAI, C.C.; BAEHNI, P.C.; STOLLER, N.; McARTHUR, W.P. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. IV - In vitro release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supra-gingival and subgingival bacterial plaque. Infection and Immunity, 16: 1013-1023, 1977.
- TOLO, K. Permeability of oral mucosa to macromolecules. Thesis. University of Oslo, Norway, 1975.
- VAN DER VELDEN, U. Probing force and the relationship of the probe tip to the periodontal tissues. J. Clin. Periodont., 6: 104-114, 1979.
- VAN DER VELDEN, U. The influence of periodontal health on probing depth and bleeding tendency. J. Clin. Periodont., 7: 129-139, 1980.

- VAN DER VELDEN, U. Location of probe tip in bleeding and non-bleeding pockets with minimal gingival inflammation. J. Clin. Periodont., 9: 421-427, 1982.
- VAN DER VELDEN, U. & JENSEN, J. Microscopic evaluation of pocket depth measurements performed with six different probing forces in dogs. J. Clin. Periodont., 8: 107 - 116, 1981.
- VAN DER VELDEN, U. & VRIES, J.H. Introduction of a new periodontal probe. J. Clin. Periodont., 5: 188-197, 1978.
- WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature, 289: 646-650, 1981.
- WILTON, J.M.A. & ALMEIDA, O.P. The comparative inflammatory effect of dental plaque, lipopolysaccharide, lipoteichoic acid, dextran and levan on leukocytes in the mouse peritoneal cavity. In: Lehner, T., Cimasoni, G. eds.. The borderland between caries and periodontal disease. II. p.83-97, Academic Press. London, 1980.
- WRIGHT, D.E. Leukocytes in the saliva of edentulous and caries free subjects. Arch. oral Biol., 7: 581-585, 1962.
- WRIGHT, D.E. The source and rate of entry of leukocytes in the human mouth. Arch. oral Biol., 9: 321-337, 1964.
- YAMASAKI, A.; NIKAI, H.; NIITANI, K.; IJUHIN, N. Ultrastructure of the junctional epithelium of germ free rat gingiva. J. Periodont., 50: 641-648, 1979.

A P E N D I C E

Tabela 1. Total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados em diferentes intervalos de tempo. O tempo zero corresponde ao total de leucócitos coletados antes de iniciar o experimento.

Tubos	Tempo (min)									
	0	5	10	15	20	25	30	60	90	
1º	266	68	87	130	234	247	253	262	268	
2º	193	36	28	67	134	156	192	193	213	
3º	130	21	36	49	115	95	124	130	85	
4º	103	17	25	32	87	69	91	103	83	
5º	93	16	19	27	54	49	85	93	69	
6º	36	12	10	21	36	28	45	36	36	
7º	19	8	8	18	19	21	21	19	17	
8º	14	2	1	19	12	14	10	14	12	
TOTAL	854	180	214	363	691	679	821	850	783	

Tabela 2. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados após 2 a 8 horas de sono. 0 tempo zero corresponde ao número de células imediatamente antes de dormir.

Tubos	Horas de sono							
	0	2	3	4	5	6	7	8
1º	259	912	853	866	886	846	824	912
2º	224	220	187	185	137	104	198	196
3º	127	149	83	95	177	97	41	182
4º	91	92	85	88	39	84	34	77
5º	86	44	33	51	54	67	39	31
6º	52	31	21	28	27	36	31	15
7º	15	19	19	35	22	19	16	18
8º	18	17	21	11	19	11	21	5
TOTAL	872	1484	1302	1359	1361	1264	1204	1436

Tabela 3. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados com diferentes período de sono da seguinte forma: o participante dormia de 2 a 8 horas, era acordado e as células da boca retiradas através de 8 bochechos consecutivos e descartadas. O participante volta a dormir durante 30 minutos, quando então as células eram novamente coletadas e quantificadas. O tempo zero foi obtido imediatamente antes de iniciar o período de sono.

Horas / min.	0/30	2/30	3/30	4/30	5/30	6/30	7/30	8/30
Tubos								
10	214	259	189	161	149	110	81	54
20	151	221	139	182	96	77	53	29
30	131	97	98	62	78	51	36	43
40	92	91	77	51	41	46	42	38
50	86	86	45	37	65	39	35	29
60	39	55	32	26	47	28	18	19
70	18	18	23	21	24	14	13	14
80	11	16	13	9	10	7	13	11
TOTAL	742	843	616	549	510	372	291	237

Tabela 4. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados no período 24:00-10:00 horas.

Hs/min Tubos	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00
1º	188	247	236	228	194	253	212	237	234	211	247	199	256	249	253	208	222	246	235	257	212
2º	136	201	145	128	169	139	165	243	129	191	157	167	121	196	149	165	176	115	167	142	167
3º	104	183	97	104	65	105	123	184	93	106	177	163	95	94	101	132	94	87	91	149	153
4º	87	97	84	85	45	96	84	64	77	93	64	88	87	79	87	85	77	64	45	96	98
5º	64	43	75	77	42	63	65	42	54	68	36	64	68	74	60	73	63	51	32	52	85
6º	32	57	67	46	39	45	32	36	39	53	31	49	45	59	42	44	42	32	40	51	69
7º	11	21	31	22	24	22	41	18	23	32	29	21	36	25	24	30	31	20	28	24	41
8º	9	12	20	8	11	21	24	12	17	14	20	10	18	16	10	13	9	7	19	12	15
TOTAL	631	861	755	698	589	744	746	836	666	768	761	761	722	792	726	731	704	522	657	793	846

Tabela 5. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados no período 24:00-06:00 horas.

Horas/min Tubos	Horas/min													
	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	
1ª	188	247	236	228	194	253	213	237	234	211	247	199	256	
2ª	136	201	145	128	169	139	165	243	129	191	157	167	121	
3ª	104	183	97	104	65	105	123	184	93	106	177	163	95	
4ª	87	97	84	85	45	96	84	64	77	93	64	88	87	
5ª	64	43	75	77	42	63	65	42	54	68	36	64	64	
6ª	32	57	67	46	39	45	32	36	39	53	31	49	45	
7ª	11	21	31	22	24	22	41	18	23	32	29	21	36	
8ª	9	12	20	8	11	21	24	12	17	14	20	10	18	
TOTAL	631	861	755	698	589	744	746	836	666	768	761	761	722	

Tabela 6. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados no período 06:00-12:00 horas.

Horas/min Tubos	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00	10:30	11:00	11:30	12:00
1º	54	59	84	89	110	121	159	201	198	231	212	247	236
2º	36	28	67	53	67	71	84	139	99	134	156	196	201
3º	21	36	41	52	49	63	61	98	77	115	95	163	189
4º	17	25	33	42	32	30	53	63	45	87	69	101	89
5º	20	19	31	37	25	25	39	41	36	54	49	66	43
6º	16	17	23	24	21	20	28	24	31	36	28	31	29
7º	11	21	19	15	18	15	19	17	21	19	21	19	21
8º	11	11	18	9	19	10	17	7	13	12	14	12	16
TOTAL	185	207	316	321	343	355	460	590	520	688	644	835	824

Tabela 7. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados no período 12:00-18:00 horas.

Horas/min Tubos	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30	16:00	16:30	17:00	17:30	18:00
	10	269	268	262	287	281	281	290	272	299	275	296	288
20	189	193	147	209	222	228	211	217	192	173	205	213	213
30	101	130	92	93	100	132	90	121	124	86	112	122	85
40	81	103	83	92	85	90	88	59	91	77	101	98	83
50	78	93	81	73	94	86	77	79	85	63	93	77	69
60	41	36	51	44	49	32	39	43	45	36	40	37	36
70	29	19	33	21	30	19	22	36	21	26	18	23	17
80	21	14	23	12	15	9	11	8	10	13	9	16	12
TOTAL	809	856	772	831	876	877	828	871	867	749	874	874	783

Tabela 8. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 1, coletados no período 18:00-24:00 horas.

Horas/min Tubos	18:00	18:30	19:00	19:30	20:00	20:30	21:00	21:30	22:00	22:30	23:00	23:30	24:00
	10	257	239	245	232	249	256	279	278	253	207	212	242
20	113	161	101	163	212	200	204	196	161	185	110	229	255
30	109	83	97	103	92	108	127	139	145	132	92	93	72
40	99	64	89	94	83	93	91	106	93	85	82	85	97
50	107	55	83	76	96	83	86	101	96	92	80	78	102
60	63	51	42	63	59	38	52	55	47	61	77	77	51
70	32	25	22	47	25	19	15	31	20	17	33	24	30
80	10	19	21	29	16	13	18	23	18	23	12	19	21
TOTAL	790	697	700	807	832	810	872	929	823	802	698	847	889

Tabela 9. Total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados em diferentes intervalos de tempo. 0 tempo zero corresponde ao total de leucócitos coletados antes de iniciar o experimento.

Tubos	Tempo (min)								
	0	5	10	15	20	25	30	60	90
1ª	257	53	64	132	231	243	265	223	233
2ª	120	36	45	59	101	115	99	111	168
3ª	103	18	39	46	74	96	75	68	72
4ª	79	14	18	37	49	52	63	73	63
5ª	54	12	17	18	38	43	44	54	42
6ª	42	11	9	15	23	22	29	36	35
7ª	28	9	6	8	18	11	19	22	22
8ª	15	6	3	4	9	8	12	19	16
TOTAL	598	159	201	319	543	590	606	606	651

Tabela 10. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados após 2 a 8 horas de sono. 0 tempo zero corresponde ao número de células imediatamente antes de dormir.

Tubos	Horas de sono								
	0	2	3	4	5	6	7	8	
10	291	809	634	921	843	785	964	873	
20	124	93	153	167	98	132	101	127	
30	94	99	103	87	84	95	85	69	
40	83	67	93	64	44	81	63	54	
50	57	83	64	31	31	54	48	41	
60	43	44	42	63	28	29	40	34	
70	22	31	31	18	13	23	36	28	
80	13	14	26	20	17	12	20	12	
TOTAL	727	1240	1146	1371	1158	1221	1357	1238	

Tabela 11. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados com diferentes períodos de sono, da seguinte forma: o participante dormia de 2 a 8 horas, era acordado e as células da boca retiradas através de 8 bochechos consecutivos e descartadas. O participante voltava a dormir durante 30 minutos, quando então as células eram novamente coletadas e quantificadas. O tempo zero foi obtido imediatamente antes de iniciar o período de sono.

Tubos	Horas / min.							
	0	2/30	3/30	4/30	5/30	6/30	7/30	8/30
1ª	265	277	276	246	93	101	94	84
2ª	137	115	130	139	63	82	74	60
3ª	84	96	73	78	44	40	49	48
4ª	65	81	64	55	22	39	38	37
5ª	53	52	53	44	26	20	23	21
6ª	41	43	36	30	17	19	18	14
7ª	25	24	21	25	8	12	10	16
8ª	11	14	10	19	6	7	6	14
TOTAL	681	702	663	636	279	320	312	294

Tabela 12. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados no período 24:00-10:00 horas.

Hs/min Tubos	Hs/min																				
	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00
1ª	236	327	246	267	279	257	278	275	296	278	310	263	224	265	276	293	259	293	277	284	271
2ª	128	152	108	201	195	170	173	192	156	139	167	151	147	169	155	142	176	139	148	167	180
3ª	94	93	82	95	87	105	89	96	84	95	83	89	91	83	95	91	90	87	93	89	84
4ª	65	77	45	64	63	73	47	43	56	44	47	63	72	44	63	57	62	64	49	76	73
5ª	39	42	43	39	29	44	44	44	29	21	35	45	50	33	41	39	57	49	52	61	59
6ª	28	31	31	21	23	31	28	33	31	26	22	22	36	22	30	27	32	30	22	34	31
7ª	13	11	15	22	19	11	9	17	19	20	22	15	20	18	9	22	19	18	16	14	19
8ª	9	7	10	13	8	5	13	14	18	20	9	7	5	10	12	13	9	10	11	8	10
TOTAL	672	740	579	723	703	696	681	714	689	643	695	655	645	644	681	684	704	690	668	733	727

Tabela 13. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados no período 24:00-06:00 horas.

Horas/min Tubos	Horas/min												
	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00
1º	296	327	245	267	279	257	278	275	296	278	310	263	224
2º	128	152	108	201	095	170	173	192	156	139	167	151	147
3º	94	93	82	86	87	105	89	96	84	95	83	89	91
4º	65	77	45	64	63	73	47	43	56	44	47	63	72
5º	39	42	43	39	29	44	44	44	29	21	35	45	50
6º	28	31	31	21	23	31	28	33	31	26	22	22	36
7º	13	11	15	22	19	11	9	17	19	20	22	15	20
8º	9	7	10	13	8	5	13	14	18	20	9	7	5
TOTAL	672	740	579	723	703	696	681	714	689	643	695	655	645

Tabela 14. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados no período 06:00-12:00 horas.

Horas/min Tubos	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00	10:30	11:00	11:00	12:00
	19	67	96	155	179	247	223	267	285	273	296	265	239
29	34	67	96	103	153	111	129	135	193	147	99	83	120
39	23	43	66	84	79	68	83	104	97	68	75	93	103
49	19	38	45	76	63	73	63	93	63	43	63	65	79
59	22	31	42	43	44	54	44	44	42	39	44	43	54
69	16	26	33	55	39	36	37	53	35	31	29	31	42
79	12	22	28	29	28	22	31	38	22	26	19	26	28
89	8	19	16	21	22	19	28	26	16	11	12	22	15
TOTAL	201	342	481	590	675	606	682	768	741	661	606	602	598

Tabela 15. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados no período 12:00-18:00 horas.

Horas/min Tubos	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30	16:00	16:30	17:00	17:30	18:00
	10	312	297	253	278	324	296	285	297	238	303	275	263
20	196	103	121	89	129	134	190	134	96	147	103	123	109
30	97	63	84	63	93	84	90	84	65	77	74	64	73
40	63	44	57	89	64	43	53	62	44	52	51	39	43
50	43	29	31	43	28	38	44	43	41	63	44	47	40
60	31	21	33	44	45	19	29	35	29	44	20	36	28
70	22	25	22	31	31	23	22	31	22	29	28	27	23
80	19	9	23	20	19	17	11	24	18	22	24	17	16
TOTAL	783	591	624	657	733	754	724	710	553	737	619	616	596

Tabela 16. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 2, coletados no período 18:00-24:00 horas.

Horas/min Tubos	18:00	18:30	19:00	19:30	20:00	20:30	21:00	21:30	22:00	22:30	23:00	23:30	24:00
	1º	287	304	253	273	297	245	263	291	322	249	276	297
2º	129	134	163	147	123	165	139	124	190	153	144	169	176
3º	97	96	101	100	91	83	69	94	101	98	84	89	96
4º	63	47	97	73	83	64	101	83	63	64	66	76	64
5º	45	85	64	45	77	72	77	57	51	53	38	58	77
6º	36	39	39	46	31	43	66	43	38	42	41	43	65
7º	28	21	31	39	28	31	32	22	31	33	25	22	44
8º	18	23	12	20	22	20	11	13	19	21	15	12	23
TOTAL	703	749	760	743	752	723	758	727	805	713	689	766	830

TABELA 17. Total de leucócitos ($\times 10^4$) coletados do participante número 3, em diferentes intervalos de tempo. O tempo zero corresponde ao total de leucócitos coletados antes de iniciar o experimento.

Tubos	Tempo (min)								
	0	5	10	15	20	25	30	60	90
1º	164	51	59	131	145	163	176	148	163
2º	104	31	40	81	86	94	129	96	109
3º	63	16	32	73	69	78	83	79	81
4º	63	21	31	40	32	35	63	83	67
5º	49	19	17	19	21	38	29	70	53
6º	40	12	7	14	14	29	33	41	42
7º	22	5	6	10	9	17	18	29	29
8º	23	1	2	4	6	11	21	20	17
TOTAL	528	156	194	372	382	465	552	566	561

Tabela 18. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) coletados do participante número 3, após 2 a 8 horas de sono. O tempo zero corresponde ao número de células imediatamente antes de dormir.

Tubos	Horas de sono								
	0	2	3	4	5	6	7	8	
1º	161	938	757	844	656	938	742	756	
2º	120	222	133	225	104	123	89	167	
3º	94	64	76	84	96	84	101	64	
4º	67	36	63	108	63	65	82	22	
5º	43	40	47	64	42	36	44	45	
6º	31	26	32	48	23	21	38	28	
7º	23	22	22	26	19	24	29	22	
8º	15	18	10	12	12	17	19	17	
TOTAL	554	1366	1140	1411	1015	1308	1144	1121	

Tabela 19. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 3, coletados com diferentes períodos de sono, da seguinte forma: o participante dormia de 2 a 8 horas, era acordado e as células da boca retiradas através de 8 bochechos consecutivos e descartadas. O participante voltada a dormir durante 30 minutos, quando então as células eram novamente coletadas e quantificadas. O tempo zero foi obtido imediatamente antes de iniciar o período de sono.

Tubos	Horas/min.							
	0/30	2/30	3/30	4/30	5/30	6/30	7/30	8/30
1º	161	163	182	142	148	99	67	50
2º	121	104	72	99	83	61	45	42
3º	96	83	78	63	77	48	38	43
4º	59	62	45	41	51	41	29	27
5º	41	38	26	19	35	37	21	25
6º	27	21	22	27	18	22	17	19
7º	23	11	25	18	10	18	16	20
8º	14	10	16	10	11	14	12	13
TOTAL	542	492	466	419	423	340	245	239

Tabela 20. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 3, coletados no período 24:00-10:00 horas.

Hs/min Tubos	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00
	19	180	192	179	172	194	191	198	180	183	171	179	172	169	175	181	173	192	186	175	179
29	72	113	112	116	124	131	108	99	113	96	124	107	102	96	103	100	89	93	92	112	91
39	84	77	73	53	84	76	77	85	69	82	73	84	79	81	86	79	59	67	78	83	77
49	75	66	67	51	70	63	52	57	63	84	67	53	57	65	63	57	52	75	51	63	52
59	70	63	57	49	53	61	53	62	43	44	55	39	43	41	46	38	40	49	42	39	36
69	43	36	45	39	45	30	54	36	39	31	36	35	34	32	35	29	26	28	30	33	25
79	22	39	23	33	19	31	22	27	18	23	36	25	26	22	18	17	21	19	23	23	18
89	10	23	17	12	21	17	18	21	24	12	13	10	19	18	17	12	10	11	12	13	9
TOTAL	566	609	588	515	624	588	591	562	561	538	570	536	528	534	553	506	485	530	499	545	490

Tabela 21. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 3, coletados no período 24:00-06:00 horas.

Horas/min Tubos	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00
	19	180	192	179	172	194	191	190	180	183	171	179	172
29	72	113	112	116	124	131	108	99	113	96	124	107	102
39	84	77	73	53	84	76	77	85	69	82	73	84	79
49	75	66	67	51	70	63	52	57	63	84	67	53	57
59	70	63	57	49	53	61	53	62	43	44	55	39	43
69	43	36	45	39	45	30	54	36	39	31	36	35	34
79	22	39	38	23	33	19	31	22	27	18	23	36	25
89	10	23	17	12	21	17	18	21	24	12	13	10	19
TOTAL	556	609	588	515	624	588	591	562	561	538	570	536	528

Tabela 22. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 3, coletados no período 06:00-12:00 horas.

Horas/min Tubos	Horas/min												
	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00	10:30	11:00	11:30	12:00
1º	43	47	83	101	122	173	161	185	189	163	177	160	163
2º	45	40	66	83	93	101	96	113	107	133	145	121	123
3º	33	40	61	65	76	93	83	77	93	69	73	81	101
4º	29	43	53	46	54	47	53	61	49	77	61	74	87
5º	31	19	44	41	39	58	44	53	41	63	49	54	51
6º	19	23	31	29	31	39	33	39	44	53	38	40	37
7º	12	17	20	19	18	32	29	31	22	33	21	19	23
8º	5	12	19	20	13	22	21	17	18	23	19	16	12
TOTAL	217	241	394	404	446	565	520	576	573	614	583	565	596

Tabela 23. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do paciente número 3, coletados no período 12:00-18:00 horas.

Tubos \ Horas/min													
	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30	16:00	16:30	17:00	17:30	18:00
1º	201	164	177	131	196	176	164	149	163	177	148	163	161
2º	122	104	131	83	142	129	96	99	124	111	96	109	93
3º	96	63	96	66	67	83	84	78	96	83	79	81	67
4º	77	63	67	71	80	63	91	49	77	84	83	67	45
5º	84	49	52	32	53	29	67	41	61	77	70	53	47
6º	43	40	39	30	41	33	44	30	40	38	41	42	31
7º	36	22	32	23	33	18	21	23	29	21	29	29	22
8º	21	23	19	15	22	21	27	22	19	15	20	17	16
TOTAL	680	528	613	451	634	552	594	491	609	606	566	561	462

Tabela 24. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 3, coletados no período 18:00-24:00 horas.

Horas/min Tubos	18:00	18:30	19:00	19:30	20:00	20:30	21:00	21:30	22:00	22:30	23:00	23:30	24:00
	1º	183	142	161	196	128	133	177	161	192	163	142	163
2º	131	83	104	144	97	89	121	120	134	101	93	87	94
3º	83	67	84	92	90	67	83	94	91	78	64	69	67
4º	64	52	71	63	40	53	40	67	59	47	46	44	39
5º	37	42	41	44	31	42	28	43	31	33	28	27	25
6º	23	28	34	39	27	30	26	31	26	21	26	21	19
7º	20	29	22	24	19	24	22	23	20	17	21	19	22
8º	16	16	18	12	13	17	20	15	14	13	9	12	11
TOTAL	557	459	535	614	445	455	517	554	567	473	429	442	469

Tabela 25. Total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados em diferentes intervalos de tempo. O tempo zero corresponde ao total de leucócitos coletados antes de iniciar o experimento.

Tubos \ Tempo (min)										
	0	5	10	15	20	25	30	60	90	
1º	145	20	31	45	56	109	133	147	131	
2º	50	12	19	37	41	74	74	63	77	
3º	43	16	20	31	49	62	55	44	44	
4º	30	10	14	29	31	39	33	33	29	
5º	31	9	11	24	25	27	23	28	32	
6º	36	7	8	18	19	21	20	27	24	
7º	21	6	4	9	12	15	19	9	18	
8º	12	1	2	6	11	12	14	6	7	
TOTAL	376	81	109	199	244	359	371	357	362	

Tabela 26. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados após 2 a 8 horas de sono. 0 tempo zero corresponde ao número de células imediatamente antes de dormir.

Tubos	Horas de sono							
	0	2	3	4	5	6	7	8
1º	147	319	431	311	380	324	365	345
2º	63	111	129	93	103	123	69	101
3º	44	74	73	64	63	63	84	69
4º	33	56	70	57	47	33	75	44
5º	28	34	43	43	45	23	61	40
6º	27	29	28	31	14	25	42	31
7º	9	18	23	24	29	24	21	28
8º	6	7	12	10	14	10	19	16
TOTAL	357	648	809	633	695	625	736	674

Tabela 27. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados com diferentes períodos de sono, da seguinte forma: o participante dormia de 2 a 8 horas, era acordado e as células da boca retiradas através de 8 bochechos consecutivos e descartadas. O participante voltava a dormir durante 30 minutos, quando então as células eram novamente coletadas e quantificadas. O tempo zero foi obtido imediatamente antes de iniciar o período de sono.

Tubos	Horas/min.							
	0	2/30	3/30	4/30	5/30	6/30	7/30	8/30
1º	131	133	125	117	104	87	63	61
2º	66	65	59	57	43	39	47	39
3º	59	53	44	38	37	29	29	32
4º	37	36	26	29	29	26	19	27
5º	26	31	25	21	22	25	14	18
6º	18	21	12	17	16	19	13	19
7º	13	19	10	11	12	10	12	15
8º	11	12	7	6	14	11	8	13
TOTAL	361	370	308	296	277	246	205	224

Tabela 28. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados no período 24:00-10:00 horas.

Rs/min Tubos	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00
	19	132	126	137	126	125	145	136	140	131	153	139	147	123	151	128	135	147	123	135	138
29	65	79	60	82	78	65	62	64	57	74	73	62	58	80	65	76	64	79	61	63	79
39	44	38	42	41	63	32	46	57	35	56	49	53	17	43	39	47	40	36	33	35	41
49	23	27	31	25	27	23	38	24	26	23	31	37	25	29	27	31	30	26	23	22	33
59	21	22	30	19	27	26	25	33	24	27	25	29	33	22	25	27	33	18	15	17	20
69	15	7	15	15	12	22	28	12	25	32	22	19	20	11	19	17	20	12	11	15	19
79	9	6	10	14	8	18	17	11	16	21	14	13	12	9	12	12	16	10	9	12	15
89	6	8	12	9	6	5	7	9	6	4	10	9	6	10	6	5	9	12	12	10	11
TOTAL	315	315	337	337	331	336	359	350	320	390	363	369	324	355	321	350	359	316	299	312	348

Tabela 29. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados no período 24:00-06:00 horas.

Horas/min Tubos	Horas/min													
	00:00	00:30	01:00	01:30	02:00	02:30	03:00	03:30	04:00	04:30	05:00	05:30	06:00	
19	132	126	137	126	125	145	136	140	131	153	139	147	123	
29	65	79	60	82	78	65	62	64	57	74	73	62	58	
39	44	38	42	41	63	32	46	57	35	56	49	53	17	
49	23	27	31	25	37	23	38	24	26	23	31	37	25	
59	21	22	30	19	27	26	25	33	24	27	25	29	33	
69	15	7	15	15	12	22	28	12	25	32	22	19	20	
79	9	8	10	14	8	18	17	11	16	21	14	13	12	
89	6	8	12	9	6	5	7	9	6	4	10	9	6	
TOTAL	315	315	337	337	331	336	359	350	320	390	363	369	324	

Tabela 30. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados no período 06:00-12:00 horas.

Horas/min Tubos	Horas/min												
	06:00	06:30	07:00	07:30	08:00	08:30	09:00	09:30	10:00	10:30	11:00	11:30	12:00
1º	43	53	64	67	71	89	133	141	139	145	128	136	133
2º	36	43	51	43	39	47	62	74	84	50	96	77	85
3º	33	26	28	39	37	43	47	53	27	43	40	47	34
4º	25	18	26	29	31	40	24	35	41	38	36	33	51
5º	22	16	18	25	19	28	39	39	36	31	25	27	36
6º	19	11	8	19	16	26	32	16	29	36	26	21	21
7º	6	8	6	9	14	17	28	9	19	21	18	18	17
8º	3	4	3	4	5	2	13	12	9	12	11	15	8
TOTAL	187	179	204	235	232	292	378	379	384	376	380	374	385

Tabela 31. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados no período 12:00-18:00 horas.

Horas/min Tubos	12:00	12:30	13:00	13:30	14:00	14:30	15:00	15:30	16:00	16:30	17:00	17:30	18:00
	1º	129	132	137	122	125	141	128	136	143	128	133	141
2º	58	74	69	72	59	65	54	63	66	57	74	73	64
3º	44	41	43	40	38	64	33	44	53	33	55	46	44
4º	23	29	31	25	33	23	39	26	24	25	33	36	29
5º	18	20	28	21	27	24	21	29	21	24	23	29	34
6º	21	18	20	15	25	36	17	18	29	28	20	12	18
7º	17	13	17	12	8	10	11	15	10	12	19	9	8
8º	8	8	9	12	6	9	7	8	7	3	14	12	6
TOTAL	318	335	354	325	321	372	310	339	353	310	371	358	341

Tabela 32. Número total de leucócitos ($\times 10^4$) do participante número 4, coletados no período 18:00-24:00 horas.

Horas/min Tubos	18:00	18:30	19:00	19:30	20:00	20:30	21:00	21:30	22:00	22:30	23:00	23:30	24:00
	19	147	123	131	129	133	138	147	130	126	132	140	134
29	62	65	77	93	64	64	63	65	79	60	65	82	78
39	53	44	44	63	32	30	44	57	61	45	42	37	44
49	33	31	29	34	35	29	33	39	27	35	33	29	38
59	12	31	32	21	18	20	28	26	31	29	22	26	22
69	18	28	24	23	16	25	27	15	19	11	21	21	17
79	8	10	18	19	12	18	9	7	12	9	14	19	11
89	10	8	7	6	5	10	6	8	9	7	6	10	7
TOTAL	343	340	362	388	315	334	357	347	364	328	343	358	356