

MARINA LINS MAYMONE DE MELO

**“AVALIAÇÃO PERIODONTAL E DOSAGEM DE NIVEIS DE IL-2, IL-4, IL-6,
IL-10, IL-17, INF- γ E TNF- α EM SORO E SALIVA DE PACIENTES
PORTADORES DE ARTRITE REUMATOIDE”**

Recife

2019

**“AVALIAÇÃO PERIODONTAL E DOSAGEM DE NIVEIS DE IL-2, IL-4, IL-6,
IL-10, IL-17, INF- γ E TNF- α EM SORO E SALIVA DE PACIENTES
PORTADORES DE ARTRITE REUMATOIDE”**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós- Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Recife

2019

M528a	Melo, Marina Lins Maymone de. Avaliação periodontal e dosagem de níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, INF-γ e TNF-α em soro e saliva de pacientes portadores de artrite reumatoide / Marina Lins Maymone de Melo. – 2019. 81 f.: il.; 30 cm. Orientador: Luiz Alcino Monteiro Gueiros. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2019. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. Periodontite. 2. Artrite reumatoide. 3. Citocina. I. Gueiros, Luiz Alcino Monteiro (Orientador). II. Título.
617.6	CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-040)

MARINA LINS MAYMONE DE MELO

**AVALIAÇÃO PERIODONTAL E DOSAGEM DE NIVEIS DE IL-2, IL-4, IL-6, IL-10,
IL-17, INF- γ E TNF- α EM SORO E SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DE
ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Aprovada em: 22/04/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Ana Cláudia da Silva Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Angela Luzia Branco Pinto Duarte
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Adilson Sakuno (Examinador externo)
Faculdade de Odontologia da APCD

RESUMO

A destruição inflamatória do tecido conjuntivo e do osso circundante presentes tanto na periodontite como da artrite reumatoide (AR) é resultado das ações de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. O objetivo deste estudo é descrever o padrão clínico e avaliar os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 de pacientes portadores de periodontite e artrite reumatoide. Cento e oitenta mulheres foram classificadas em 2 grupos: artrite reumatoide (AR, n=120) com idade média de $49,92 \pm 12,40$ e controle saudável (C, n=60), $45,68 \pm 11,12$, que foram subdivididos em 4 grupos: AR com periodontite (AR/CP), AR sem periodontite (AR/SP), controle com periodontite (C/CP) e controle sem periodontite (C/SP). No grupo AR houve maior média de PS ($p=0,008$) e NIC ($p=0,007$) e maior hipossalivação ($p<0,001$) do que o grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos artrite e controle no que diz respeito à presença de gengivite e periodontite. Na saliva, esses valores invertem, ficando mais elevados no grupo controle. Este achado se repete ao avaliarmos os indivíduos sem periodontite (AR/SP e C/SP). O presente estudo sugere que a AR e a periodontite se manifestam de forma diferente no soro e na saliva e que sua expressão está relacionada aos respectivos mecanismos de patogênese, de modo que os níveis de citocinas na AR são maiores no soro, enquanto na periodontite estes níveis são elevados na saliva. Ainda, o tratamento da AR parece modular a resposta periodontal, reduzindo os níveis salivares das citocinas avaliadas.

Palavras-chave: Periodontite. Artrite reumatoide. Citocina

ABSTRACT

Inflammatory destruction of connective tissue and surrounding bone present in both periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) is a result of the actions of cytokines and other pro-inflammatory mediators. The objective of this study is to describe the clinical pattern and to evaluate the levels of Th1, Th2 and Th17 cytokines in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis. One hundred and eighty women were classified into two groups: rheumatoid arthritis (RA, n = 120) with mean age of 49.92 ± 12.40 and healthy control (C, n = 60), 45.68 ± 11.12 , which were divided into 4 groups: AR with periodontitis (AR / CP), AR without periodontitis (AR / SP), control with periodontitis (C / CP) and control without periodontitis (C / SP). In the AR group, there was a higher mean PS ($p = 0.008$) and NIC ($p = 0.007$) and higher hyposalivation ($p < 0.001$) than the control group. No differences were observed between the arthritis and control groups regarding the presence of gingivitis and periodontitis. When evaluating the two groups with periodontitis (AR / CP and C / CP), we found higher values of all the cytokines in the serum of RA patients than in the systemically healthy ones. In saliva, these values inverted, being higher in the control group. The present study suggests that RA and periodontitis manifest differently in serum and saliva and that their expression is related to the respective mechanisms of pathogenesis, so that the levels of cytokines in RA are higher in serum, whereas in periodontitis these levels are high in saliva. Moreover, the treatment of RA seems to modulate the periodontal response, reducing the salivary levels of the evaluated cytokines.

Key words: Periodontitis. Rheumatoid arthritis. Cytokines

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 DOENÇA PERIODONTAL	10
2.2 ARTRITE REUMATOIDE	24
2.3 DOENÇA PERIODONTAL E ARTRITE REUMATOIDE	35
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 DESENHO DO ESTUDO	42
4.2 AVALIAÇÃO REUMATOLÓGICA	43
4.3 AVALIAÇÃO PERIODONTAL	43
4.4 COLETA DE SANGUE E SALIVA	44
4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS	45
4.6 OBSERVAÇÕES DA ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS	46
ARTIGO - Relationship of periodontitis and rheumatoid arthritis with salivary	46
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	63
ANEXO A — NORMAS DA REVISTA (JOURNAL OF PERIODONTOLOGY)	67

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é considerada a doença oral mais prevalente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, acometendo um grande número de indivíduos em todo o mundo (Herrera *et al.*, 2007; Papapanou *et al.*, 2018). A periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes, tendo como fator de risco primário o biofilme dentário (Hajishengallis, 2014). Embora seja uma doença multifatorial estreitamente influenciada por fatores ambientais e microbianos, a gravidade e progressão da periodontite podem estar associadas com alteração do nível de citocinas (Leite *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018). O balanço destas proteínas parece desempenhar um papel fundamental na resposta imune de modo a conduzir a uma imunidade protetora ou a destruição tecidual de acordo com sua estruturação (Zhang *et al.*, 2018).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória autoimune, de etiologia desconhecida, caracterizada por uma sinovite crônica destrutiva que determina importante incapacidade funcional e perda da qualidade de vida (Kurowska *et al.*, 2017). Sua etiologia ainda não está totalmente compreendida, e envolve fatores genéticos e ambientais (Smolen *et al.*, 2016). Um evento- gatilho, possivelmente infecção ou autoimunidade, inicia a inflamação nas articulações. Complexas interações entre múltiplas células imunes e suas citocinas, proteinases e fatores de crescimento mediam a destruição articular e complicações sistêmicas (Khurana e Berney, 2005). Porém ainda existem outros fatores, como o fumo, periodontite e presença de infecções que eventualmente podem exercer um papel de modulação deste processo (Kurowska *et al.*, 2017).

Pacientes com AR apresentam aumento no número de dentes cariados, perdidos e obturados. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que indivíduos com AR podem

apresentar hipossalivação, perda de destreza manual e maior número de citocinas circulantes no organismo (Wolff *et al.*, 2014).

A AR e a periodontite dividem algumas características patogênicas: ambas são doenças crônicas inflamatórias, com influências genéticas e ambientais, desequilíbrio do sistema imune, levam à destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo (Laugisch *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2018) e provocam aumento de citocinas inflamatórias (Li *et al.*, 2017).

Vários marcadores inflamatórios relacionados à periodontite e a doenças sistêmicas podem ser detectados na saliva e no soro. Estes incluem não apenas interleucinas, como fator de necrose tumoral, matriz metaloproteinase (MMP) 8 e 9 dentre outras (Giannobile *et al.*, 2009; Gümüş *et al.*, 2014). A saliva total dos pacientes com AR pode conter biomarcadores inflamatórios derivados do soro originados em células inflamatórias, colapso do colágeno ou remodelação óssea (Giannobile *et al.*, 2009; Äyräväinen *et al.*, 2018).

A inflamação dos tecidos periodontais pode produzir quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1b, IL-6 e TNF- α (Saini, 2011). Mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-10 e INF- γ estão aumentados no fluido sinovial e no soro de pacientes com AR (Marti *et al.*, 2009; Saini, 2011) (como IL-1b, IL-8, IL-15, IL-17), bem como o fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa do ligante de células B ativadas (RANKL), sendo similares às citocinas associadas à inflamação na periodontite, e por isso é possível que pessoas com AR ou outras artrites inflamatórias possam ter níveis aumentados desses potenciais biomarcadores em sua saliva (Mirrielees *et al.*, 2010).

Deste ponto de vista, a periodontite pode não ser apenas doença inflamatória crônica, mas também sofrer influência de componente autoimune desencadeado por

processos mediados por inflamação circulante no organismo (Li *et al.*, 2017). Da mesma maneira, citocinas encontradas na saliva podem circular pelo corpo, agravando doenças sistêmicas.

Sabe-se que um mesmo medicamento pode tratar múltiplas doenças e a mesma doença seja tratada por múltiplas drogas, especialmente em casos onde essas doenças coexistem e possuem mecanismos imupatogênicos semelhantes. Por isso faz-se necessário o manejo multidisciplinar e melhor entendimento desses mecanismos para que possa auxiliar no diagnóstico e tratamento das mesmas.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil clínico e imunológico da doença periodontal em pacientes com artrite reumatoide e a relação das citocinas com as características clínicas das duas doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é definido como o conjunto de tecidos que sustentam e revestem o dente. Fazem parte deste sistema o cemento radicular, o ligamento periodontal, o osso alveolar e a junção dentogengival (Nanci e Bosshardt, 2006).

Cemento é um tecido conjuntivo rígido, avascular que reveste as raízes dos dentes e que tem como principal função a inserção de fibras do ligamento periodontal. O processo alveolar é o osso dos maxilares que contém os alvéolos dos dentes. Consiste em placas corticais externas e osso esponjoso central. O osso cortical é onde se inserem as fibras do ligamento periodontal (Nanci e Bosshardt, 2006).

O ligamento periodontal (LP) é uma rede fibrosa alinhada e ancorada ao cemento da raiz dos dentes de um lado e ao osso alveolar do outro lado. Fornece estabilidade mecânica, atuando como um amortecedor para proteger o dente e o osso alveolar de danos provocados por altas forças mastigatórias. Juntamente com a gengiva, forma uma barreira protetora contra patógenos da cavidade oral e sua rede neural desempenha um importante papel sensorial durante a mastigação (De Jong *et al.*, 2017).

A junção dentogengival (gengiva voltada para o dente) é uma adaptação da mucosa oral que compreende componentes epiteliais e do tecido conjuntivo. O epitélio é dividido em três compartimentos funcionais - gengival, sulcular e epitélio juncional. O tecido conjuntivo é dividido em compartimentos superficiais e profundos. O epitélio juncional desempenha um papel crucial, uma vez que é responsável pelo selamento dos tecidos periodontais do ambiente oral. A doença periodontal (DP) se instala quando a estrutura do epitélio juncional começa a falhar, portanto sua integridade é essencial para manter o periodonto saudável. As células mononucleares, juntamente

com moléculas que secretam e outras originárias de células epiteliais juncionais, sangue e fluido tecidual representam a primeira linha de defesa no controle microbiano. Entre essas moléculas estão a interleucina IL-8, IL-1, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e função linfocitária antígeno-3. O tecido conjuntivo que suporta o epitélio juncional é estruturalmente diferente daquele que apoia o epitélio gengival oral. Mesmo em circunstâncias clinicamente normais, apresenta maior número de células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T (Nanci e Bosshardt, 2006).

O exame da condição periodontal de um indivíduo inclui a avaliação clínica dos sinais inflamatórios dos tecidos periodontais, o registro das profundidades de sondagem e dos níveis clínicos de inserção e a avaliação radiográfica do osso alveolar de suporte (Lindhe *et al.*, 1973). A perda de inserção periodontal e osso alveolar representam os resultados dos aspectos destrutivos dos mecanismos de defesa do hospedeiro que respondem a infecções oportunistas por bactérias presentes no sulco gengival, assim como os efeitos diretos dos fatores de virulência dos patógenos periodontais. No entanto, a perda de inserção e osso alveolar não podem ser utilizados para prever a susceptibilidade a progressão futura da doença periodontal, portanto, a desvantagem dos procedimentos diagnósticos utilizados tradicionalmente é que eles não são capazes de identificar indivíduos susceptíveis, nem distinguir sítios ativos de inativos (Greenstein e Lamster, 1995).

Uma variedade de sistemas de avaliações periodontais vem sendo desenvolvida através dos anos. Alguns desses sistemas de índices foram concebidos exclusivamente para o exame de pacientes dentro de uma estrutura de consultório, e outros para a pesquisa epidemiológica (Susin *et al.*, 2004; Susin *et al.*, 2005).

Em estudos epidemiológicos contemporâneos, avalia-se a perda dos tecidos

periodontais de suporte através da mensuração dos níveis de inserção e da profundidade de sondagem. A profundidade de bolsa à sondagem (PS) é realizada com o auxílio de uma sonda milimetrada e é definida como a distância que vai da margem gengival até ao ponto em que a extremidade do instrumento, inserido na bolsa com força moderada, encontra resistência. O nível de inserção clínica (NIC) é definido como a distância que vai da junção cimento-esmalte (JCE) até a posição em que a ponta da sonda encontra resistência (Kostlan, 1965).

Diversos estudos avaliaram a melhor forma de avaliação da doença periodontal em estudos epidemiológicos e os resultados indicam que o exame de toda a dentição fornece os melhores meios de avaliar de forma precisa a prevalência e a gravidade da doença periodontal em uma população (Hunt, 1987; Hunt e Fann, 1991; Susin *et al.*, 2005). A profundidade de sondagem (PS) é a distância do topo da margem gengival até o fundo do sulco gengival. A PS é aumentada quando há inflamação da gengiva podendo elevar a margem gengival e/ou quando há destruição do ligamento periodontal e o processo alveolar é reabsorvido. NIC é a distância da junção cimento-esmalte até o fundo do sulco gengival. O NIC não pode ser avaliado se a junção cimento-esmalte não estiver exposta. Reflete a reabsorção óssea, um efeito da doença periodontal e os diferentes estágios no processo da doença (Baron *et al.*, 2014).

A gengivite e a periodontite são as principais doenças periodontais e atingem um percentual elevado da população. A Associação Americana para a Pesquisa Dental relata que 48% dos adultos com idade entre 35 e 44 anos de idade têm a inflamação da gengiva (gengivite), e 22% possuem a doença periodontal destrutiva (Nanci e Bosshardt, 2006). A prevalência da periodontite pode chegar a 50-60% da população

mundial e aumenta em indivíduos mais velhos (Eke *et al.*, 2012; Eke *et al.*, 2016) e é considerada o maior problema oral presente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Herrera *et al.*, 2007) e a mais prevalente condição que promove reabsorção óssea (Benjamin, 2010). É caracterizada como uma doença inflamatória crônica mediada pelo hospedeiro que afeta os tecidos de suporte dos dentes, tendo como fator de risco primário o biofilme dentário (Socransky *et al.*, 1998; Hajishengallis, 2014; Tonetti *et al.*, 2018).

Possuem como etiologia primária a presença de bactérias específicas, especialmente as gram-negativas residentes no biofilme dentário, associada à deficiência no mecanismo de defesa do paciente (Hajishengallis, 2014; Damgaard *et al.*, 2015). Embora as bactérias sejam essenciais para o desenvolvimento da periodontite, o fato de ela se desenvolver em graus variáveis em diferentes indivíduos sugere uma etiologia multifatorial onde fatores ambientais e microbianos podem iniciar e modificar a progressão da doença. Resultados de estudos sugerem que a gravidade e progressão da periodontite podem estar associadas com o polimorfismo do gene das citocinas (Damgaard *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Zhao e Li, 2018; Zhao, B. *et al.*, 2018). Estas desempenham um papel fundamental na resposta imune e podem conduzir a uma imunidade protetora ou a destruição de tecidos pela produção de seus diferentes níveis (Zhang *et al.*, 2018).

A fisiopatologia da doença tem sido caracterizada em suas principais vias moleculares e, por fim, leva à ativação de proteinases derivadas do hospedeiro que promovem a perda de fibras do ligamento periodontal marginal, migração apical do epitélio juncional e a disseminação apical do biofilme bacteriano ao longo da superfície radicular. A inflamação gengival se inicia após a formação de biofilme bacteriano, no

entanto, a iniciação e progressão da periodontite dependem de alterações no microbioma, na resposta aos nutrientes dos produtos inflamatórios gengivais e degradação dos tecidos que enriquecem algumas espécies e nos mecanismos antibacterianos que tentam conter a destruição microbiana dentro da área do sulco gengival (Tonetti *et al.*, 2018).

Traços geneticamente transmissíveis, como polimorfismos genéticos, podem acentuar a resposta do hospedeiro frente a um desafio bacteriano e são responsáveis pela variação da susceptibilidade individual à periodontite (Han *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2016; Zupin *et al.*, 2017). Indivíduos que apresentam aspectos clínicos semelhantes podem responder de forma diferente para a mesma terapia periodontal, evidenciando a importância dos fatores do hospedeiro na patogênese das DP. A resposta do hospedeiro envolve complexa interação entre as células, matriz extracelular e citocinas circulantes (Laine *et al.*, 2012).

A doença periodontal é considerada um distúrbio inflamatório iniciado pela presença de bactérias gram-negativas que resulta na destruição tecidual do periodonto (Damgaard *et al.*, 2015). Embora grupos específicos de anaeróbios gram-negativos no biofilme dental sejam reconhecidos como seus principais agentes etiológicos, estima-se que a maior parte do dano tecidual observado seja causada de maneira indireta pela resposta do hospedeiro mediante a infecção, e não pela agressão direta do agente infeccioso (Lindhe e Lang, 2010; Hajishengallis, 2014). Estudos têm demonstrado que a periodontite tem uma influência importante na resposta imunológica sistêmica podendo desencadear ou agravar muitas condições médicas. Essa bacteremia transitória e formação de citocinas pró-inflamatórias podem provocar esse possível impacto sistêmico (Patel *et al.*, 2014; Damgaard *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2018).

O Simpósio Mundial de Periodontia (Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors, 1996) designou *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* como patógenos periodontais. Uma das associações mais fortes entre um suposto patógeno e a doença periodontal destrutiva envolve *A. actinomycetemcomitans*. Conhecida como antiga designação de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, foi renomeada como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Essa espécie foi primeiramente reconhecida como um passível patógeno periodontal devido à sua presença frequente e em números elevados em lesões de periodontite agressiva localizada (LAP) (Newman e Socransky, 1977). Porém também tem sido relacionada com as formas adultas da doença periodontal destrutiva, mas o seu papel ainda não foi esclarecido. A espécie foi isolada de lesões de periodontite crônica, embora menos frequentemente e em menores proporções que em lesões de indivíduos com LAP (Picolos *et al.*, 2005). Induz citocinas que estimulam a diferenciação de células Th1, Th2 e Th17, aumentam ainda, a expressão de interferon gama (IFN- γ), IL-12 que estimula Th1 e a IL-4, que estimula Th2 (Herbert *et al.*, 2016).

O segundo patógeno periodontal que é intensamente investigado é o *Porphyromonas gingivalis*. Estudos iniciados no final da década de 1970 e que estendem até a data atual enfatizaram a associação de *P. gingivalis* com a doença periodontal e demonstraram que a espécie era incomum ou estava presente em números reduzidos na saúde ou gengivite, sendo mais frequentemente encontrada nas formas destrutivas da doença. Em indivíduos doentes, observa-se estreita relação entre *P. gingivalis* com a profundidade da bolsa (Mysak *et al.*, 2014; How *et al.*, 2016).

P. gingivalis tem se mostrado capaz de induzir elevadas respostas imunes sistêmicas e locais em indivíduos com variadas formas de periodontite (O'brien- Simpson *et al.*,

2005; Molteni *et al.*, 2018), Existe um grande esforço em muitos laboratórios nos últimos anos não somente para comparar o nível da resposta imune em indivíduos com e sem doença (Hajishengallis, 2014; Geng *et al.*, 2018), mas também para examinar a avidéz relativa de anticorpo (Lu *et al.* 2018), a subclasse de anticorpo, o efeito do tratamento e a natureza dos antígenos que desencadeiam respostas elevadas (Ogawa *et al.*, 1989). O consenso entre os estudos de anticorpos é que muitos, mas não todos, os indivíduos que já sofreram ou sofrem de perda de inserção periodontal exibem níveis elevados de anticorpos para antígenos de *P. gingivalis*, sugerindo que essa bactéria ganhou acesso aos tecidos e pode ter iniciado ou contribuído para a patologia (Ogawa *et al.*, 1989; Jockel-Schneider *et al.*, 2018; Kuritani *et al.*, 2018).

Dentre as enzimas liberadas pela bactéria no biofilme, uma merece destaque: a Arg-1, uma protease produzida pela *Porphyromonas gingivalis* que tem a capacidade de induzir uma potente resposta imune humoral (Aduse-Opoku *et al.*, 1995).

Reações hospedeiro-parasita podem ser divididas em resposta inata (não- específica) e adaptativa (específica). Reações inatas incluem a resposta inflamatória e não envolvem mecanismos imunológicos. Reações adaptativas que incluem respostas imunológicas tendem a ser muito efetivas, uma vez que a resposta do hospedeiro é “moldada” para os patógenos (Damgaard *et al.*, 2015).

O hospedeiro tem um repertório extenso de mecanismos de defesa para evitar a invasão de patógenos agressores. Uma resposta ineficaz pode resultar em uma lesão crônica (p. ex. tuberculose) ou, se excessivamente desdobrada, em uma lesão na qual a resposta do hospedeiro contribui significativamente para a destruição tecidual (p. ex. artrite reumatoide) (Abbas, 2015).

Citocinas são proteínas solúveis, secretadas por células envolvidas na resposta do

hospedeiro, tanto inata quanto adaptativa, agindo como moléculas mensageiras que transmitem sinais para outras células. Muitas citocinas são capazes de agir nas células que as produzem estimulando (ou declinando) sua própria produção e a produção de outras citocinas (Lindhe *et al.*, 1973).

As interleucinas são importantes membros do grupo das citocinas e estão primariamente envolvidas na comunicação com os leucócitos e outras células, tais como as epiteliais, endoteliais e fibroblastos envolvidos no processo inflamatório (Lindhe e Lang, 2010).

As funções das células T CD4⁺ efetoras são recrutar e ativar os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) e outros leucócitos que destroem os microrganismos intracelulares e alguns extracelulares e ajudam os linfócitos B a produzir anticorpos (Abbas, 2015). As células T CD4⁺ quando ativadas expressam o receptor ativador ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL), que está relacionado à osteoclastogênese, sugerindo que o sistema imunológico desempenha papel crucial no desenvolvimento da periodontite crônica (Gonzalez *et al.*, 2015).

Três grandes subgrupos de células T CD4⁺ efetoras, chamadas de Th1, Th2 e Th17 funcionam na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de agentes patogênicos infecciosos e estão envolvidas em diferentes tipos de lesões de tecidos em doenças imunológicas (Abbas, 2015).

Os primeiros subgrupos descobertos foram chamados de linfócitos T auxiliares tipo 1 e 2, ou Th1 e Th2 baseado na secreção de IFN- γ ou IL-4 (Gaffen e Hajishengallis, 2008). O subgrupo Th17, assim chamado porque a sua citocina característica é a IL-17, foi descoberto posteriormente ao Th1 e Th2. As células Th17 foram identificadas como as células responsáveis por alguma resposta mediada por células T CD4⁺ a doenças inflamatórias que não pudesse ser atribuída aos subgrupos Th1 e Th2

(Gaffen e Hajishengallis, 2008; Abbas, 2015).

A assinatura das citocinas produzidas pelos principais subgrupos de células T CD4⁺ são IFN- γ para as células Th1; IL-4, IL-5 e IL-13 para as células Th2; e IL-17 e IL-22 para as células Th17 (Abbas, 2015). Cada uma das células Th1, Th2 e Th17 possui padrões distintos de migração, em grande parte, definidos pelos receptores de quimiocinas e moléculas de adesão que elas expressam, que os direciona a migrar para os diferentes locais de infecções (Chen *et al.*, 2016).

Embora as células T CD4⁺ diferenciadas efetoras sejam consideradas a fonte de muitas citocinas na proteção e em respostas imunológicas adaptativas patológicas, a mesmas citocinas podem ser produzidas por outros tipos de células, tais como as células T $\gamma\delta$ e células linfoides inatas. Por exemplo, em algumas reações inflamatórias dominadas pela IL-17, as células CD4⁺ Th17 representam apenas de 30 a 35% das células produtoras de citocinas, sendo o restante outras populações de células (Abbas, 2015).

A diferenciação em Th1 é impulsionada principalmente pelas citocinas IL-12 e IFN- γ e ocorre em resposta a microrganismos que ativam as células dendríticas, macrófagos, e células NK (natural killer). As citocinas IL-12, IL-18 e interferons de tipo I promovem o desenvolvimento de Th1; dessas, a IL-12 é provavelmente a mais potente. Uma vez que as células Th1 desenvolvem, elas secretam IFN- γ , que promove mais diferenciação de Th1 e assim, amplifica a reação. Além disso, o IFN- γ inibe a diferenciação de células T CD4⁺ imaturas para os subgrupos Th2 e Th17, promovendo, assim, a polarização da resposta imunológica em um sentido. Em outras palavras, a IL-12 produzida pelas células dendríticas e macrófagos em resposta aos microrganismos, incluindo os microrganismos intracelulares e IFN- γ produzidos por

células NK ativam os fatores de transcrição T-bet, STAT1 e STAT4, que estimulam a diferenciação de células T CD4⁺ T imaturas para o subconjunto Th1. O IFN- γ produzido pelas células Th1 amplifica esta resposta e inibe o desenvolvimento das células Th2 e Th17 (Gaffen e Hajishengallis, 2008; Chen *et al.*, 2016)

A principal função das células Th1 é ativar os macrófagos para ingerir e destruir os microrganismos. A mesma reação de ativação dos macrófagos por Th1 está envolvida na reação prejudicial de hipersensibilidade do tipo tardia, que é um componente de muitas doenças inflamatórias e na inflamação granulomatosa (Abbas, 2015).

O IFN- γ é a principal citocina de ativação de macrófagos e possui funções críticas na imunidade contra microrganismos intracelulares (Abbas, 2015). Aumenta, ainda, a atividade fagocitária de neutrófilos auxiliando na contenção da infecção (Gemmell *et al.*, 2007).

O subgrupo Th2 é um mediador da defesa independente de fagócitos, em que os eosinófilos e os mastócitos possuem papéis centrais. Essas reações são de extrema importância para a eliminação de microrganismos em tecidos da mucosa. Eles são também essenciais para o desenvolvimento de doenças alérgicas. A diferenciação em Th2 é estimulada pela citocina IL-4. Essa citocina é a principal do subgrupo Th2 e funciona tanto como um indutor quanto como uma citocina efetora dessas células (Abbas, 2015).

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina pleiotrópica que é produzida pela subpopulação de células T helper 2 e pode resgatar linfócitos B de apoptose e aumentar a sua sobrevivência, promovendo assim a proliferação de linfócitos B. A IL4 também regula a função macrofágica, diminuindo-a (Laine *et al.*, 2012).

As citocinas relacionadas a Th2 (IL-4 e IL-10) estão associadas à imunidade humoral e às propriedades antiinflamatórias. Estão relacionadas à progressão da periodontite,

uma vez que surgem num período mais tardio à doença (Lappin *et al.*, 2001; Gemmell *et al.*, 2007).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que regula negativamente o sistema imunológico pró-inflamatório. No entanto, o efeito estimulador dos linfócitos B pode estimular a produção de auto-anticorpos, que pode desempenhar um papel na periodontite. A IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos e células T, e desempenha um papel na regulação das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α (Laine *et al.*, 2012). Estudo sugere a possível influência dos polimorfismos da IL-10 na suscetibilidade à periodontite crônica (Geng *et al.*, 2018).

O subgrupo Th17 está envolvido no recrutamento de leucócitos e na indução da inflamação. Considerando que a IL-6 e a IL-1 estimulam os primeiros passos na diferenciação Th17, a IL-23 parece ser mais importante para a proliferação e manutenção dessas células. Sua diferenciação é inibida por INF- γ e IL-4. Então, fortes respostas Th1 e Th2 tendem a suprimir o desenvolvimento Th17. Sua principal função efetora é destruir as bactérias extracelulares e os fungos, principalmente por indução da inflamação neutrofílica. Th17 produz vários perfis de citocinas, incluindo IL-17, IL-6, IL-21, IL-22 e TNF- α , que possuem funções pró-inflamatórias (Azizi *et al.*, 2013). Contribuem para a patogênese de diversas doenças inflamatórias, como a psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla (Abbas, 2015; Beringer e Miossec, 2018).

A interleucina-17 (IL-17) é uma das citocinas mais estudadas na imunologia por estar intimamente envolvida na patologia da inflamação (Miossec e Kolls, 2012; Isailovic *et al.*, 2015; H *et al.*, 2017; Beringer e Miossec, 2018) e é um importante mediador na patogênese da doença periodontal, principalmente a sua isoforma IL-17^a (Hajishengallis, 2014). Polimorfismos deste gene têm sido associados à periodontite crônica (Corrêa *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2017).

As células produtoras de IL-17 são consideradas por muitos como as sentinelas da imunidade da barreira mucosa. De fato, a IL-17 exerce sua função como um mediador protetor na imunidade à barreira por múltiplos mecanismos. Até o momento, reconhece-se que: 1) a IL-17 tem papéis importantes na manutenção da integridade da barreira; 2) a IL-17 promove a produção de fatores antimicrobianos que são fundamentais para a contenção de patógenos e comensais em locais de barreira; A IL-17 é uma primeira linha de defesa estrategicamente posicionada em locais de barreira para regular o recrutamento e a geração de neutrófilos (Abusleme e Moutsopoulos, 2017).

As células secretoras de IL-17 foram documentadas em lesões inflamatórias de pacientes com uma variedade de doenças inflamatórias e autoimunes humanas, incluindo psoríase, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, diabetes tipo 1, esclerose múltipla e periodontite (Gaffen e Hajishengallis, 2008). Produzem citocinas, incluindo a interleucina IL-17, IL-6, IL-21, IL-22 e o fator de necrose tumoral TNF- α , com efeitos pró-inflamatórios, que parecem ter um papel na imunopatogênese da ar (Azizi *et al.*, 2013).

A IL-1 α , IL-1 β e TNF- α estimulam a reabsorção óssea e inibem a formação óssea. Diferentes mediadores, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-17, podem agir como ativadores de osteoclastos (Abbas, 2015). A interleucina-1 (IL-1) é um potente mediador pró-inflamatório que é liberado principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas (Laine *et al.*, 2012). O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória que possui uma ampla gama de funções imunoreguladoras. É produzido por monócitos, macrófagos e linfócitos, e tem o potencial de estimular a produção de mediadores secundários, incluindo quimiocinas ou produtos da ciclo-oxigenase, ampliando o grau de inflamação (Laine *et al.*, 2012).

Evidências sugerem que tanto a IL-1 quanto o TNF- α desempenham importantes papéis na patogênese da periodontite, uma vez que possuem a capacidade de aumentar a reabsorção óssea e podem regular a proliferação de células fibroblásticas, originárias tanto da gengiva quanto do ligamento periodontal. Os níveis de IL-1 e TNF- α estão aumentados no fluido sulcular quando do estabelecimento da periodontite e estas citocinas são encontradas em níveis mais altos em tecidos periodontais inflamados quando comparados aos níveis exibidos em tecidos normais (Gümüş *et al.*, 2014).

Múltiplos papéis foram identificados para interleucina-6 (IL-6). É liberada por vários tipos de células, e seus níveis de secreção são determinados pelo tipo de célula e a natureza do estímulo (Laine *et al.*, 2012). Se trata de uma citocina pleiotrópica (Nishimoto *et al.*, 2000) com importante função na regulação do processo imune, o que sugere que sua produção está associada com a inflamação (Kishimoto, 2010). Ela pode induzir a produção de proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio e outros fatores (Kishimoto, 2006). Maiores concentrações de IL-6 no fluido crevicular e no soro estão associadas com a periodontite (Äyräväinen *et al.*, 2018).

O principal sistema de ativação dos osteoclastos inclui o fator receptor ativador nuclear kappa-beta (RANK), o RANK ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). RANK é um receptor expresso pelas células osteoprogenitoras de osteoclasto. RANKL e OPG são citocinas que pertencem à família do TNF, e são produzidos pelos osteoblastos e células do estroma da medula óssea. Enquanto o RANKL promove ativação dos osteoclastos, a OPG tem efeito oposto. Portanto, a ligação do RANKL ao RANK vai resultar na ativação dos osteoclastos, e a OPG ligada ao RANKL vai inibir o processo de diferenciação destas células (Liu *et al.*, 2003).

O sistema RANK/ RANKL/ OPG é também envolvido no processo de degradação

óssea, que é induzido por citocinas pró-inflamatórias, como a PGE2, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-11 e IL-17. Porém, o papel das células T não é claro, visto que essa célula não somente produz RANKL, mas também inibidores de RANKL, tais como IFN- γ e IL-4 (Takayanagi, 2009).

A compreensão do papel dos subconjuntos de células T CD4⁺ e a interação entre citocinas e mediadores inflamatórios na periodontite crônica podem fornecer base para futuras intervenções e descoberta de novas terapias que possam limitar ou parar o processo inflamatório das doenças periodontais (Chen *et al.*, 2016). Como consequência da infecção, uma resposta inflamatória é estabelecida nos tecidos periodontais que é caracterizada pela síntese de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-12 e TNF- α , e, conseqüentemente, de metaloproteinases de matriz (MMPs). Na não resolução da infecção, uma resposta imune adaptativa é estabelecida, e as células Th17 podem ser ativadas, contribuindo para a destruição óssea indireta pela secreção de IL-6 e IL-17, que, por sua vez, aumentam a resposta inflamatória e induzem a expressão de RANKL nas células osteoblásticas, contribuindo para a perda óssea alveolar. IL = interleucina; MMP = metaloproteinase de matriz; TNF = fator de necrose tumoral.

As periodontites crônicas são caracterizadas clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsas periodontais), perda de inserção gengival e do osso alveolar. Características variáveis incluem hiperplasia ou recessão gengival, exposição da furca, mobilidade e inclinação dentárias aumentadas e esfoliação dos dentes (Lindhe e Lang, 2010).

A perda dentária pode ser a consequência final da doença periodontal em estado avançado. Os dentes que foram perdidos devido à doença não são passíveis de registro nos estudos epidemiológicos e podem levar a uma subestimação da prevalência e da gravidade da patologia. O conceito epidemiológico de *viés de seleção* (onde os indivíduos comparativamente mais saudáveis apresentar-se-ão para o exame, enquanto os mais gravemente afetados recusar-se-ão a participar ou não aparecerão devido à morbidade por si só) é, nesse contexto, aplicável ao nível dentário de cada indivíduo (visto que os dentes gravemente afetados podem já ter sido extraídos/perdidos) (Medina- Solís *et al.*, 2013; Taiwo *et al.*, 2017).

Desta forma, teste de diagnóstico e prognóstico adicionais são necessários, por exemplo, para identificar sítios em que o paciente necessita de tratamentos adicionais. Os métodos de diagnóstico para doenças periodontais podem ser divididos em três grupos: primeiro, o exame clínico, prática atualmente mais utilizada, sobretudo medidas de parâmetros clínicos, tais como: sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica (Armitage, 2000). Segundo, análises genéticas e testes laboratoriais que mensurem a bioquímica bucal, análises microbiológicas (Taba *et al.*, 2005; Giannobile *et al.*, 2009; Kinney *et al.*, 2014), e radiografias. Terceiro, as técnicas não invasivas emergentes como, por exemplo, imagens morfológicas por tomografia por coerência óptica (Kakizaki *et al.*, 2018).

2.2 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide é a artropatia inflamatória mais comum (Firestein e McInnes, 2017). É considerada uma doença sistêmica inflamatória autoimune, de etiologia desconhecida (Kurowska *et al.*, 2017), caracterizada pela evidência de transtornos da imunidade inata, respostas adaptativas contra o próprio indivíduo (autoimunidade), desregulação da rede de citocinas e a ativação de osteoclastos e condrócitos

(Firestein e McInnes, 2017) provocando uma sinovite crônica destrutiva que determina importante incapacidade funcional e perda da qualidade de vida (Kurowska *et al.*, 2017). A desregulação imune foi descoberta por Erik Waaler e descrita por H.M. Rose da década de 1940, após a descoberta de anticorpos anti-imunoglobulinas G (IgG) como fator reumatoide. O conceito de que respostas imunes contribuem com a evolução da doença tem sido defendida nos últimos 50 anos.

Sua incidência é três vezes maior em mulheres quando comparada aos homens (Zalewska *et al.*, 2013). Estudos da AR em alguns países da América Latina e África mostram uma predominância ainda maior da doença em mulheres do que em homens, com proporções de 6 a 8:1. Considerando essa maior prevalência no sexo feminino, várias teorias sugerem o possível papel do estrogênio na patogênese da doença. A maior parte das teorias se concentra no papel desse hormônio em aumentar a resposta imune (Engdahl *et al.*, 2018). Por exemplo, alguns estudos experimentais mostraram que o estrogênio pode estimular a produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α), uma citocina importante na patogênese da AR (Longo, 2013).

Acomete cerca de 0,5 a 1% da população mundial (prevalência semelhante na população brasileira). Em um estudo multicêntrico onde foi avaliado a prevalência de AR na população brasileira, foi possível verificar que a região Nordeste apresenta prevalência de cerca de 0,57% (Marques Neto *et al.*, 1993). A incidência aumenta entre os 25 e 55 anos de idade (com seu pico na quinta década – período pré-menopausa) quando em seguida atinge um platô até os 75 anos e depois diminui. A menopausa parece provocar uma piora na progressão do declínio funcional dessas mulheres (Mollard *et al.*, 2018).

A principal característica dessa doença é uma poliartrite simétrica das articulações diartrodiais com predomínio de mãos, punhos e pés, geralmente acompanhada de

rigidez pós repouso, principalmente pela manhã com duração maior que uma hora (Turesson *et al.*, 2003). O padrão inicial do envolvimento articular pode ser monoarticular, oligoarticular (≤ 4 articulações) ou poliarticular (≥ 5 articulações), geralmente em distribuição simétrica. Alguns pacientes podem apresentar a chamada artrite inflamatória indiferenciada, onde existem poucas articulações afetadas e outros sintomas característicos para serem diagnosticados como AR. Aqueles pacientes com artrite indiferenciada, onde a maioria, no futuro, será diagnosticada como AR, apresentam um número maior de articulações inchadas e sensíveis, teste positivo para o fator reumatoide sérico (FR) ou anticorpos séricos contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti- CCP) e apresentam uma maior tendência para incapacidade física (Longo, 2013).

Se trata de uma doença crônica e progressiva, que quando não realizado tratamento adequado, evolui com deformidades (por exemplo os desvios dos dedos das mãos e pés, dedos em batoeira, pescoço de cisne e em martelo) decorrentes de alterações destrutivas da unidade articular, e consequente, incapacidade e perda da função. O acometimento da coluna cervical com a subluxação atlantoaxial pode ocasionar quadros graves de tetraplegia (Smolen *et al.*, 2016).

Além das manifestações articulares, o envolvimento sistêmico pode acontecer antes mesmo do aparecimento da artrite. Os pacientes com maior tendência a desenvolver doença extra-articular apresentam uma história de tabagismo, aparecimento precoce de incapacidade física significativa e teste positiva para o fator reumatoide (FR) sérico. Sarcopenia, fadiga, nódulos reumatoides, doença pulmonar, oftalmológica, serosite e vasculite (Carmona *et al.*, 2003) são algumas das manifestações extra-articulares. Entre esse tipo de manifestação, as mais frequentemente observadas são os nódulos subcutâneos, síndrome de Sjogren secundária, nódulos pulmonares e anemia

(Smolen *et al.*, 2016).

A etiologia da artrite reumatoide ainda não está totalmente compreendida, e envolve fatores genéticos e ambientais. Sabe-se há quase 40 anos que fatores genéticos desempenham um papel no risco, gravidade e progressão da doença. Gêmeos monozigotos compartilham a AR em cerca de 12 a 15% (em comparação com 1% da população). Essa concordância acontece em cerca de 2 a 5% para gêmeos fraternos ou parentes de primeiro grau (Kaminsky *et al.*, 2009). A probabilidade de um parente de primeiro grau de um paciente compartilhar o diagnóstico de AR é 2-10 vezes maior do que na população geral. Porém, ainda não se conhece a extensão do papel da genética nos mecanismos causadores da AR, uma vez que a influência genética pode variar entre os estudos realizados, devido às interações gene-ambientais (Longo, 2013; Smolen *et al.*, 2016).

Um evento-gatilho, possivelmente infecção ou autoimunidade, inicia a inflamação nas articulações. Complexas interações entre múltiplas células imunes e suas citocinas, proteinases e fatores de crescimento mediam a destruição articular e complicações sistêmicas (Khurana e Berney, 2005). Porém ainda existem outros fatores, como o fumo e presença de infecções (Kurowska *et al.*, 2017).

Estudo defende a ideia de que a AR se inicia devido ao alto risco genético, que em combinação com marcas epigenômicas que contribuem para a hereditariedade e cronicidade da doença, associada com fatores ambientais lançam uma cascata que induzem a sinovite, e finalmente a artrite crônica destrutiva. Propõe que a AR provavelmente não compreende uma única entidade. É considerada uma síndrome com um fenótipo clínico comum decorrente de diversas vias de ação (Firestein e

McInnes, 2017).

Os alelos localizados no complexo de histocompatibilidade principal (MHC) são conhecidos como responsáveis pelo maior risco de AR. É estimado que um terço do risco genético para AR reside nesse *locus*. A maior parte do risco está associado à variação alélica do gene HLA-DRB1, que codifica a cadeia β da molécula do MHC classe II. Os alelos HLA-DRB1 associados à doença compartilham uma sequência de aminoácidos nas posições 70-74 na terceira região hipervariável da cadeia β do HLA-DR, chamada de epítipo compartilhado (EC). A portabilidade de alelos do EC está associada à produção de anticorpos anti-CCP e aos piores prognósticos da doença. Alguns desses alelos HLA-DRB1 são responsáveis por um alto risco da doença (*0401), enquanto outros conferem um risco mais moderado (*0101, *0404, *1001, *0901) (Hernández *et al.*, 2011; Longo, 2013).

Um alelo de risco que codifica uma enzima envolvida na conversão da arginina em citrulina e é considerada como importante para o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos citrulinados é o gene que codifica a peptidil arginina deiminase tipo IV (PADI4) (Holers, 2007).

Citrulinização é uma modificação pós-traducional de arginina a citrulina pela enzima peptidil arginina deiminase (Van Venrooij e Pruijn, 2000). A citrulinização ocorre em um pequeno subconjunto de proteínas, normalmente durante processos celulares normais, e é uma modificação pós-traducional especialmente proeminente durante a apoptose das células, onde promove o acesso de proteases a grandes cadeias polipeptídicas que são parcialmente desdobrado após esta modificação (Schellekens *et al.*, 2015).

A ativação das células T em um hospedeiro imunologicamente suscetível é o evento

mais provável para o início do processo reumatoide. A ativação subsequente dessas células T leva a múltiplos efeitos, entre eles a ativação e proliferação das células endoteliais e da linhagem sinovial, recrutamento e ativação de células pró-inflamatórias adicionais da medula óssea e circulação, secreção de citocinas e proteases por macrófagos e células sinoviais semelhantes e fibroblastos, além da produção de autoanticorpos (Longo, 2013; Zamanpoor, 2018).

A AR é considerada uma doença imunomediada com forte influência genética. Suas origens podem sofrer influências externas e do sistema imunológico e sua manifestação pode estar associada a superfícies mucosas, especialmente os pulmões, a mucosa oral e o trato gastrointestinal (Firestein e McInnes, 2017).

Ao mesmo tempo em que a degradação da cartilagem acontece, ocorre também a destruição celular do osso subcondral (McInnes e Schett, 2011). As células clásticas ósseas e cartilaginosas são ativadas por citocinas sinoviais (TNF- α , RANKL, Catepsina K) e catepsinas B e L, as quais aumentam a capacidade destrutiva das metaloproteinases em destruir o osso. As células T e as células localizadas no estroma da medula óssea produzem o ligante do receptor de ativação nuclear KB (RANKL), o qual é essencial para a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. O resultado do curso da doença na AR é de destruição óssea e articular progressiva com ausência de qualquer sinal de reparo em resposta à inflamação (Zamanpoor, 2018).

Essas propriedades imunológicas da sinóvia da AR estão bem caracterizadas. Macrófagos, especialmente do fenótipo M1, contribuem de maneira efetiva para a patologia, em virtude da liberação de citocinas (TNF, IL-1, IL-6, quimiocinas, MMPs, dentre outras) (McInnes e Schett, 2011). Um estudo sugere que os perfis de citocinas no líquido da lavagem articular na Artrite inicial são ricos em IL-4, IL-13 e IL-15,

enquanto que na artrite estabelecida tem características de Th1 e Th17 (Raza *et al.*, 2005).

É caracterizada pelo acúmulo de infiltrado inflamatório leucocitário na membrana sinovial, e é mediada por PGE2, TNF- α , IL1- β , IL-12, IL-17, IL-18, IL-33, fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e RANKL, sendo todos encontrados no fluido sinovial e envolvidos na sinovite e destruição da arquitetura articular (McInnes e Schett, 2011). Resumindo, as MMPs medeiam o dano direto a cartilagem ou promovem a ativação dos condrócitos e o catabolismo do tecido através da liberação de citocinas, conjuntamente com os macrófagos (IL-1, IL-17 e TNF). O dano ósseo surge de interações mais complexas envolvidas na maturação de precursores dos osteoclastos, mediados principalmente por RANKL e TNF (McInnes e Schett, 2011).

A artrite reumatoide está associada à presença de várias classes de anticorpos. O primeiro descrito foi o fator reumatoide (FR), autoanticorpos que reagem primeiramente com imunoglobulinas (Ig) G. Embora encontrado em mais de 75% dos pacientes com AR, o FR não é específico para o diagnóstico desta doença, uma vez que está presente em diversas doenças crônicas inflamatórias, infecciosas e autoimunes, sendo ainda encontrado, embora em pequena porcentagem, em indivíduos saudáveis (Holers, 2007).

A falta de especificidade do FR estimulou a busca por outros sistemas de autoantígeno / autoanticorpos que demonstrem maior sensibilidade e especificidade. Recentemente, uma classe de autoanticorpos demonstrou um alto grau de sensibilidade e especificidade para AR: o sistema de anticorpos antikerina / antifilagrina (peptídeos citrulinados) (Schellekens *et al.*, 2015).

O teste peptídeo citrulinado anti-cíclico 2 (anti-CCP2) contém um número

desconhecido de sequência (s) de péptidos citrulinados. Anticorpos anti-CCP tem uma sensibilidade de 60% a 75% com uma especificidade de 95% a 98% (Lee e Schur, 2003; Matsui *et al.*, 2006). Um pequeno subgrupo de pacientes com outras doenças, incluindo a síndrome de Sjögren e lúpus eritematoso sistêmico também demonstraram a presença de anticorpos anti-CCP2 (Sauerland *et al.*, 2005).

Os anticorpos anti-CCP podem fornecer importantes informações. São encontrados em pacientes que tem FR negativo, em indivíduos que apresentam apenas alguns meses de sintomas, bem como nas formas mais graves da doença. Os anticorpos anti-CCP são mais intimamente associados com o epítipo compartilhado HLA-DR do que o FR (Irigoyen *et al.*, 2005).

Não existe teste único que confirme o diagnóstico da artrite reumatoide. Testes iniciais laboratoriais devem incluir hemograma, fator reumatoide, velocidade de hemossedimentação e proteína-C reativa, e mais recentemente o anticorpo peptídeo anticíclico citrulinado (anti CCP) apresenta sensibilidade similar ao fator reumatoide, porém maior especificidade (Smolen *et al.*, 2017; Zamanpoor, 2018). Para o diagnóstico da AR, atualmente tem-se utilizado o critério de classificação do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo (2010).

Os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) permitem quantificar a melhora clínica através da contagem de articulações edemaciadas e dolorosas, provas de atividade inflamatória, pontuação no questionário da capacidade funcional (HAQ), avaliação global do médico quanto à atividade da doença, e avaliação global do paciente em relação à dor e à atividade da doença (Smolen *et al.*, 2017).

Os fumantes apresentam proteínas com maior grau de citrulinação no fluido broncoalveolar do que os indivíduos que não fumam. Portanto, estudos mostram que a longa exposição ao tabaco pode induzir a citrulinação de proteínas celulares nos

pulmões e aumentar a expressão de um neopeptídeo capaz de induzir a autorreatividade (Klareskog *et al.*, 2006; Di Giuseppe *et al.*, 2014; Sivas *et al.*, 2018). Além da predisposição genética, um conjunto de fatores ambientais tem sido descritos na patogênese da AR, entre eles o fumo e presença de infecções, como o vírus Epstein-Barr (EBV) (Ball *et al.*, 2015). Diversos estudos mostram que o tabagismo confere um risco relativo de 1,5-3.5 para o desenvolvimento de AR (Klareskog *et al.*, 2006; Sivas *et al.*, 2018).

Para definição de atividade da artrite reumatoide utiliza-se o indicador de atividade de doença, DAS28. Este método é de grande utilidade na prática clínica, uma vez que decisões terapêuticas são tomadas com base neste resultado e comparadas aos dados do início do tratamento. Assim, os critérios de resposta ao tratamento baseiam-se neste indicador, que é composto da avaliação de 28 articulações, onde são avaliadas o número de articulações doloridas e edemaciadas, avaliação global realizada pelo médico e a velocidade de hemossedimentação ou proteína C reativa (Van Riel e Renskers, 2016) Este teste permite classificar a doença como em remissão ou atividade leve, moderada ou intensa. Seu cálculo está facilmente acessível através de aplicativos, softwares e sites (Van Tuyl *et al.*, 2009).

Outros índices possuem a mesma finalidade, mudando algumas variáveis. Depois do DAS28, o índice mais utilizado é o Índice Simplificado de Atividade da Doença (SDAI) que, além dos critérios utilizados no DAS28 e PCR, utiliza também a avaliação global pelo médico-assistente. Outro índice é o Índice Clínico da atividade da doença, que considera as mesmas variáveis do SDAI excluindo-se a PCR (Muñoz *et al.*, 2017).

Um avanço importante na avaliação dos pacientes portadores de AR é a definição de quais pacientes tem o pior prognóstico, para que assim, possam ser indicados tratamentos mais específicos para cada caso, prevenindo danos articulares

irreversíveis. Grande número de articulações acometidas, presença de manifestações extra-articulares da doença, fator reumatoide sérico (FR) ou anticorpo antipeptídeo citrulina (anti-CCP) positivos, persistência de níveis elevados de PCR, presença de erosões ósseas nos exames de imagem, resultado ruim nos questionários de qualidade de vida e presença de HLA DR4 são fatores de pior prognóstico (Sokka *et al.*, 2007).

As principais sociedades de reumatologia, assim como os órgãos governamentais da maioria dos países do mundo, tentam estabelecer consensos e protocolos direcionando os critérios diagnósticos e tratamentos para a AR. O tratamento desta doença tem evoluído e mudado rapidamente nas últimas décadas, com terapias cada vez mais específicas e voltadas para a neutralização de mediadores químicos específicos, envolvidos na sua fisiopatologia. Com os resultados dessas terapias alvo-específicas, os objetivos no tratamento da AR deixaram de ser apenas a melhora dos sintomas, mudando para a busca da remissão da doença, que é rara. Foi mostrado que a aplicação de terapia agressiva com anti-inflamatórios dentro dos primeiros meses de sintomas são benéficos para a desaceleração da doença (Nell *et al.*, 2004). As pesquisas das três últimas décadas têm se concentrado no papel das citocinas e dos linfócitos T. Estudos sobre a ação eficaz de agentes de depleção de células B, como o rituximabe – anti CD-20, voltaram a atenção dos estudos para os linfócitos B, embora os mecanismos de sucesso ainda não sejam inteiramente conhecidos (Edwards *et al.*, 2004; Toh e Miossec, 2007; Rogier *et al.*, 2015).

Células Th17 são o componente celular patogênico dominante nas doenças inflamatórias autoimunes, inclusive da AR (Heo *et al.*, 2010). A identificação de IL-17 como uma potente citocina pró-inflamatória fez com que fosse dada uma maior

atenção das células Th17 na AR e em outras doenças imunomediadas(Yan *et al.*, 2014).

Atualmente estão disponíveis drogas antiinflamatórias não esteroidais, glicocorticoides e DMARDs de origem sintética, como metotrexato ou DMARDs alvos, como inibidores de janus quinase (JAK) ou de origem biológica (DMARD biológicos), tais como inibidores de fator de necrose tumoral (TNF), modificadores de coestimulação, inibidores da interleucina-6 e depresores de células B (Chatzidionysiou *et al.*, 2017). A recomendação é o uso inicial de metotrexato em monoterapia ao invés da combinação terapêutica com DMARD e inclusão de glicocorticoides como terapia adjuvante. Em casos onde o metotrexato seja contra-indicado, as drogas a serem utilizadas são o leflunomida ou sulfasalazina (Smolen *et al.*, 2017). Caso a meta de tratamento não seja alcançada dentro de 3-6 meses, outros DMARDs devem ser considerados (DMARD alvo ou biológico) (Smolen *et al.*, 2017).

O Colégio Americano de Reumatologia (ACR-EULAR 2010) recomenda como primeiro biológico a ser utilizado, qualquer um dos anti-TNFs, justificando esta indicação principalmente pela segurança comprovada, sendo este grupo o de maior tempo em uso no tratamento da AR. Porém outros consensos e associações utilizam outros critérios na indicação de primeira escolha no uso de biológicos.

Com os conhecimentos atuais de diagnóstico e manejo terapêutico, pode-se minimizar a destruição articular, deformidade e morte prematura, mudando assim seu prognóstico.

2.3 DOENÇA PERIODONTAL E ARTRITE REUMATOIDE: IMUNOPATOGENESE ASSOCIADA

A DP e a AR dividem algumas características. Ambas são doenças crônicas inflamatórias, com influências genéticas e ambientais, e desequilíbrio do sistema imune, levam à destruição dos tecidos conjuntivo e duro (Laugisch *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2018), apresentam osteoclasia e aumento de citocinas inflamatórias. O link entre essas patologias surgiu em 1982, e tem sido enfatizado na literatura recente (Li *et al.*, 2017). Sua etiopatogenia tem uma diferença essencial: enquanto uma é provocada por autoimunidade, a outra é provocada por patógenos bacterianos, sendo ambas imunologicamente mediadas (Mercado *et al.*, 2001).

Existe uma alta associação entre periodontite e artrite reumatoide, onde cerca de 94% dos pacientes portadores de AR possuem periodontite, sendo 46% com periodontite severa (Monsarrat *et al.*, 2014). Um estudo relatou que a frequência de AR é significativamente maior em indivíduos com doença periodontal que em indivíduos sem periodontite (3,95% x 0,66%) (Mercado *et al.*, 2000). Outros estudos relataram maior profundidade de sondagem periodontal e pior nível de inserção clínica em indivíduos com AR (Mercado *et al.*, 2001). Por um lado, é provável que os pacientes com AR encontrem mais dificuldades em obter uma boa higiene bucal por causa de dores nas articulações ou limitação funcional (Ishi *et al.*, 2008; Pischon *et al.*, 2008), por outro lado, tem-se a hipótese de que a periodontite pode ser um fator de risco ou um fator agravante para a AR (Longo, 2013).

Existem relatos de maior índice de sangramento gengival em paciente portadores de AR sem periodontite quando comparados com indivíduos saudáveis, também sem periodontite (Mirrielees *et al.*, 2010; Äyräväinen *et al.*, 2018).

Pesquisa realizada com 95 pacientes portadores de AR, 44 sem AR mas com doença

periodontal e 36 saudáveis avaliou amostras de placa subgengival para *P. gingivalis* e concluiu que a gravidade da periodontite está relacionada à gravidade da AR (De Smit *et al.*, 2012). Outro estudo relatou que pacientes com AR apresentaram mais periodontite moderada e severa que o grupo controle. Relatou ainda maior severidade da doença periodontal em pacientes soropositivos para FR e CCP, embora não tenha sido encontrada associação entre a severidade das duas doenças (Dissick *et al.*, 2010).

A *Porphyromonas gingivalis* é considerada a ligação entre a periodontite e a artrite reumatoide, uma vez que possui a capacidade de induzir a citrulinação através da PAD (peptidil arginina deiminase) (Laugisch *et al.*, 2016; Potempa *et al.*, 2017; Courbon *et al.*, 2019).

Konig e colaboradores confrontaram esse paradigma e investigaram outros possíveis mecanismos subjacentes à inflamação periodontal e relataram que o fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica apresentavam um microambiente antigênico similar aos das articulações de pacientes com artrite reumatoide, bem como a presença de várias citocinas. Surpreendentemente, quando as mesmas estirpes periodontopatogênicas foram incubadas com neutrófilos, apenas a *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) causou citrulinação proteica (Konig *et al.*, 2016) .

Apesar das divergências com relação a prevalência, vários autores tem observado uma maior severidade da periodontite em pacientes com AR, onde até quase 50% destes apresentam a periodontite de uma forma severa (Dissick *et al.*, 2010; Monsarrat *et al.*, 2014). A infecção por *Porphyromonas gingivalis*, uma conhecida bactéria periodontopatogênica é a primeira similaridade entre as doenças (Li *et al.*, 2017). Essa bactéria possui a enzima endógena peptidylarginine deiminase (PAD) que é responsável pela citrulinação de resíduos de arginina, um dos primeiros passos

cruciais no desenvolvimento da AR (Laugisch *et al.*, 2016).

Citrulinação é o processo da conversão enzimática de arginina para citrulina. É um processo fisiológico que acontece no contexto de inflamação e morte celular. A citrulinação via ativação da PAD requer, em mamíferos, a mobilização de cálcio intracelular livre. Peptídeos citrulinados podem desenvolver a resposta do anticorpo antipeptídeo citrulinado.

A destruição inflamatória do tecido conjuntivo e osso circundante é característica tanto da periodontite, como da AR. Essa destruição é resultado das ações de citocinas cooperativas, espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, juntamente com outros mediadores pró-inflamatórios.

Vários marcadores inflamatórios relacionados à periodontite e a doenças sistêmicas podem ser detectados na saliva. Estes incluem não apenas interleucinas, como fator de necrose tumoral, matriz metaloproteinases 8 e 9, dentre outras (Giannobile *et al.*, 2009).

Existe uma preocupação com o uso clínico de biomarcadores salivares como adjuvante para identificar a doença periodontal uma vez que há possibilidade de que a inflamação sistêmica resultante de várias doenças inflamatórias crônicas possa confundir a utilidade dos biomarcadores. Essa preocupação surge porque a saliva total contém componentes derivados do soro e mediadores de inflamação, colapso do colágeno ou remodelação óssea que são elevados no soro de pessoas com condições como artrite reumatoide (AR) e podem aparecer na saliva (Giannobile *et al.*, 2009; Mirrieles *et al.*, 2010).

Mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-10 e INF- γ demonstraram estar elevados nas articulações inflamadas e no soro de pacientes com AR (Marti *et al.*, 2009) e por isso é possível que pessoas com AR ou outras artrites inflamatórias

possam ter níveis aumentados desses potenciais biomarcadores em sua saliva (Mirrielees *et al.*, 2010). A inflamação dos tecidos periodontais pode produzir quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1b, IL-6 e TNF- α (Saini, 2011). Outras citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas no fluido sinovial da AR (como IL-1b, IL-8, IL-15, IL-17), bem como o fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa do ligante de células B ativadas (RANKL), sendo similares às citocinas associadas à inflamação na DP (Mirrielees *et al.*, 2010).

Existem dados limitados para a avaliação de marcadores inflamatórios (IL- 1 β , IL-6 e IL-10) em indivíduos com AR recebendo terapia anti-reumática e indivíduos saudáveis sem periodontite. Maiores níveis de IL-1 β foram encontrados em indivíduos com AR (Han e Reynolds, 2012). Níveis mais altos de TNF- α foram encontrados na saliva, mas não o soro de indivíduos com AR em comparação com indivíduos saudáveis (Mirrielees *et al.*, 2010).

Han e colaboradores (Han e Reynolds, 2012) realizaram uma revisão sistemática e metanálise para avaliação dos efeitos de agentes anti-reumáticos nos parâmetros periodontais e marcadores inflamatórios. Verificaram que com exceção da IL- β , as avaliações dos biomarcadores foram limitadas a um único estudo. Significativamente níveis mais baixos de IL- β (Mirrielees *et al.*, 2010), menores níveis de TNF- α (Mirrielees *et al.*, 2010) e maiores níveis de IL-4 (Bozkurt *et al.*, 2006) foram relatados na AR e sujeitos saudáveis com periodontite.

Um estudo para determinar a presença de IL-6 na saliva de pacientes saudáveis e portadores de AR concluiu que os pacientes com AR apresentaram maior tendência a desenvolver DP que os controle, com menor fluxo salivar e maiores níveis de IL-6 na saliva (Silvestre-Rangil *et al.*, 2017). Ao avaliarmos a presença de citocinas séricas e salivares de pacientes portadores de AR, foi possível verificar nível elevado, com

significância estatística em 6 (TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-10, IL-2 e IL-4) das 7 interleucinas avaliadas. A única que não apresentou diferença estatística na saliva foi a IL-17, provavelmente por estar intimamente ligada à doença AR (soro) e não à DP (saliva). A IL-10 mostrou maiores níveis salivares em pacientes portadores de AR. Essa citocina anti-inflamatória tem grande potencial para inibir a reabsorção óssea, sendo sugerida como uma estratégia terapêutica para a DP e outras doenças que provocam perda óssea (Zhang *et al.*, 2014). Pode contribuir para a manutenção da massa óssea por meio da inibição da reabsorção óssea osteoclástica e da regulação da formação óssea osteoblástica (Zhang *et al.*, 2014). Devido a sua ação protetora ao periodonto, polimorfismos em regiões promotoras do gene da IL-10 podem conferir maior susceptibilidade para a DP (Zhang *et al.*, 2018).

Biomarcadores inflamatórios na saliva e no soro de pacientes portadores de AR e DP também foram avaliados em outro estudo (Äyräväinen *et al.*, 2018) que relata concentrações séricas elevadas de MMP-8 (metaloproteinase) e IL-6 em pacientes com AR crônica e concentrações salivares elevadas de níveis de MMP-8 em pacientes com AR juvenil, refletindo aumento da inflamação periodontal.

O tratamento local periodontal parece afetar apenas o estado clínico periodontal, diminuindo a atividade da doença reumatológica (DAS28) (Okada *et al.*, 2013; Zhao, X. *et al.*, 2018), e não os níveis circulantes de IL-6, fator de necrose tumoral-alfa ou proteína C-reativa que estão associados à AR (Li *et al.*, 2017).

Embora a AR e DP dividam algumas características patogênicas e alguns estudos sugeriram que o tratamento com agentes anti-reumáticos, especialmente os inibidores de TNF- α possam reduzir a destruição periodontal, mais estudos devem ser realizados para determinar a eficácia desses medicamentos na redução da inflamação periodontal e biomarcadores inflamatórios em indivíduos com AR e periodontite (Han

e Reynolds, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil clínico e imunológico da doença periodontal em pacientes com artrite reumatoide e a relação das citocinas com as características clínicas das duas doenças.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os parâmetros clínicos da periodontite nos indivíduos portadores de artrite reumatoide e saudáveis
2. Caracterizar os pacientes com Artrite reumatoide de acordo com a gravidade da doença periodontal;
3. Determinar os níveis séricos e salivares de citocinas Th1, Th2 e Th17 em pacientes portadores de periodontite e artrite reumatoide.
4. Associar a dosagem de citocinas com a atividade da artrite reumatoide e da doença periodontal

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo clínico transversal com indivíduos saudáveis e portadores de artrite reumatoide para avaliação da influência da doença periodontal nos marcadores clínicos e perfil de citocinas da artrite reumatoide.

O estudo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira etapa contou com a avaliação clínica periodontal através de parâmetros clínicos. A segunda etapa foi a avaliação dos níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 contidas no soro do sangue periférico e na saliva dos pacientes saudáveis e com artrite reumatoide.

O estudo foi composto de dois grupos: artrite reumatoide (AR), formado por pacientes portadores de artrite reumatoide de acordo com os critérios de diagnóstico propostos pelos Colégio Americano de Reumatologia/Liga Européia contra o Reumatismo (2010) e controle (C), formado por indivíduos saudáveis pareados para idade (± 5 anos) com o grupo AR e todos do sexo feminino. Todos os pacientes foram provenientes do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE.

O tamanho da amostra do grupo AR foi baseado na prevalência estimada de artrite reumatoide, que varia de 1% a 2% de acordo com o Johns Hopkins Arthritis Center (2009). O intervalo de confiança estabelecido foi 95%, com erro amostral de 5%, e uma prevalência estimada de 1,0%, resultando em uma amostra de no mínimo $n = 86$ sujeitos. Desta forma, considerando-se eventuais perdas, foram avaliados 120 pacientes portadores de artrite reumatoide e 60 indivíduos saudáveis. Dentro o grupo AR, 60 pacientes faziam uso de DMARDs (drogas antirreumáticas modificadoras de doença) sintéticos e 60, de DMARDs biológico. Para os critérios de inclusão foram definidos que seriam incluídos na pesquisa pacientes do sexo feminino com idade acima de 18 anos para ambos os grupos e portadores de artrite reumatoide de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo (2010) para o grupo AR saudáveis, sem sinais de AR ou qualquer outra desordem imunologicamente mediada ou autoimune para o grupo controle. Para os critérios de exclusão, foi definido que pacientes gestantes, tabagistas, com presença de menos de 8 dentes, com tratamento periodontal realizado há menos de 6 meses e

antibioticoterapia nos últimos 3 meses seriam excluídos da pesquisa.

Todos os dados sociodemográficos, avaliação reumatológica e periodontal, além das coletas de sangue e saliva foram realizados no mesmo momento.

4.2 AVALIAÇÃO REUMATOLÓGICA

Foram avaliados os pacientes cadastrados no Serviço de Reumatologia do HC-UFPE e com diagnóstico de AR, realizado por um reumatologista de acordo com os critérios da Colégio Americano da Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo (2010) onde foi aplicado um questionário estruturado para obtenção dos dados sociodemográficos, dados médicos e história da doença atual (apêndice 1).

Para avaliação da atividade da artrite reumatoide foi utilizado o DAS 28 (índice de atividade de doença) caracterizado pelos seguintes itens: número de articulações dolorosas (0-28), número de articulações edemaciadas (0-28), avaliação global do paciente (0-100) e o valor da velocidade de hemossedimentação (VSH) e ou proteína C reativa (PCR). Os valores foram calculados através do aplicativo DAS28 ACR-EULAR para smartphones e classificados em atividade alta, moderada, baixa ou remissão.

4.3 AVALIAÇÃO PERIODONTAL

Para avaliação clínica da condição periodontal, todos os dentes foram sondados em seis sítios por dente (exceto os terceiros molares) usando uma sonda manual milimetrada tipo Universidade Carolina do Norte (PCPUNC 15® Hu-Friedy). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados e registrados:

- Índice de Sangramento Gengival: a sonda periodontal foi inserida 1-2mm intrasulcular e percorrida da face distal para a mesial. Foram registradas ausência (escore 0) e presença (escore 1) de sangramento da margem da gengiva.

- Recessão Gengival (RG): medida como a distância da junção amelocementária (JAC) até a gengiva marginal, em milímetros.

- Profundidade de Sondagem (PS): a distância entre a margem da gengiva e a porção mais apical da bolsa ou sulco, medida em milímetros.

- Sangramento à sondagem (SS): foi registrada a presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 30 segundos transcorridos da

profundidade de sondagem.

– Nível de Inserção Clínica (NIC): medida que corresponde à distância da junção amelocementária (JAC) até a porção mais apical do sulco ou bolsa periodontal, no ato da sondagem periodontal. Obtida através do somatório das medidas de profundidade de sondagem e recessão gengival.

Foram considerados pacientes portadores de periodontite aqueles com profundidade de sondagem e nível de inserção clínica ≥ 4 mm em dois ou mais sítios examinados, conforme os critérios estabelecidos pela AAP (Academia Americana de Periodontologia, 1999). Os dados descritos foram anotados em um periograma específico para tabulação e análise estatística (anexo B). De acordo com a severidade da doença periodontal foi classificada como: PS = 4 mm (leve); 5 e 6 mm (moderada) e ≥ 7 mm (Severa), sendo também levado em consideração a perda de inserção clínica e sangramento a sondagem. A extensão da doença periodontal foi classificada como localizada ($\leq 30\%$ dos sítios envolvidos) e generalizada ($> 30\%$ dos sítios envolvidos)(Armitage, 2000; Periodontitis, 2015).

4.4 COLETA DE SANGUE E SALIVA

No momento da coleta de sangue, todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 2). As amostras de sangue foram coletadas por um pesquisador treinado em flebotomia para realização do teste de velocidade de hemossedimentação (VSH) - 1ª hora. Foi utilizado o método de Westergren, recomendado pelo International Committee for Standardization in Hematology. Esta técnica consiste na colocação de sangue venoso anticoagulado com citrato de sódio a 3,8% (relação 4:1) em um tubo graduado, com 200mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro interno. O tubo é preenchido até a marca zero e deixado na posição vertical por uma hora. A VHS, expressa em mm/h, é a distância do menisco até o topo da coluna de eritrócitos. Outro tubo, sem anticoagulante, foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro (Centrífuga Fanem Excelsa® 2206I, São Paulo, Brasil) (Bedell e Bush, 1985).

As amostras de saliva foram coletadas durante a avaliação do fluxo salivar em repouso (FSR), através do método de *spitting* (Falcão *et al.*, 2013), sempre no período da manhã. O paciente foi orientado a não ingerir alimentos, beber ou fumar por um período mínimo de 90 minutos antes da coleta. Após deglutir, o paciente expeliu em

um recipiente plástico toda a saliva produzida durante o período de 5 minutos. A taxa de FSR é determinada pelo valor total dividido por 5, sendo expressa em mililitros por minuto. Foi considerado hipossalivação os resultados menores que 0,1ml/min para FSR. Todas as amostras (soro e saliva) foram armazenadas em freezer na temperatura -20° C até o momento da dosagem de citocinas.

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para a detecção de citocinas no soro e na saliva dos pacientes foi utilizada a técnica do *Cytometric Beads Array* – CBA. Essa técnica foi utilizada para mensurar quantitativamente as citocinas IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, onde utiliza esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescências, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal FL-2. Todo o protocolo foi seguido conforme as orientações do fabricante. Os dados foram armazenados em Excel para posterior análise estatística. Os níveis de detecção estabelecidos foram de 18,9 pg/mL para IL-17A, 3,7 pg/mL para INF- γ , 3,8 pg/mL para TNF- α , 4,5 pg/mL para IL-10, 2,4 pg/mL para IL-6, 4,9 pg/mL para IL-4 e de 2,6 pg/mL para IL-2, de acordo com o estabelecido pelo fabricante.

4.6 OBSERVAÇÕES DA ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados e analisados por meio dos softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010, considerando nível de significância de 5% e confiança de 95%. Para verificar a existência de associação foram utilizados os Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas, para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Comparação com dois grupos foi aplicado o Teste t Student (Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal) e entre grupos pareados, o Wilcoxon (Não Normal).

5 RESULTADOS -

Relationship of periodontitis and rheumatoid arthritis with salivary and serological cytokine levels

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to describe the clinical pattern and evaluate the levels of cytokines in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis. **Materials and methods:** One hundred and eighty women were classified into two groups: rheumatoid arthritis (n = 120) and healthy control (n = 60). A complete periodontal examination was performed and the levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF- γ and TNF were measured in serum and saliva. AR activity was determined using the disease activity score - 28. **Results:** In the rheumatoid arthritis group, the frequency of moderate / severe periodontitis was higher when compared to the control group (p = 0.037). When evaluating the two groups with periodontitis, we found higher values of all cytokines in the serum of patients with rheumatoid arthritis than in systemically healthy individuals. **Conclusion:** The present study suggests that patients with rheumatoid arthritis have more severe periodontitis. Rheumatoid arthritis and periodontitis manifest themselves in different ways in serum and saliva.

Key words: Periodontitis. Rheumatoid arthritis. Interleukins. Cytokines.

INTRODUCTION

Although periodontitis is a multifactorial disease that is deeply influenced by

environmental and microbial factors that regulate its progression and severity, shifts in cytokines profile may also have a significant influence on this process (Wong, Ooi, Pulikkotil, & Naing, 2018). The balance among cytokines seems to play a pivotal role in the immune response so that this may lead to protective immunity or tissue destruction according to the way it is structured (Z. Zhang, Zheng, & Li, 2018). In this context, regulating the expression of some key cytokines in periodontitis has been suggested as a treatment for periodontal disease, thereby changing its clinical course (Q. Zhang et al., 2014).

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory systemic disease with unknown etiology, characterized by chronic destructive synovitis that determines important functional incapacity and loss of quality of life (Kurowska, Kuca-Warnawin, Radzikowska, & Maśliński, 2017). Its etiology has not yet been completely understood and involves both genetic and environmental factors (Smolen, Aletaha, & McInnes, 2016). Complex interactions among multiple immune cells and their cytokines, proteinases, and growth factors mediate joint destruction and systemic complications (Khurana & Berney, 2005).

RA and periodontitis share some pathogenic characteristics: both are chronic inflammatory diseases that are subject to genetic and environmental influences. When these aspects are associated, they promote an imbalance of the immune system that culminates in the destruction of connective and bone tissues (Kobayashi et al., 2018; Laugisch et al., 2016), increase in inflammatory cytokines (Li et al., 2017), and functional disability (RA) (Monsarrat et al., 2014). Saliva has been characterized as a mirror of the immunopathogenesis of periodontitis by the presence of markers such as interleukins, tumor necrosis factor, matrix metalloproteinases (MMPs) 8 and 9 (Ghallab, 2018; Giannobile et al., 2009; Gümüş, Nizam, Lappin, & Buduneli, 2014). In RA, the whole saliva may also contain inflammatory biomarkers derived from the serum originated in inflammatory cells, the collapse of collagen or bone remodeling (Äyräväinen et al., 2018; Giannobile et al., 2009).

Individuals with RA or other types of inflammatory arthritis may have increased levels of these potential biomarkers in their saliva (Mirrieles et al., 2010). These same cytokines are also crucial in the development and progression of the periodontitis, and so are IL-17A and the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) cells (Mirrieles et al., 2010; Saini, 2011; Souto, Queiroz-Junior, de Abreu, Costa, & Mesquita, 2014), since they can increase bone resorption of the periodontal ligament

(Abbas, 2015; Gümüş et al., 2014).

Therefore, it is understood that periodontitis may not be an isolated chronic oral inflammatory disease only, but may also be subject to the influence of the autoimmune component triggered by processes mediated by inflammation (Li et al., 2017). In the same way, high cytokine levels in saliva secondary to periodontitis may circulate through the blood vessels, eventually aggravating systemic diseases such as RA. Therefore, once the course of periodontitis and rheumatoid arthritis share mechanisms of pathogenesis related to cytokines, the aim of this study was to describe the clinical and immunological pattern of the standard cytokines Th1, Th2 and Th17 of patients with periodontitis and rheumatoid arthritis.

METHODOLOGY

Study Design

A translational study/research was conducted with individuals with rheumatoid arthritis to evaluate the influence of periodontal disease on the clinical and immunological markers of the disease.

The size of the RA Group sample was based on the estimated prevalence of rheumatoid arthritis, which ranges from 1 to 2%, according to the Johns Hopkins Arthritis Center (2009). The interval of confidence of 95% was established, with a sampling error of 5%, an estimated prevalence of 1.0%, resulting in a sample with a minimum of n=86 subjects. Therefore, considering eventual losses, 120 patients with rheumatoid arthritis, and 60 healthy individuals were evaluated.

The groups were composed of women of an age equal to or older than 18 years, attended or follow-up by the HC-UFPE Rheumatological Service in the period from September 2017 to August 2018. The patients were divided into two groups in the proportion of 2:1 according to their clinical condition: rheumatoid arthritis (RA, n=120), composed of patients with RA, following the classification criteria of the American Association of Rheumatology (1987) (Arnett et al., 1988) and control (C, n=60), composed of women without known autoimmune or immunologically mediated disease. Afterward, these two groups were subdivided into four sub-groups: RA with periodontitis (RA/PO), RA without periodontitis (RA), control with periodontitis (C/PO), and control without periodontitis (C). Excluded from the study were pregnant women, smokers, those with fewer than eight teeth, who had undergone periodontal treatment

less than six months previously, antibiotic therapy concluded within the previous three months, diabetics or those who wore orthodontic appliances.

Clinical Evaluation

Rheumatological Evaluation

A rheumatologist evaluated the patients in the RA Group for assessing disease activity through of the disease activity score 28 (DAS 28). The values were calculated using of the DAS28 ACR-EULAR app for smartphones, and the patient was considered in remission if the value were lower than 2.6; between 2.6 and 3.2 with light activity; higher than 3.2 and lower than or equal to 5.1, moderate activity; and higher than 5.1 with intense activity of AR.

Blood Collection

Immediately afterward, blood samples were collected in a dry tube without an anticoagulant agent. The blood was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes (Centrifuge Fanem Excelsa® 2206I, São Paulo, Brazil) to separate the serum. Blood samples were also collected to perform the erythrocyte sedimentation rate (ESR) dosages. All the participants signed the Free and Informed Term of Consent at the time of blood collection.

Saliva Collection

The saliva samples were collected during the evaluation of resting salivary flow utilizing the spitting method (Falcão, da Mota, Pires, & Bezerra, 2013). After swallowing, the patient spat all the saliva produced during the period of 15 minutes into a plastic receptacle. The resting saliva flow rate (SFR) was determined by the total value, divided by 15, and was expressed in milliliters per minute. Hyposalivation was considered for SFR when results were lower than 0.1ml/min. All the samples (serum and saliva) were stored in a freezer at a temperature of -20°C up to the time when cytokine dosage was performed.

Right after blood and saliva collections, the patients were submitted to a sociodemographic questionnaire on quality of life (Health Assessment Questionnaire - HAQ).

Periodontal Evaluation

After this periodontal evaluation was performed, in which all the teeth were

probed at six sites (except the third molars), using a manual millimetric probe of the North Carolina University type (PCPUNC 15® Hu-Friedy). The clinical parameters evaluated were the gingival bleeding index, level of gingival retraction, probing depth (PD), and clinical attachment loss (CAL). Patients were considered to have periodontitis when they had a probing depth ≥ 4 mm in two or more sites examined and the presence of bleeding on probing, following the criteria established by the AAP (American Academy of Periodontology, 1999) (Wiebe & Putnins, 2000).

Cytokine Dosage

To detect the cytokines in the serum and saliva of the patients, the *Cytometric Beads Array* – CBA technique was used to measure the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A. The assay uses polystyrene spheres with different intensities of fluorescence, covered with specific antibodies for the above-mentioned human cytokines in the Accuri flow cytometer (BD, New Jersey, USA). The entire protocol was carried out in accordance with the manufacturer's instructions.

Statistical Observations

The data were tabulated and analyzed by means of the STATA/SE 12.0 and Excel 2010 software programs, considering the level of significance of 5% and confidence interval of 95%. To verify a possible association, the Chi-square and Exact Fisher tests were used for the categorical variables. For the quantitative variables, the Kolmogorov-Smirnov normality test was used. For comparison of two groups, the Student's-*t* test (Normal Distribution) and the Mann-Whitney (Not Normal) tests were applied. Between paired groups, the Wilcoxon (Not Normal) test was applied.

RESULTS

The mean age was of 48 ± 12.12 years, ranging from 18 to 68 years of age. When we evaluated the clinical periodontal characteristics, we verified a higher mean value for PD (RA - 2.06 ± 0.43 , C - 1.90 ± 0.31 , $p=0.008$) and CAL (RA - 2.44 ± 0.83 , C - 2.16 ± 0.68 , $p=0.007$) in Group RA. The mean resting salivary flow value was shown to be more reduced in the patients with RA, but no differences were observed relative to the prevalence of gingivitis and periodontitis, and the percentage of surfaces with bleeding (Table 1). No association of the clinical findings of RA (disease activity, time of diagnosis, and functional incapacity) with the frequency of periodontitis was found

(Table 2).

RA activity, characterized by the DAS28, was not associated with the serological and salivary levels of cytokines Th1, Th2, and Th17. There was no difference with respect to the levels in relation to the activity of the disease (Table 3).

In general, cytokines show different levels in serum and saliva, according to the presence of RA and periodontitis, with higher levels being shown in the serum of patients with RA and in the saliva of systemically healthy individuals.

Table 4 shows the serological and salivary levels of cytokines in patients classified according to the presence of periodontitis and RA. When the two groups with periodontitis (RA/PO and C/PO) were evaluated, higher values of all the cytokines were found in the serum of patients with RA than in that of systemically healthy individuals. In saliva, these values were inverted and were higher in the control group. This finding was repeated when we evaluated the individuals without periodontitis (RA/PO and C/PO), so that higher levels of all the cytokines were also observed in the serum of patients with RA (with the exception of IL-2), and in the saliva of systemically healthy individuals. Attention is drawn to the salivary levels of NF- γ , which were 4.52 times higher in the healthy controls than in the individuals with RA.

DISCUSSION

Recent lines of evidence have suggested that periodontal disease and rheumatoid arthritis share two-way mechanisms of pathogenesis, in which periodontitis appears to aggravate the systemic condition, and RA - when not controlled - appears to increase the severity of the oral condition (Araújo, Melo, & Lima, 2015; Bello-Gualtero et al., 2016; Chou, Lai, Chen, Lin, & Chen, 2015). The aim of the present study was to evaluate the clinical and immunological characteristics of patients with rheumatoid arthritis and compare them with those of systemically healthy individuals. To the best of our knowledge, this study represented the most significant RA sample, making it possible to evaluate this unique pattern of bilateral influence. Patients with RA were observed to present more severe periodontitis, characterized by higher mean PD and CAL values, as well as higher serological levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, and INF- γ , and lower salivary levels of these same cytokines.

Although the severity of periodontitis did not appear to be influenced by the

activity of RA, studies have reported that up to 75% of patients with RA presented an association with this oral disease (de Jong, Bakker, Everts, & Smit, 2017; de Smit et al., 2012; Mobini, Maboudi, & Ali Mohammadpour, 2017). However, despite the fact that the present study had observed a similar prevalence of periodontitis between RA patients (75%), this was not statistically higher than the value observed in the controls. While some have reported that there was no association between the diseases, patients with RA presented more severe forms of periodontitis, characterized by higher probing depth and clinical attachment level values, similar to those reported by Pischon (Monsarrat et al., 2014; Pischon et al., 2008) and de Smit (de Smit et al., 2012). It is worth mentioning that the Control Group of this study was composed of family members or neighbors who accompanied RA patients during their consultations and who shared the same socioeconomic conditions and access to health services.

The salivary flow of individuals with RA was shown to be reduced when compared with that of the Control Group. Although some authors have suggested that hyposalivation was an extraglandular characteristic of RA (Gualtierotti, Marzano, Spadari, & Cugno, 2018), our group demonstrated that patients with Sjögren Syndrome and RA formed a cluster of sicca symptoms. At the same time, individuals with RA and without SS presented similar salivary flow rates to those of the controls (Oliveira et al., 2015). On the other hand, the reduction in salivary flow could cause changes in the oral cavity, predisposing patients to some diseases, among them dental caries and periodontal disease. Although no positive association was found between RSF and periodontitis, a study conducted by Le Gall *et al* (Le Gall et al., 2016) found higher DMF-T values and a higher prevalence of periodontal disease in patients with low salivary flow rates.

The relations between the periodontal parameters and RA activity have not been extensively studied. The present study found no association between functional incapacity (HAQ) and RA activity (DAS 28) and the presence of periodontal disease, as was also found by Mobini *et al* (Mobini et al., 2017). Other authors, however, reported a statistically significant association between periodontal disease and disease activity and the number of painful joints. Although these divergences have not previously been explained, we observed that a half of the patients in the present study were under treatment with synthetic DMARDs and half with biological DMARDs, while other studies did not report this profile (Dissick et al., 2010; Rodríguez-Lozano et al., 2019) or included patients who only used synthetic DMARDs (H, A, & RA., 2017).

By definition, the DMARDs - Disease-modifying antirheumatic drugs - target the inflammatory processes and diminish the subsequent damage to the RA process (Smolen et al., 2017). The monoclonal antibodies (biological DMARDs) have been widely used in the treatment of RA over the last two decades, and in an inspiring manner, various biological agents targeting cytokines and cytokine networks have achieved significant success in the treatment of RA (Chen et al., 2019).

The different medication therapies for the treatment of RA could have an influence on inflammation of the periodontium, however, without interfering in the severity of periodontal disease (Han & Reynolds, 2012; Zhao et al., 2018; Ziebolz et al., 2018). Recent research (Ziebolz et al., 2018) evaluated the influence of different medications on the periodontal condition of patients with RA and concluded that the combination of methotrexate associated with anti-TNF increased periodontal inflammation and prevalence of bacteria in the sites studied. Approximately 1/3 of the patients in the present study made use of this combination.

Furthermore, we observed no association between the DAS28 and expression of cytokines, in which these did not vary with the increase in RA activity. In spite of the positive correlation between the activity of RA and serological levels of some cytokines, including TNF and IL-6 being well known (McInnes & Schett, 2017), the patients in the present study were under treatment, with half of them using biological DMARDs, which possibly had an influence on the serological profile of cytokines of these patients. Eight of them used tocilizumabe, an important inhibitor of IL-6, and 38 made use of anti-TNF- α (data not shown).

As far as we know, the relations between serological and salivary levels of inflammatory cytokines have not been extensively evaluated. Recently, Äyräväinen et al., (2018) (Äyräväinen et al., 2018) reported that IL-6 presented higher serological and salivary levels than those of healthy controls, and these levels were higher in the serum of patients with chronic RA and the saliva of patients with early AR, without showing any association with the periodontal parameters. Other authors have evaluated the correlation between the serological level and dosage of IL-4, IL-10, and TNF- α in the crevicular fluid. They observed that the levels in the crevicular fluid were similar in patients with RA and those with periodontitis (Cetinkaya, Guzeldemir, Ogus, & Bulut, 2013). However, in the present study, it was clear that the cytokines evaluated were presented differently in serum and saliva. Thus, they were found in higher levels in the serum of patients with RA and the saliva of systemically healthy individuals. This

suggested that the treatment of RA could modulate the salivary levels of cytokines.

The cells that secrete IL-17 have been documented in inflammatory lesions of patients with a variety of human inflammatory and autoimmune diseases (Gaffen & Hajishengallis, 2008). Cell Th17 is capable of producing diverse proinflammatory cytokines, including important mediators of the pathogenesis of RA and periodontitis, such as IL-17, IL-6 and TNF (Azizi, Jadidi-Niaragh, & Mirshafiey, 2013; Davies & Choy, 2014; Y. H. Lee & Bae, 2017). IL-17 amplifies and stimulates the production of multiple cytokines and keratinocytes, synoviocytes, inflammatory cells such as macrophages, fibroblasts, and neutrophils (Liu & Perl, 2019) and is an important mediator in the pathogenesis of the periodontal disease, mainly in its isoform IL-17A (Hajishengallis, 2014). In an experimental study, De Aquino, *et al* (de Aquino *et al.*, 2017) affirmed that mice with experimentally induced arthritis, exposed to *P. gingivalis*, presented a higher level of joint damage and frequency of Th17 when compared with mice that were not infected with these bacteria. Moreover, the aggravation of arthritis by periodontitis was accompanied by the increase in TNF- α and IL-17 production and joint infiltration of neutrophils. Studies with humans have reported that Th17 cytokines were responsible for bone erosion in RA because they directly induce the differentiation of osteoclasts and the production of RANK-L (Jung, Kang, & Han, 2019). In the present study, we did not find any higher serological or salivary levels of IL-17A in individuals with RA when compared with healthy individuals.

The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine that stimulates bone resorption and inhibits bone neoformation (Abbas, 2015), and it is, therefore, involved in inflammation during RA and periodontitis. Therefore, the inhibition of this cytokine would be expected to positively affect the RA and periodontitis (Kobayashi *et al.*, 2014; Mirrielees *et al.*, 2010). However, this finding was contradictory to that reported in the present study, in which higher levels of this cytokine were found in patients with RA and periodontitis. This was supported by Ziebolz *et al* (Ziebolz *et al.*, 2018) and by Pers *et al* (Pers, Saraux, Pierre, & Youinou, 2008), who found increased gingival and periodontal inflammation after the use of the TNF- α antagonists. Ziebolz (38) reported that although there was no reasonable hypothesis that would justify this finding, the positive effect of therapy with the TNF- α antagonist was inversely related to the drugs that were administered in combination with methotrexate (MTX). This hypothesis was corroborated by the findings of the present study since 32% of the patients in this study made use of anti-TNF associated with

MTX (data not presented).

Multiple roles have been identified for interleukin-6 (IL-6) (Laine, Crielaard, & Loos, 2012). This concerns a pleiotropic cytokine (Nishimoto, Kishimoto, & Yoshizaki, 2000) that could induce the production of C-reactive protein (CRP) and plays a key role in the pathogenesis of RA and periodontitis (Kishimoto, 2006). Also, it is a potent inducer of osteoclast differentiation and maturation (Liu & Perl, 2019). Higher concentrations of IL-6 in crevicular fluid and serum are associated with periodontitis, and high serological levels of IL-6 also characterize RA (Äyräväinen et al., 2018). Patients with RA had a higher tendency to develop PD than those of the control, in addition to presenting lower salivary flow and higher levels of IL-6 in saliva (Silvestre-Rangil, Bagán, Silvestre, Martinez-Herrera, & Bagán, 2017). We verified higher levels of IL-6 in the serum of RA/PO and RA; in saliva, the levels were higher in the groups C/PO and C. Äyräväinen et al (Äyräväinen et al., 2018), evaluated the association of serological and salivary levels of IL-6 in patients with periodontitis and RA and found elevated serological concentrations in RA, but not in periodontitis. The salivary levels of IL-6 were shown to be similar to those of the controls.

INF- γ is known to be a proinflammatory cytokine involved in cell death and the inflammatory response, however, studies continue to be discrepant with respect to its role in autoimmune diseases INF- γ (Y. H. Lee & Bae, 2017) and in periodontitis (Gaffen & Hajishengallis, 2008). A study conducted in biopsies of the gingiva of patients with chronic periodontitis affirmed an increase in the expression of this cytokine in diseased sites (C. H. Lee, Chen, Tu, Wu, & Chang, 2018). In the present study, INF- γ levels were shown to be four times higher in the control groups, both with and without periodontal disease. Group RA presented the lowest levels, which were statistically lower than the levels of the other three groups evaluated.

Anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10), which negatively regulate the pro-inflammatory immunological system (Laine et al., 2012), have been studied in periodontitis and rheumatoid arthritis. These cytokines have high potential to inhibit bone resorption and have been suggested as a therapeutic strategy for the treatment of PD and other diseases that cause bone loss (Jung et al., 2019; Q. Zhang et al., 2014). Due to its protective action on the periodontium, polymorphisms in promoter regions of the gene of IL-10 may produce greater susceptibility to PD (Z. Zhang et al., 2018). Researches conducted with crevicular fluid and serum to evaluate the levels of these cytokines have led to controversial results. A similar study verified that the mean

serological level of IL-4 in a group with periodontitis and RA was higher than it was in the control group (Bozkurt, Yetkin Ay, Berker, Tepe, & Akkuş, 2006) and that the salivary level was higher in the control group. A different result was obtained in another study that evaluated the serological levels of these cytokines and those in the in fluid, concluded that there was no difference between the concentration in patients with RA and those with periodontitis (Cetinkaya et al., 2013).

CONCLUSÃO

When we compared the Groups RA/PO and C/PO, we found higher values of all the cytokines in the serum of patients with RA. In saliva, all these values were inverted, so that they were higher in the control group. When we evaluated the group RA and C, all the cytokines studied, with the exception of IL-2, were found in higher levels in the serum of the group of patients with RA and in the saliva of the controls.

To sum up, the present study suggested that RA and periodontitis are manifested in a different form in the serum and saliva and that their expression was related to the respective mechanisms of the pathogenesis, so that the levels of cytokines in RA are higher in the serum, while in periodontitis, these levels are elevated in the saliva.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. (2015). *Immunology cellular and molecular* (8 ed. ed.).
- Araújo, V. M., Melo, I. M., & Lima, V. (2015). Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm*, 2015, 259074. doi:10.1155/2015/259074
- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., . . . Luthra, H. S. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3), 315-324. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>
- Äyräväinen, L., Heikkinen, A. M., Kuuliala, A., Ahola, K., Koivuniemi, R., Laasonen, L., . . . Sorsa, T. (2018). Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status. *Ann Med*, 50(4), 333-344. doi:10.1080/07853890.2018.1468922
- Azizi, G., Jadidi-Niaragh, F., & Mirshafiey, A. (2013). Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 16(3), 243-253. doi:10.1111/1756-185X.12132
- Bello-Gualtero, J. M., Lafaurie, G. I., Hoyos, L. X., Castillo, D. M., De-Avila, J., Munevar, J. C., . . . Romero-Sánchez, C. (2016). Periodontal Disease in Individuals With a Genetic Risk of Developing Arthritis and Early Rheumatoid Arthritis: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol*, 87(4), 346-356. doi:10.1902/jop.2015.150455
- Bozkurt, F. Y., Yetkin Ay, Z., Berker, E., Tepe, E., & Akkuş, S. (2006). Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*, 35(3-4), 180-185. doi:10.1016/j.cyto.2006.07.020
- Cetinkaya, B., Guzeldemir, E., Ogus, E., & Bulut, S. (2013). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 84(1), 84-93. doi:10.1902/jop.2012.110467
- Chen, S. J., Lin, G. J., Chen, J. W., Wang, K. C., Tien, C. H., Hu, C. F., . . . Sytwu, H. K. (2019). Immunopathogenic Mechanisms and Novel Immune-Modulated Therapies in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi:10.3390/ijms20061332
- Chou, Y. Y., Lai, K. L., Chen, D. Y., Lin, C. H., & Chen, H. H. (2015). Rheumatoid Arthritis Risk Associated with Periodontitis Exposure: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *PLoS One*, 10(10), e0139693. doi:10.1371/journal.pone.0139693

- Davies, R., & Choy, E. (2014). Clinical experience of IL-6 blockade in rheumatic diseases - implications on IL-6 biology and disease pathogenesis. *Semin Immunol*, 26(1), 97-104. doi:10.1016/j.smim.2013.12.002
- de Aquino, S. G., Talbot, J., Sônego, F., Turato, W. M., Grespan, R., Avila-Campos, M. J., . . . Cirelli, J. A. (2017). The aggravation of arthritis by periodontitis is dependent of IL-17 receptor A activation. *J Clin Periodontol*, 44(9), 881-891. doi:10.1111/jcpe.12743
- de Jong, T., Bakker, A. D., Everts, V., & Smit, T. H. (2017). The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*, 52(6), 965-974. doi:10.1111/jre.12477
- de Smit, M., Westra, J., Vissink, A., Doornbos-van der Meer, B., Brouwer, E., & van Winkelhoff, A. J. (2012). Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res Ther*, 14(5), R222. doi:10.1186/ar4061
- Dissick, A., Redman, R. S., Jones, M., Rangan, B. V., Reimold, A., Griffiths, G. R., . . . Kerr, G. S. (2010). Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol*, 81(2), 223-230. doi:10.1902/jop.2009.090309
- Falcão, D. P., da Mota, L. M., Pires, A. L., & Bezerra, A. C. (2013). Sialometry: aspects of clinical interest. *Rev Bras Reumatol*, 53(6), 525-531. doi:10.1016/j.rbr.2013.03.001
- Gaffen, S. L., & Hajishengallis, G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*, 87(9), 817-828. doi:10.1177/154405910808700908
- Ghallab, N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Arch Oral Biol*, 87, 115-124. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.12.022
- Giannobile, W. V., Beikler, T., Kinney, J. S., Ramseier, C. A., Morelli, T., & Wong, D. T. (2009). Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol 2000*, 50, 52-64. doi:10.1111/j.1600-0757.2008.00288.x
- Gualtierotti, R., Marzano, A. V., Spadari, F., & Cugno, M. (2018). Main Oral Manifestations in Immune-Mediated and Inflammatory Rheumatic Diseases. *J Clin Med*, 8(1). doi:10.3390/jcm8010021
- Gümüş, P., Nizam, N., Lappin, D. F., & Buduneli, N. (2014). Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *J Periodontol*, 85(2), 270-280. doi:10.1902/jop.2013.130117

- H, M., A, M., & RA., M. (2017). Periodontite em pacientes com artrite reumatóide, abundância e associação com actividade facilidade dis-. In (pp. 31-34): Med J Islam Republrã.
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11. doi:10.1016/j.it.2013.09.001
- Han, J. Y., & Reynolds, M. A. (2012). Effect of anti-rheumatic agents on periodontal parameters and biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Implant Sci*, 42(1), 3-12. doi:10.5051/jpis.2012.42.1.3
- Jung, Y. K., Kang, Y. M., & Han, S. (2019). Osteoclasts in the Inflammatory Arthritis: Implications for Pathologic Osteolysis. *Immune Netw*, 19(1), e2. doi:10.4110/in.2019.19.e2
- Khurana, R., & Berney, S. M. (2005). Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, 12(3), 153-165. doi:10.1016/j.pathophys.2005.07.009
- Kishimoto, T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*, 8 Suppl 2, S2. doi:10.1186/ar1916
- Kobayashi, T., Kido, J. I., Ishihara, Y., Omori, K., Ito, S., Matsuura, T., . . . Yoshie, H. (2018). The KCNQ1 gene polymorphism as a shared genetic risk for rheumatoid arthritis and chronic periodontitis in Japanese adults: A pilot case-control study. *J Periodontol*. doi:10.1002/JPER.17-0412
- Kobayashi, T., Yokoyama, T., Ito, S., Kobayashi, D., Yamagata, A., Okada, M., . . . Yoshie, H. (2014). Periodontal and serum protein profiles in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitor adalimumab. *J Periodontol*, 85(11), 1480-1488. doi:10.1902/jop.2014.140194
- Kurowska, W., Kuca-Warnawin, E. H., Radzikowska, A., & Maśliński, W. (2017). The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Cent Eur J Immunol*, 42(4), 390-398. doi:10.5114/ceji.2017.72807
- Laine, M. L., Crielaard, W., & Loos, B. G. (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*, 58(1), 37-68. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00415.x
- Laugisch, O., Wong, A., Sroka, A., Kantyka, T., Koziel, J., Neuhaus, K., . . . Eick, S. (2016). Citrullination in the periodontium--a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Investig*, 20(4), 675-683. doi:10.1007/s00784-015-1556-7
- Le Gall, M., Cornec, D., Pers, J. O., Saraux, A., Jousse-Joulin, S., Cochener, B., . . . Boisramé, S. (2016). A prospective evaluation of dental and periodontal status in patients with suspected Sjögren's syndrome. *Joint Bone Spine*, 83(2), 235-236. doi:10.1016/j.jbspin.2015.02.015

- Lee, C. H., Chen, Y. W., Tu, Y. K., Wu, Y. C., & Chang, P. C. (2018). The potential of salivary biomarkers for predicting the sensitivity and monitoring the response to nonsurgical periodontal therapy: A preliminary assessment. *J Periodontal Res*, 53(4), 545-554. doi:10.1111/jre.12544
- Lee, Y. H., & Bae, S. C. (2017). Associations between circulating IL-17 levels and rheumatoid arthritis and between IL-17 gene polymorphisms and disease susceptibility: a meta-analysis. *Postgrad Med J*, 93(1102), 465-471. doi:10.1136/postgradmedj-2016-134637
- Li, R., Tian, C., Postlethwaite, A., Jiao, Y., Garcia-Godoy, F., Pattanaik, D., . . . Li, J. (2017). Rheumatoid arthritis and periodontal disease: What are the similarities and differences? *Int J Rheum Dis*, 20(12), 1887-1901. doi:10.1111/1756-185X.13240
- Liu, E., & Perl, A. (2019). Pathogenesis and treatment of autoimmune rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 31(3), 307-315. doi:10.1097/BOR.0000000000000594
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2017). Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 389(10086), 2328-2337. doi:10.1016/S0140-6736(17)31472-1
- Mirrielees, J., Crofford, L. J., Lin, Y., Kryscio, R. J., Dawson, D. R., Ebersole, J. L., & Miller, C. S. (2010). Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 37(12), 1068-1074. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01625.x
- Mobini, M., Maboudi, A., & Ali Mohammadpour, R. (2017). Periodontitis in rheumatoid arthritis patients, abundance and association with disease activity. *Med J Islam Repub Iran*, 31, 44. doi:10.14196/mjiri.31.44
- Monsarrat, P., Vergnes, J. N., Blaizot, A., Constantin, A., de Grado, G. F., Ramambazafy, H.,.....Nabet, C. (2014). Oral health status in outpatients with rheumatoid arthritis: the OSARA study. *Oral Health Dent Manag*, 13(1), 113-119. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603927>
- Nishimoto, N., Kishimoto, T., & Yoshizaki, K. (2000). Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, 59 Suppl 1, i21-27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053081>
- Oliveira, H. F., de Souza, T. R., Carvalho, C. N., Duarte, A., Carvalho, A. T., Leão, J. C., & Gueiros, L. A. (2015). Serologic profile and clinical markers of Sjögren syndrome in patients with rheumatoid arthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 119(6), 628-635. doi:10.1016/j.oooo.2015.02.479
- Pers, J. O., Saraux, A., Pierre, R., & Youinou, P. (2008). Anti-TNF-alpha immunotherapy is associated with increased gingival inflammation without clinical attachment loss in subjects with rheumatoid arthritis. *J Periodontol*, 79(9), 1645-1651. doi:10.1902/jop.2008.070616

- Pischon, N., Pischon, T., Kröger, J., Gülmez, E., Kleber, B. M., Bernimoulin, J. P., . . . Detert, J. (2008). Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol*, 79(6), 979-986. doi:10.1902/jop.2008.070501
- Rodríguez-Lozano, B., González-Febles, J., Garnier-Rodríguez, J. L., Dadlani, S., Bustabad-Reyes, S., Sanz, M., . . . Díaz-González, F. (2019). Association between severity of periodontitis and clinical activity in rheumatoid arthritis patients: a case-control study. *Arthritis Res Ther*, 21(1), 27. doi:10.1186/s13075-019-1808-z
- Saini, R. (2011). Periodontitis and rheumatoid arthritis: Inflammatory relationship. *J Pharm Bioallied Sci*, 3(3), 464. doi:10.4103/0975-7406.84469
- Silvestre-Rangil, J., Bagán, L., Silvestre, F. J., Martinez-Herrera, M., & Bagán, J. (2017). Periodontal, salivary and IL-6 status in rheumatoid arthritis patients. A cross-sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 22(5), e595-e600. doi:10.4317/medoral.21937
- Smolen, J. S., Aletaha, D., & McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 388(10055), 2023-2038. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
- Smolen, J. S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., . . . van der Heijde, D. (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*, 76(6), 960-977. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210715
- Souto, G. R., Queiroz-Junior, C. M., de Abreu, M. H., Costa, F. O., & Mesquita, R. A. (2014). Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One*, 9(3), e91636. doi:10.1371/journal.pone.0091636
- Wiebe, C. B., & Putnins, E. E. (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc*, 66(11), 594-597. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11253351>
- Wong, H. C., Ooi, Y., Pulikkotil, S. J., & Naing, C. (2018). The role of three interleukin 10 gene polymorphisms (- 1082 A > G, - 819 C > T, - 592 A > C) in the risk of chronic and aggressive periodontitis: a meta-analysis and trial sequential analysis. *BMC Oral Health*, 18(1), 171. doi:10.1186/s12903-018-0637-9
- Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., & Yang, W. (2014). Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int*, 2014, 284836. doi:10.1155/2014/284836
- Zhang, Z., Zheng, Y., & Li, X. (2018). Interleukin-10 gene polymorphisms and chronic periodontitis susceptibility: Evidence based on 33 studies. *J Periodontal Res*. doi:10.1111/jre.12612

- Zhao, X., Liu, Z., Shu, D., Xiong, Y., He, M., Xu, S., . . . Guo, B. (2018). Association of Periodontitis with Rheumatoid Arthritis and the Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit*, 24, 5802-5810. doi:10.12659/MSM.909117
- Ziebolz, D., Rupprecht, A., Schmickler, J., Bothmann, L., Krämer, J., Patschan, D., . . . Patschan, S. (2018). Association of different immunosuppressive medications with periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis: Results from a cross-sectional study. *J Periodontol*, 89(11), 1310-1317. doi:10.1002/JPER.17-0616

APÊNDICE A — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS –
Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **DOENÇA PERIODONTAL E ARTRITE REUMATOIDE: Um estudo do Perfil imunológico Th1, Th2 e Th17 e caracterização do fenótipo gengival por Sondagem Ótica**, que está sob a responsabilidade do pesquisador **Luiz Alcino Monteiro Gueiros**, Av. Prof. **Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-901, apto. 102, CEP: 51.021-130, Recife - PE – (81) 991381637, laqueiros@gmail.com** (inclusive ligações a cobrar). Também participa também desta pesquisa a pesquisadora **Marina Lins Maymone de Melo**, Telefone para contato: **(81) 988644148** e a pesquisadora **Thayanara Silva Melo**.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados. Caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Justificativa e objetivos: Através desse estudo e de estudos futuros decorrentes deste, poderemos compreender melhor os mecanismos da Periodontite e a Artrite Reumatoide. Este estudo visa caracterizar o perfil clínico, imunológico e fenótipo gengival da doença periodontal em pacientes com artrite reumatoide.

Informações de procedimentos: O Sr. (a) será submetido a um **questionário** para obtenção dos dados relativos ao seu nome, endereço e história clínica da doença. O

Sr. (a) passará por um **exame clínico** da boca para determinar a quantidade de saliva por meio de um exame simples e não invasivo. Este teste chama-se **fluxo salivar em repouso**. Para realização deste teste, o Sr. (a) deverá expelir toda a saliva produzida em um recipiente plástico durante 5 minutos. Ao final deste tempo, o avaliador irá mensurar a quantidade de saliva produzida. Esta saliva será coletada para avaliação em laboratório. Caso haja diminuição significativa da quantidade de saliva ou queixa de boca seca procederemos uma remoção de glândulas salivares menores do lábio inferior por meio de uma pequena cirurgia (**biópsia**) com o objetivo diagnóstico. Pode ser necessária a realização de uma biópsia (remoção de uma pequena parte) na sua gengiva para avaliação histológica da doença periodontal. O Sr. (a) passará por anestesia local, incisão com lâmina de bisturi, remoção de 5 a 6 glândulas salivares menores e sutura da região. O Sr.(a) receberá informações e orientações pós-operatórias e receberá uma prescrição de analgésicos em caso de desconforto relativos ao procedimento cirúrgico. Uma **amostra de sangue** será coletada com um tubo de coleta com agulha estéril, serão coletados 10 ml – meia colher de sopa – por punção da veia do braço. Será realizado, também, um teste para determinar a **produção de lágrima**, na qual no Sr. (a) será colocada uma fita de papel absorvente na pálpebra de cada olho por 5 minutos. Não há métodos alternativos existentes para obtenção da informação desejada nesta pesquisa.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados: O Sr.(a) poderá apresentar hematoma pós-coleta de sangue periférico (coletado da veia do braço) e dor durante a injeção da agulha. Esses acontecimentos também poderão ser contornados através da experiência do profissional especializado que fará a coleta. A quantidade de sangue a ser coletada será de 10 ml. Além disso, poderão ocorrer reações não esperadas relacionadas ao procedimento da biópsia, tais como: alergia ao anestésico, sangramento e desconforto pós- operatório. O Sr. (a) também poderá sentir um desconforto leve durante o teste de produção da lágrima e durante a sondagem periodontal. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, o qual fará o seu exame em local apropriado (Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas e Clínica de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco) e estará sob a orientação do professor responsável. Vale ressaltar que todos os procedimentos serão realizados respeitando os critérios de higiene necessários. Em relação aos benefícios esperados, caso o Sr.(a) seja diagnosticado com a periodontite, seu tratamento será realizado no ambulatório do setor de Estomatologia da UFPE ao final da pesquisa. O atendimento clínico será realizado pelo pesquisador responsável. Caso necessite de tratamento odontológico, o Sr.(a) será encaminhado(a) ao serviço de Odontologia da UFPE.

Forma de acompanhamento e assistência: Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão arquivados em ficha clínica que será armazenada em pastas e

armazenados pelo período de no mínimo 5 anos, no endereço acima citado. Os pesquisadores estarão à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais pessoalmente, por telefone ou e-mail (contato acima).

Garantias: O Sr.(a) será esclarecido quanto a todos os aspectos da pesquisa, antes, durante e após a mesma.

Liberdade de recusa à participação ou de retirar o seu consentimento: O Sr. (a) pode escolher não participar de nossa pesquisa, ou desistir da participação, se achar necessário, em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalização e sem prejuízo, inclusive do seu atendimento clínico.

Sigilo: Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

Ressarcimento e indenização: Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu,_, CPF_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **DOENÇA PERIODONTAL E ARTRITE REUMATOIDE: Um estudo do Perfil imunológico Th1, Th2 e Th17 e caracterização do fenótipo gengival por Sondagem Ótica**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que

posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas) à equipe de pesquisa

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A — NORMAS DA REVISTA (JOURNAL OF PERIODONTOLOGY)

Journal of Periodontology Author Instructions

Manuscript Categories

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total

combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the problem being addressed.
- Methods: Describes how the study was performed.
- Results: Describes the primary results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials

and

Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

REVIEW

ARTICLES

The *Journal of Periodontology* is no longer accepting submissions of reviews. Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgment(s)

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE

SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to [*Clinical Advances in Periodontics*](#). The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information

for clinicians and teachers in the field. Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science. The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication. The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research.

(U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research

development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references,

and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the clinical situation being discussed.
- Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- Results: Describes the clinical results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the cases should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal of Periodontology*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

The *Journal of Periodontology* no longer accepts submissions of letters to the editor.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

SEARCH ENGINE OPTIMIZATION

For tips on Search Engine Optimization (SEO) and article discovery, please see our [SEO guide](#).

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to identify authors and their corresponding institutions);
3. disclaimers, if any;
4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers submitted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.

2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea.

Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid

- induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic

Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limioli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease.

Available at: <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html>.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology's* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPORTING INFORMATION

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see **Figures** above) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations

prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary

Videos

The Journal of Periodontology publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail julie@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on ScholarOne Manuscripts in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, *e.g.*, or *i.e.*
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.

- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Wiley's	Author	Name	Change	Policy
In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.				

Conflict of Interest and Financial Disclosure Form

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in [ScholarOne Manuscripts](#)** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a **[CONSORT checklist](#)** with your manuscript. More information can be found at **www.consort-statement.org**.

All clinical trials must be registered prior to submission to the Journal of Periodontology at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see **<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs>** for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - **<http://www.clinicaltrials.gov>**
- EU Clinical Trials Register - **<https://www.clinicaltrialsregister.eu>**
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - **<http://www.who.int/ictpr/en>**

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was conducted in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at [ScholarOne Manuscripts](#) by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
- 3. Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

1. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
 2. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
 3. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License
 - Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License
 - Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).