



Centro de Pós-Graduação
Pesquisa e Extensão

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

SILVIA COELHO DE LACERDA HELUY

**RAZÕES ENTRE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS
NO SORO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA COM E
SEM DIABETES E/OU HÁBITO DE FUMAR**

Guarulhos
2018

SILVIA COELHO DE LACERDA HELUY

**RAZÕES ENTRE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS
NO SORO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA COM E
SEM DIABETES E/OU HÁBITO DE FUMAR**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de Doutora em Odontologia
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

Guarulhos
2018

H484r

Heluy, Silvia Coelho de Lacerda

Razões entre citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro de pacientes com periodontite crônica com e sem diabetes e/ou hábito de fumar. / Silvia Coelho de Lacerda Heluy. -- 2018.

66 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^o. Dra. Poliana Mendes Duarte

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2018.

1. Periodontite crônica, 2. Diabetes 3. Tabagismo. 4. Citocina 5. Soro
I. Título II. Duarte, Poliana Mendes (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "EQUILÍBRIO ENTRE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS NO SORO DE PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA COM E SEM DIABETES E/OU HÁBITO DE FUMAR" em sessão pública realizada em 19 de dezembro de 2017 considerou a candidata Silvia Coelho de Lacerda Heluy aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UNG) Poliana Mendes Duarte
2. Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli (UNITAU) Sheila Cavalca Cortelli
3. Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira (FOUSP) Marinella Caldeira
4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UNG) Jamil Awad Shibli
5. Profa. Dra. Vanessa Renata Santos da Silva (UNG) Vanessa Renata Santos da Silva

Guarulhos, 19 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus filhos Carolinna, Davvi e Luccas Lacerda Heluy, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais Adonias Lucas de Lacerda e Maria de Nazareth Coelho Lacerda “*in memorium*”, pelo exemplo de integridade, princípios e valores.

Aos meus filhos, Carolinna, Davvi e Luccas Lacerda Heluy, razão da minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo apoio constante deste trabalho.

Agradeço a Carlos Jorge Heluy pela amizade.

À minha orientadora, professora Poliana Mendes Duarte, por quem tenho muita admiração.

Obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho, paciência e amizade.

Aos professores do Centro de Pós-Graduação e Pesquisa do Curso de Odontologia, principalmente, Luciene Figueiredo, Magda Feres, Jamil Shibli, André Reis, Hélio Dolye, Alessandra Cassoni e José Augusto Rodrigues, por contribuírem com seus ensinamentos de excelência. Tenho orgulho de fazer parte do Programa de Pós-graduação da UnG.

Aos colegas Tamires, Heloisa, Sheyla, Bernal, Ronaldo, Cláudia pela amizade e companhia durante os módulos.

À Polícia Militar do Maranhão pela oportunidade de realizar esse curso.

À todos os colegas de curso, o meu sincero agradecimento pelo convívio descontraído e constante aprendizado.

Aos funcionários da UnG pela convivência e profissionalismo.

Aos pacientes pela paciência e cooperação.

Agradeço a todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?

Isaac Newton

RESUMO

Atualmente, existem poucas evidências sobre o impacto da periodontite crônica (PC) associada à hiperglicemia e à exposição ao tabaco nos níveis circulantes de citocinas e no estado inflamatório sistêmico. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da PC e da PC associada ao diabetes melito tipo 2 (DM) e/ou ao hábito de fumar nas proporções séricas de citocinas pró- e anti-inflamatórias. As relações entre as citocinas em indivíduos com PC com e sem os fatores de risco também foram avaliadas. Cento e trinta indivíduos foram alocados em um dos seguintes grupos: controle (n=25) - não fumantes e não-diabéticos sem história de periodontite; PC (n=26) - não fumantes e não-diabéticos com PC; DMPC (n=30) - não fumantes com DM e PC, FPC (n=27) - fumantes não-diabéticos com CP e FDMPC (n=22) - fumantes com DM e CP. Os níveis séricos de dezoito citocinas (interleucina [IL]-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, fator de crescimento transformador- β , interferon [INF]- γ , fator de necrose tumoral [TNF]- α , proteína inflamatória de macrófagos-1 α e fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos [GM-CSF]) foram avaliados utilizando um imunoensaio multiplex. Seis proporções entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram significativamente maiores no grupo PC quando comparado ao grupo controle (p <0,05). Onze, dezessete e nove proporções entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram significativamente maiores nos grupos DMPC, FCP e FDMPC comparado ao grupo controle (p <0,05). Quando comparado ao grupo PC, o grupo FPC apresentou níveis séricos mais elevados de TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-5, IL-17/IL-13 e IL-6/IL-13 (p <0,05). A análise de *cluster* revelou um *cluster* relevante composto por dez citocinas (IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-6, IL-4 e GM-CSF) no soro de indivíduos do grupo DMPC. Em conclusão, as razões entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias está alterado no soro de pacientes com PC, e ainda mais em pacientes com PC associada à um ou à ambos fatores de risco, favorecendo um estado pró-inflamatório. As relações entre as citocinas séricas foram influenciadas de forma diferente pela PC apenas e pela PC associada ao DM e/ou ao tabagismo.

Palavras-chave: periodontite crônica, diabetes, tabagismo, citocina, soro.

ABSTRACT

Currently, there is little evidence on the impact of chronic periodontitis (CP) combined with hyperglycemia and tobacco exposure on circulating levels of cytokines and systemic inflammatory state. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the impact of CP and CP associated with type 2 diabetes mellitus (DM) and/or smoking the serum ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines. Relationships among cytokines in subjects presenting CP with and without these risk factors were also evaluated. One hundred and thirty subjects were assigned into one of the following groups: control (n=25) - non-diabetic non-smokers with no history of periodontitis; CP (n=26)- non-diabetic non-smokers with CP; DMCP (n=30)- non-smokers with DM and CP, SCP (n=27)- non-diabetic smokers with CP and, SDMCP (n=22)- smokers with type 2 DM and CP. Serum levels of eighteen cytokines (interleukin [IL]-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, transforming growth factor- β , interferon [IFN]- γ , tumor necrosis factor [TNF]- α , macrophage inflammatory protein-1 α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]) were measured using a multiplex immunoassays. Six ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines were significantly higher in the CP than in the control group ($p < 0.05$). Eleven, seventeen and nine ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines were significantly higher in the DMCP, SCP and SDMCP groups than in the control group ($p < 0.05$). When compared to the CP group, the SCP group presented higher serum ratios of TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-5, IL-17/IL-13 and IL-6/IL-13 ($p < 0.05$). Cluster analysis revealed a relevant cluster composed of ten cytokines (IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-6, IL-4 and GM-CSF) in serum of subjects from the DMCP group. In conclusion, the ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines shift to favor a pro-inflammatory status in serum of patients with CP and even more when CP was associated with one or both risk factors. The relationships among serum cytokines were differently influenced by CP only and CP associated with DM and/or smoking.

Key-words: chronic periodontitis, diabetes, smoking, cytokine, serum.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1. Periodontite	09
1.2. Diabetes Melito (DM) e as doenças periodontais	10
1.3. Tabagismo e as doenças periodontais	12
1.4. Citocinas	14
1.5. Níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com periodontite	21
2. PROPOSIÇÃO	27
3. ARTIGO CIENTÍFICO	28
4. CONCLUSÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO	66

1. Introdução

1.1. Periodontite

A periodontite é uma condição inflamatória crônica iniciada por microrganismos patogênicos que colonizam os tecidos periodontais, levando ao comprometimento das estruturas de proteção e suporte do dente, incluindo o tecido gengival, osso, cemento e ligamento (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994, SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Como consequência da destruição irreversível do tecido conjuntivo e do osso alveolar, surgem os principais sinais clínicos da periodontite que incluem inflamação gengival, bolsas profundas, perdas de inserção clínica e óssea, mobilidade, e, muitas vezes perda do elemento dental. Uma revisão sistemática, incluindo 72 estudos e dados de 291.170 indivíduos com mais 15 anos de idade de 37 países estimou que a prevalência global de periodontite severa em 2010 era de 10,8%, afetando 743 milhões de pessoas em todo o mundo (KASSEBAUM et al., 2014).

O atributo infeccioso da periodontite está relacionado à presença de uma microbiota que abriga centenas de espécies bacterianas que formam um ecossistema complexo e muito bem integrado conhecido como biofilme. Nos últimos anos estudos científicos utilizando diversas técnicas microbiológicas foram desenvolvidos para identificar os microrganismos presentes no biofilme subgengival. Atualmente, está bem estabelecido que as espécies que compõem os complexos laranja e vermelho descritos por Socransky et al., em 1998, são os principais patógenos periodontais. O complexo vermelho é considerado o mais patogênico deles pois apresenta uma forte correlação positiva com os parâmetros clínicos de doença periodontal incluindo profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento. O complexo laranja é composto pelas espécies *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. O complexo vermelho é formado por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994, SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

Evidências científicas demonstram que a progressão da periodontite ocorre como resultado da resposta imune do hospedeiro às toxinas e fatores de virulência liberados pelos patógenos. A resposta do hospedeiro diante da agressão dos microrganismos estimula o recrutamento de células que participam ativamente do processo inflamatório e do sistema imunológico como os

neutrófilos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e plasmócitos. Essas células, juntamente com outras presentes no periodonto como células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteócitos e osteoclastos produzem uma gama de mediadores imunoinflamatórios como citocinas e enzimas proteolíticas, biomarcadores que desempenham papel crucial na patogênese da periodontite.

Estudos clínicos e mecanísticos têm demonstrados que fatores sistêmicos e comportamentais podem interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos periodontais, alterando a susceptibilidade dos mesmos à instalação e progressão das doenças periodontais (MERCADO et al., 2003, CHOI et al., 2011). Dentre esses fatores, o DM e o tabagismo foram estabelecidos como verdadeiros fatores de risco para a periodontite, capazes de aumentar sobremaneira a prevalência, extensão e gravidade da mesma (LINDEN & MULLALLY, 1994, GROSSI et al., 1994, FIRATLI et al., 1996, HEITZ-MAYFIELD, 2005, VOUIROS et al., 2009, GENCO et al., 2013).

1.2. Diabetes Melito (DM) e as doenças periodontais

DM consiste em um transtorno metabólico de múltiplas etiologias, caracterizado por hiperglicemia crônica resultante da falha na secreção e ação de insulina ou ambos, que gera distúrbios no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, globalmente, 422 milhões de adultos com mais de 18 anos apresentavam DM em 2014. O número de pessoas com DM, definido por um índice de glicose no plasma em jejum \geq a 7,0 mmol/L ou em medicação para DM/glicemia, aumentou progressivamente nas últimas décadas, devido ao crescimento populacional, ao aumento da idade média da população e ao aumento na prevalência dos fatores de risco associados, como sobrepeso e obesidade. Especificamente, o número de pessoas com DM aumentou substancialmente entre 1980 e 2014, passando de 108 milhões para 422 milhões, cerca de quatro vezes mais. Na próxima década, prevê-se que esse número aumente para 642 milhões de pessoas. A prevalência global de DM praticamente dobrou desde 1980, passando de 4,7% para 8,5% na população adulta. Tal aumento foi mais rápido nos países de baixa e média renda quando comparado aos países de alta renda (WHO, 2016). Em 2012, o DM foi responsável por 1,5 milhões de óbitos, enquanto a alta glicemia causou 2,2 milhões de mortes adicionais. Isso porque o DM causa diversas alterações macro e

microvasculares, que geram doenças como arteriosclerose, gangrena dos membros inferiores e complicações cerebrovasculares, retinopatias, neuropatias e nefropatias. Dentro desse contexto, a periodontite se destaca como a sexta complicação do DM.

Atualmente o DM é classificado em dois tipos principais, DM tipo 1 e DM tipo 2. O DM tipo ocorre devido a produção insuficiente de insulina pelo pâncreas e atinge especialmente jovens. O DM tipo 2, por sua vez, acomete principalmente indivíduos com mais de 40 anos e, é ocasionado pela resistência à insulina, uma condição em que as células não respondem à insulina de forma adequada. O mesmo é a forma mais comum da doença, representando 87-91% da carga total de DM, tanto em termos de prevalência quanto de incidência.

Estudos em animais e clínicos, realizados por diferentes grupos de pesquisa, têm demonstrado claramente a interferência negativa do DM no curso das doenças periodontais, compilando fortes evidências de que o DM é um fator de risco para periodontite.

Uma das primeiras evidências sobre a relação DM e as doenças periodontais foi demonstrada por Emrich et al., em 1991. De acordo com esse estudo realizado em índios Pima no Arizona, diabéticos tipo 2 apresentaram maior prevalência e gravidade de doença periodontal quando comparados à não-diabéticos, com um risco de ocorrência de destruição periodontal aproximadamente 3 vezes maior. Esses achados iniciais foram confirmados mais tarde por vários outros estudos clínicos que demonstraram que diabéticos possuíam maior perda de inserção, profundidade de sondagem (PS), perda óssea, número de bolsas com PS > 4 mm e 6 mm, maiores níveis de sangramento à sondagem e acúmulo de placa, cálculo e mais perda dentária, quando comparados aos não-diabéticos (GROSSI et al., 1994, FIRATLI et al., 1996, TAYLOR et al., 1998, CAMPUS et al., 2005, NOVAK et al., 2008, KAUR et al., 2009). Corroborando esses estudos realizados nas décadas passadas, estudos mais recentes também demonstraram associação do DM com as doenças periodontais. Hong et al. (2016), analisando dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição Coreana obtidos em 2012 de um total de 4 477 adultos (\geq 30 anos), verificaram que a prevalência de periodontite foi significativamente maior em indivíduos com DM (43,7%) comparados aos sem DM (25%). Abduljabbar et al. (2017) demonstraram que os parâmetros inflamatórios periodontais e peri-implantares, incluindo índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e mobilidade foram maiores em pacientes pré-diabéticos e diabéticos em comparação aos não-diabéticos.

1.3. Tabagismo e as doenças periodontais

Apesar das evidentes reduções na prevalência do consumo de tabaco nos últimos anos devido às campanhas anti-tabagismo, o tabagismo continua sendo uma das principais causas evitáveis de doenças e morte prematura em todo o mundo. O consumo de tabaco está associado a um amplo espectro de patologias como cânceres, doenças cardiovasculares, respiratórias e oculares, além de efeitos adversos na função reprodutiva feminina. A fumaça de cigarro é uma mistura complexa de milhares de componentes químicos que exercem efeitos negativos nas macromoléculas e nas vias bioquímicas, direta e indiretamente. Muitos desses compostos podem atuar como oxidantes, agentes pró-inflamatórios, agentes cancerígenos ou uma combinação destes (COLOMBO et al., 2014). A epidemia global de consumo de tabaco alcançou proporções pandêmicas nos últimos anos, com aproximadamente 1,3 bilhão de usuários e 6 milhões de mortes anuais. O tabagismo envolve cuidados substanciais e custos econômicos e sociais em todos os países decorrente do fumo direto e da exposição passiva ao tabaco (JOSÉ et al., 2017).

Evidências científicas acumuladas têm demonstrado que o tabagismo exerce influência negativa no estabelecimento, progressão e risco de doenças periodontais. Em 1947 surgiu um dos primeiros indícios científicos de que o consumo de tabaco teria um impacto negativo nos tecidos periodontais Pindborg (1947) observou que oficiais da marinha que consumiam grandes quantidades de cigarros diariamente apresentavam maior acúmulo de cálculo e sangramento gengival e chances de desenvolvimento de gengivite ulcerativa necrosante. Cinquenta anos mais tarde, uma série de estudos clínicos comprovaram os efeitos deletérios do consumo de cigarros nos tecidos periodontais em diferentes grupos populacionais. Linden e Mullally (1994) demonstraram uma razão de chance da ocorrência de periodontite em tabagistas foi de 14,1 em uma população que fumava em média 11,8 anos. Axelsson et al. (1998) observaram que indivíduos fumantes de diversas faixas etárias apresentaram maiores médias de perda de inserção, quando comparados aos não-fumantes da mesma faixa etária. Tomar e Asma (2000) examinaram a relação entre cigarro e periodontite e estimaram a proporção de periodontite na população adulta dos Estados Unidos que era atribuível ao tabagismo, usando dados da Terceira Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição, realizada entre 1988 e 1994. De acordo com os resultados, fumantes eram cerca de 4 vezes mais propícios que os indivíduos que nunca fumaram em ter periodontite, mesmo após ajuste estatístico para idade, gênero, raça/etnia, educação e renda. Além disso, 41,9% dos casos de periodontite nesta população foram atribuídos ao

consumo de cigarros. Neste mesmo ano, Albandar et al. (2000) observaram que fumantes de cigarros e charutos/cachimbos apresentaram maior prevalência de periodontite moderada e severa e maior prevalência e extensão de perda de inserção e recessão gengival que não-fumantes. Além disso, os fumantes tiveram menos sangramento gengival e maior número de dentes ausentes que os não fumantes. Os fumantes de cigarros apresentaram maior prevalência de periodontite moderada e grave (25,7%) em relação aos ex-fumantes (20,2%) e não-fumantes (13,1%). Em 2005, Torrungruang et al. avaliaram o efeito do tabagismo na gravidade da periodontite em adultos tailandeses. Fumantes tailandeses apresentaram maior porcentagem de sítios com acúmulo de placa, com profundidade de sondagem mais profunda e com maior nível de inserção clínica que ex-fumantes e não-fumantes. As probabilidades de apresentar periodontite moderada e grave em fumantes foram, respectivamente, 1,7 e 4,8 vezes maiores que os não fumantes. Kibayashi et al. (2007) avaliaram a associação entre o tabagismo e a progressão da doença periodontal, definida por ≥ 3 sítios com ao menos 2 mm de aumento de profundidade de sondagem ao longo de 4 anos. Os resultados demonstraram que 38,5% da progressão da doença estava relacionada ao tabagismo. Além disso, os anos de consumo de tabaco demonstraram uma correlação positiva de dose-resposta com a progressão da periodontite nesta população.

Um estudo robusto conduzido em 2015 em 23.376 alemães, demonstrou que fumantes pesados (≥ 15 cigarros/dia) foram associado à um risco 3 vezes maior de perda dentária em homens e 2 vezes em mulheres com < 50 anos, quando comparado aos homens e mulheres que nunca fumaram (DIETRICH et al., 2015). Khan et al. (2016) avaliaram a prevalência e a relação de dose-resposta da periodontite crônica em fumantes do Paquistão. A prevalência de periodontite crônica entre fumantes paquistaneses foi estimada em 81,6%, com 3,5 vezes mais chances de apresentar a doença. Além disso, tabagistas pesados apresentaram prevalência de periodontite significativamente maior bem como periodontite mais grave que fumantes moderados e leves. Um estudo recentemente publicado, acompanhou por 40 anos a população de plantadores de chá do Sri-Lanka com o objetivo de avaliar a história natural da periodontite. Esse estudo reforçou ainda mais o papel do tabagismo no estabelecimento da periodontite (RAMSEIER et al., 2017).

1.4. Citocinas

Nos últimos anos, muitas pesquisas científicas têm focado na compreensão do processo de etiopatogênese das doenças periodontais por meio do estudo dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta imunoinflamatória e no processo de destruição dos tecidos periodontais. Neste contexto, a identificação e a quantificação de biomarcadores que atuam na saúde e na doença periodontal como, por exemplo, citocinas, têm sido realizadas em diferentes fontes biológicas incluindo tecido gengival, fluido gengival (DUARTE et al., 2015), saliva (JAEDICKE et al., 2016) e soro (PUSSINEN et al., 2007).

O processo de formação de proteínas se inicia pelo gatilho dos fatores de transcrição no processo de transcrição que consiste na transferência da informação presente no DNA para a formação do RNA mensageiro. A tradução, por sua vez, é o processo final dessa cascata de sinalização, onde as moléculas de RNA fazem a ponte entre a sequência dos nucleotídeos no DNA e a formação das proteínas envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos do organismo (KOVARIK et al., 2017). Citocinas são proteínas produzidas por diferentes tipos celulares que atuam em receptores específicos e modulam a função da própria célula ou de outras células, proporcionando um desfecho de sinalização intracelular capaz de ativar os fatores de transcrição (DINARELLO, 2007). A superfamília das citocinas inclui interleucinas (IL), quimiocinas, fator estimulador de colônias (CFS), interferons (INF), fatores de crescimento transformador (TGF) e fatores de necrose tumoral (TNF). Os membros da superfamília das citocinas podem apresentar propriedades pleiotrópicas (ações biológicas múltiplas), redundantes (ações biológicas compartilhadas), antagônicas e/ou sinérgicas bem como com atividades pro-e/ou anti-inflamatórias (DINARELLO, 2007, FIETTA et al., 2015, MONASTERO & PENTYALA, 2017).

Assim como em outras doenças infecciosas e inflamatórias, existe uma complexa rede de citocinas que atuam no início e progressão das periodontites (OKADA & MURAKAMI, 1998, STADLER, et al. 2016).

A estimulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias é um passo essencial para a ativação da defesa inata eficaz do hospedeiro e, posteriormente, para a modulação das respostas imunes adaptativas. A IL-1 β é uma das citocinas pró-inflamatória mais importantes, liberada principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por células não imunes, tais como fibroblastos e células endoteliais durante lesão celular, infecção e inflamação. A mesma atua

um papel chave na indução de resposta inflamatória e imunológica à antígenos, estando relacionada ao aumento dos níveis de prostaglandinas, metaloproteínas, outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e biomarcadores relacionados à osteoclastogênese. A IL-1 β é ainda em grande parte responsável pela resposta da fase aguda, que inclui febre, síntese aguda de proteínas, anorexia e sonolência. A IL-1 β possui um antagonista específico denominado IL-1ra. A IL-1ra se liga de forma competitiva ao seu receptor mas não desencadeia sinal celular, bloqueando assim as alterações intracelulares mediadas pela IL-1 β (DINARELLO, 1996, DINARELLO, 2007, NETEA et al., 2010).

A IL-2 é o principal fator estimulador de células T, sendo fator de crescimento e ativador para todas as subpopulações de linfócitos T. Essa citocina atua também como ativadora para células B, juntamente com a IL-4. A IL-2 que é produzida pelas células CD4+ e em menor quantidade pelos linfócitos CD8+ pode atuar sobre essas mesmas células, apresentando atuação autócrina ou em outras células apresentando função parácrina. Uma vez que a IL-2 é necessária para a geração de células T citotóxicas, a mesma constitui a base para várias vacinas, mas pode também limitar o sucesso do transplante de medula óssea (DINARELLO, 2007, ZHANG & AN, 2007).

A IL-4 é uma citocina multifuncional com propriedades anti-inflamatórias significativas que desempenha um papel crítico na regulação das respostas imunes, estando envolvida no crescimento das células B e na diferenciação da resposta Th2. A IL-4 está também relacionada à processos alérgicos. Nas células B ativadas, a mesma estimula a síntese de IgE e de IgG, sendo seu efeito antagonizado pelo INF- γ . Dentre outras ações biológicas da IL-4 estão a inibição da ativação de macrófagos, pelo bloqueio os efeitos de INF- γ e a estimulação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, favorecendo a adesão de linfócitos, monócitos e eosinófilos durante o processo imunoinflamatório.

A IL-5 é uma citocina pertencente à família da cadeia comum de β , juntamente com o CSF de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que se liga à um receptor heterodímero específico. Essa citocina desempenha um papel fundamental na diferenciação de eosinófilos na medula óssea bem como recrutamento e ativação dessas células em locais de inflamação alérgica. Além disso, atua na prevenção da apoptose de eosinófilos. As células T helper (Th)2, os mastócitos, as células progenitoras CD34+, as células linfóides inatas e os eosinófilos são as principais fontes de IL-5. Evidências científicas demonstram que a inflamação eosinofílica dos

pulmões em pacientes asmáticos está associada a níveis elevados de IL-5 (VARRICCHI et al., 2016).

A IL-6 foi descoberta em 1986 como um fator estimulador para as células B e inicializador para a produção de IgG. Mais tarde, pesquisas científicas demonstraram que a IL-6 é uma citocina multifuncional que regula inúmeros processos biológicos, incluindo o desenvolvimento de órgãos, regeneração tecidual, respostas de fase aguda, inflamação e respostas imunes, sendo intensamente regulada durante a infecção e a inflamação. Além de desempenhar vários papéis fisiológicos importantes, a desregulação da IL-6 está associada à uma série de doenças auto-imunes e inflamatórias, anormalidades metabólicas e cânceres. As ações biológicas da IL-6 durante o processo de inflamação é complexa pois, além de suas propriedades pró-inflamatórias bem reconhecidas, também apresenta efeitos anti-inflamatórios em determinadas situações. Tem sido sugerido que a sinalização clássica da IL-6 é anti-inflamatória, enquanto que sua a sinalização trans é pró-inflamatória. A sinalização clássica da IL-6 está implicada na síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, que possuem propriedades anti-inflamatórias e são indispensáveis para a defesa imune. Em várias doenças inflamatórias e auto-imunes, bem como cânceres associado à inflamação, a sinalização trans-IL-6 exerce ação pró-inflamatória (SU et al., 2017).

A IL-7 foi descoberta nos anos 80, como um dos membros da superfamília IL-2, que inclui IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Tem sido sugerido que a IL-7 desempenha um papel crítico no desenvolvimento das células B, uma vez que algumas evidências apontam que a IL-7 atua no receptor das células pré-B e, portanto, na sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B. Além disso, a maioria dos subpopulações de células T dependem da IL-7 para sobrevivência. Alterações nos níveis dessa citocinas e em seu receptor consituem fatores de risco para uma série de doenças autoimunes ou envolvem respostas imunes e inflamatórias, incluindo esclerose múltipla, diabetes tipo 1, artrite reumatóide, cirrose biliar primária, doença intestinal inflamatória, dermatite atópica, alergia por inalação e sarcoidose (LUNDSTRÖM et al., 2012).

A IL-8 foi a primeira quimiocina a ser caracterizada e é uma citocina pró-inflamatória multifuncional produzida sob condições inflamatórias (BAGGIOLINI et al., 1997). A IL-8 é secretada por diversas células, incluindo células mesoteliais, células tumorais, neutrófilos, células endoteliais e monócitos. A mesma responde aos sinais inflamatórios por meio de duas ações

biológicas primárias: a indução da atividade migratória e fagocítica em células alvo e a promoção da angiogênese. Como membro da família de quimiocinas CXC, a IL-8 desempenha um papel importante como um agente quimioatrativo e ativador de neutrófilos. Uma vez que as células alvo atingem o local da inflamação, a IL-8 induz a atividade fagocítica dessas células. Finalmente, a IL-8 também é um potente promotor da angiogênese pela ativação da via do fator de crescimento endotelial vascular (DONG & ZHENG, 2015).

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora pleiotrópica importante na proteção do hospedeiro contra infecção, auto-imunidade e alergia. A IL-10 foi inicialmente caracterizada como uma citocina específica da resposta Th2. No entanto, investigações adicionais mais recentes revelaram que a produção de IL-10 também estava associada às respostas de células T reguladoras (Treg). Atualmente, é reconhecido que quase todas as células envolvidas nas respostas imune inata e adaptativa podem expressar IL-10, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células exterminadoras naturais, eosinófilos, neutrófilos, células B e células T CD8+ e Th1, Th2 e Th17 CD4+. Suas propriedades anti-inflamatória são necessárias para regular as respostas imunes contra os antígenos microbianos, evitar inflamações excessivas durante o curso de uma infecção, e manter o equilíbrio entre a imunidade eficaz e proteção tecidual (NG et al., 2013, RUTZ & OUYANG, 2016).

A IL-12 foi o primeiro membro da superfamília de citocinas do tipo IL-12 a ser identificada. É uma proteína heterodimérica composta duas subunidades, p35 e p40, segregadas por células fagocíticas em resposta a agentes patogênicos. Essa citocina é produzida principalmente por células fagocíticas em resposta a bactérias, produtos bacterianos e parasitas intracelulares e, até certo ponto, por linfócitos B. As principais funções da IL-12 são induzir a produção de INF- γ pelas células T e exterminadoras naturais, atuar como um fator de crescimento para células exterminadoras naturais e T ativadas, aumentar a atividade citotóxica de células exterminadoras naturais e favorecer a geração de linfócitos T citotóxicos. A IL-12 está envolvida também no desenvolvimento da resposta Th1 e representa uma ligação importante entre as imunidades inata e adaptativa (TRINCHIERI, 1995, ZUNDLER & NEURATH, 2015).

A IL-13 foi reconhecida pela primeira vez por seus efeitos sobre células B e monócitos. Os efeitos mais evidentes da IL-13 incluem a inibição da produção de citocinas inflamatórias, promoção da diferenciação e sobrevivência de eosinófilos e mastócitos, ativação de fibroblastos, elevação da hiperreatividade brônquica e a mudança da produção de anticorpos de células B de

IgM para IgE. A mesma foi considerada por muitos anos funcionalmente redundante à IL-4, por compartilhar as mesmas ações biológicas. No entanto, estudos realizados em ratos *knockout* demonstram que a IL-13 possui várias funções efetoras peculiares que a distinguem da IL-4. Essa citocina apresenta propriedades pleiotrópicas e induz respostas de ativação que contribuem para diversas doenças inflamatórias, incluindo asma e esclerose sistêmica (WYNN, 2003).

A família de citocinas IL-17 é composta por seis membros bem definidos, da IL-17A até a IL-17F. Entre os membros dessa família, a IL-17A e IL-17F possuem atividades pró-inflamatórias melhor caracterizadas, responsáveis pela iniciação e propagação da inflamação. A IL-17 ocupa um papel central na resposta Th17 e desempenha um efeito protetor contra a infecção. Entretanto, o excesso da mesma promove patologia e destruição tecidual, incluindo reabsorção óssea (LIAO et al., 2017). Após exposição a agentes patogênicos incluindo bactérias, fungos ou vírus, as células mieloides produzem fatores que promovem a produção de IL-17 a partir de células da respostas imune inatas e adaptativas. Primeiramente, a IL-17 age em células epiteliais, macrófagos e células mielóides, induzindo a produção de quimiocinas e citocinas antimicrobianas. As quimiocinas induzidas por IL-17, por sua vez, recrutam neutrófilos e outras células imunes para o local da infecção e restringem a patogênese. Por outro lado, esta via pode mediar inflamação excessiva e uma patologia exacerbada no meio infeccioso. A IL-17 está portanto associada ao estabelecimento e propagação de estímulos inflamatórios em várias doenças como artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, espondilite e periodontite (DAS & KHADER, 2017).

IL-21 é o membro mais recentemente descoberto da família de citocinas tipo 2. Estruturalmente, a IL-21 é homóloga à IL-2, IL-4 e IL-15. Com base na sua estrutura, na composição do seu receptor e nas suas atividades biológicas, a IL-21 participa da imunidade inata e adaptativa e é importante para o desenvolvimento da resposta imune Th1. Estudos demonstraram que a IL-21 tem efeitos pleiotrópicos exercendo funções de proliferação, diferenciação e efetoras de células B, T, exterminadoras naturais e dendríticas. Além disso, suas funções biológicas pleiotrópicas incluem a promoção da diferenciação das células Th17 na presença do fator de crescimento transformador- β , ativação das células exterminadoras naturais e CD8 e interrupção da produção de IgG pelas células B (HABIB et al., 2003, MEHTA et al., 2004).

IL-23 é um membro da superfamília de citocinas do tipo IL-12 constituída por duas subunidades IL-23p19 e p40. A mesma é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos ativados, que induz a produção de IL-17 e outras citocinas relacionadas às células T, estando envolvida na maturação das células Treg e na resposta Th17. A IL-23 está envolvida não apenas nas respostas à infecção microbiana, mas também desempenha papéis significativos em doenças autoimunes e inflamatórias, estando implicada na patogênese de doenças como psoríase, espondilite anquilosante ou doença de Crohn (FLOSS et al., 2015, WELSBY & GORIELY, 2016).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória clássica envolvida nas respostas imune inata e Th1. Esta citocina regula diversas funções celulares, incluindo a proliferação celular, apoptose e, juntamente com IL-1, exerce função inflamatória em células endoteliais, leucócitos e fibroblastos. O TNF- α tem efeitos multibiológicos, estimulando uma cascata de sinalização complexa que controla várias funções intracelulares. Seu principal papel consiste na defesa do hospedeiro em estados inflamatórios, infecciosos e neoplásicos uma vez que apresenta uma ampla gama de efeitos biológicos e imunológicos, incluindo ação antiviral, regulação do crescimento e imunomodulação. Os macrófagos ativados são os principais produtores de TNF- α , mas o mesmo pode ser produzido também por vários tipos celulares, tais como células linfócitos, miócitos cardíacos, células endoteliais, mastócitos, fibroblastos, neurônios e adipócitos. O aumento da produção de TNF- α tem sido relacionado à patogênese de vários distúrbios, como artrite reumatóide, doença de Crohn, espondiloartropatias, psoríase, periodontite bem como aterosclerose, DM e síndrome metabólica (ROSENBLUM & DONATO, 1989, ŠEDÝ et al., 2014).

A proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α é um membro da família de quimiocinas CC identificada em 1988 que apresenta efeitos quimiotáticos e pro-inflamatórios, principalmente associados à adesão e migração celular. Além de suas atividades pró-inflamatórias, MIP-1 α inibe a proliferação de células-tronco hematopoiéticas. Esta quimiocina é produzida por muitas células, particularmente macrófagos, células dendríticas, linfócitos e fibroblastos e tem sido relacionada a doenças como artrite e esclerose múltipla (COOK, 1996, MAURER & VON STEBUT, 2004).

O CSF de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) foi originalmente identificado como um CSF devido à sua capacidade de induzir a formação de populações de granulócitos e macrófagos a partir de células precursoras. No entanto, ao contrário do CSF de macrófago (M-CSF) e CSF de

granulócitos (G-CSF), foi observado que a maioria das células mielóides não requerem o GM-CSF para mielopoiese. Além disso, muitas evidências científicas demonstraram que o GM-CSF também é uma citocina imunomoduladora, capaz de afetar não só o fenótipo das células da linhagem mielóide, mas também de ativar as células T. Na inflamação, o GM-CSF possui funções pró-inflamatórias proeminentes e funciona como um canal de comunicação entre linfócitos invasores de tecido e células mielóides. O mesmo tem sido também implicado no sustento de várias doenças auto-imunes, como artrite e esclerose múltipla (BHATTACHARYA et al., 2015, BECHER et al., 2016).

INF- γ é um mediador chave das respostas imunes e inflamatórias induzidas principalmente pela IL-12. Embora a secreção dessa INF- γ por células imunes inatas e adaptativas seja essencial para o controle de patógenos e tumores intracelulares, sua produção excessiva contribui para doenças auto-imunidade e inflamatórias. O INF- γ é secretado predominantemente por células T e células de exterminadoras naturais e, em menor grau, por outros tipos de células, como macrófagos, células dendríticas e células B. Durante a resposta imune inata, o INF- γ é produzido por células exterminadoras naturais, bem como macrófagos e células dendríticas. Na imunidade adaptativa é produzido por células TCD8+ para controle da infecção e pela subpopulação de células Th1, que promove respostas inflamatórias, eliminação de patógenos intracelulares e mudança de classe para IgG. O INF- γ é, portanto, uma das principais citocinas que distingue as células Th1 de outros subconjuntos de células CD4+, incluindo Th2, Th17 e Treg (POLLARD et al., 2013).

O TGF- β é uma citocina produzida por muitos tipos de células imunes e não-imunes que desempenha um papel crítico nas respostas imunológicas. O TGF- β exerce efeitos pleiotrópicos na imunidade tendo como foco as células T. Dependendo da presença de outros fatores secretados, o TGF- β pode suprimir respostas imunes adaptativas pela indução e estabilização da função das células Tregs e pela supressão direta das células Th1, Th2 e TCD8+ ou, aumentar as respostas adaptativas pela indução de células Th17 e células efetoras. Essa citocina possui também outras propriedades pleiotróficas importantes na homeostase do tecido conjuntivo, estimulando o remodelamento do tecido e a cicatrização de feridas pelo aumento da proliferação de fibroblastos, angiogênese e produção de matriz extracelular. Além disso, o TGF β também é um potente inibidor das metaloproteinases da matriz e, assim, reduz a degradação do colágeno (TU et al., 2014, TRAVIS & SHEPPARD, 2014).

É importante salientar que embora cada citocina tenha uma função específica, as mesmas atuam em rede, estimulando ou inibindo umas as outras tanto em situações fisiológicas, como em situações patológicas inflamatórias e infecciosas. Quando uma infecção é instalada, por exemplo, os padrões moleculares associados aos patógenos são reconhecidos por receptores reconhecedores de patógenos. Em seguida, respostas inflamatórias e da imunidade inata são desencadeadas, induzindo a liberação de proteinases (elastases, metaloproteinases [MMP]) e citocinas, dentre as quais se destacam a IL-1 β , IL-8, IL-6, MIP-1 α e TNF- α (ALBIGER et al., 2007). A resposta imune inata, por sua vez, inicia o desenvolvimento da resposta imune adaptativa por meio da ativação de linfócitos B e T. As células T podem se diferenciar em linfócitos citotóxicos CD8 $^{+}$ ou auxiliares CD4 $^{+}$. Os linfócitos CD4 $^{+}$, por sua vez, podem se diferenciar nos fenótipos T auxiliares (Th)-1, Th2 ou Th17, com diferentes perfis de citocinas e funções, ou em linfócitos T regulatórios (Treg), com funções supressoras (FIETTA & DELSANTE, 2009). As células Th1 e Th17 produzem respostas pró-inflamatórias e antagonizam as respostas “protetoras” anti-inflamatórias/supressoras dos linfócitos Th2 e Treg. As principais citocinas pró-inflamatórias relacionadas à resposta Th1 e Th17 são o INF- γ e a IL-17, enquanto as citocinas que se destacam na resposta Th2 compreendem a IL-4 e a IL-10 (FIETTA & DELSANTE, 2009). As células Treg exercem suas funções regulatórias por meio de citocinas com funções supressivas como a IL-10 e o TGF- β . A IL-23, por sua vez, promove a estabilização das células Th17 e a expansão da resposta Th17. O TGF- β estimula o fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3), e é capaz de originar as células Treg. Por outro lado, a IL-6, na presença de uma infecção, inibe a geração de células Treg e induz a diferenciação de células Th17 na presença de TGF- β (FIETTA e DELSANTE, 2009). Em suma, a ativação dos mecanismos de inflamação e das respostas imunes inata e adaptativa mediada por citocinas acima descritas, dentre outros mecanismos, é necessária para que ocorra a eliminação do patógeno e o restabelecimento da integridade tecidual.

1.5. Níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com periodontite

Diversos estudos têm sugerido que a periodontite induz um estado crônico de inflamação sistêmica. Nos últimos anos, algumas hipóteses foram levantadas para explicar o impacto da periodontite nos níveis circulantes de mediadores inflamatórios. Durante o processo de infecção periodontal, as bactérias e/ou seus fatores de virulência, como lipopolissacarídeos, podem

disseminar dos sítios periodontais inflamados para a circulação. Em resposta à essa bacteremia e aos antígenos bacterianos sistematicamente dispersos, células do sistema imunológico, bem como células teciduais e endoteliais, podem produzir mediadores inflamatórios (PASSOJA et al., 2010). Além disso, os mediadores inflamatórios produzidos localmente nos tecidos periodontais durante a progressão da periodontite podem ser diretamente liberados na circulação, exercendo efeitos distantes dos sítios periodontais (LOOS et al., 2005). Como uma via de mão dupla, o estado pró-inflamatório sistêmico em indivíduos com doenças periodontais pode aumentar a destruição dos tecidos periodontais e, assim, constituir um fator de susceptibilidade adicional para a progressão da doença periodontal (PASSOJA et al., 2010).

Baseado nessas hipóteses da relação entre periodontite e biomarcadores sistêmicos, diversos estudos foram desenvolvidos nas duas últimas décadas avaliando os níveis séricos de citocinas em pacientes com diferentes tipos de doenças periodontais, incluindo gengivite, periodontites crônica e agressiva.

Em 2000, Loos et al. reportaram maiores níveis séricos de IL-6 em pacientes com periodontite quando comparado aos sem periodontite. Mais tarde, Górska et al. (2003) avaliaram os níveis séricos de IL-1 β , IL-2, INF- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 em pacientes com periodontite crônica avançada e periodontalmente saudáveis. Os níveis de todas as citocinas estudadas, exceto de IL-4, foram maiores nos pacientes com doença. Por outro lado, Ikezawa et al. (2005) não observaram diferenças significantes nos níveis séricos de TNF- α entre pacientes portadores de periodontite crônica e sem periodontite. Corroborando esses achados, Yamazaki et al. (2005) também não encontraram diferenças estatisticamente significantes nos níveis sistêmicos de TNF- α e IL-6, entre pacientes com e sem periodontite.

Em 2008, de Queiroz et al. avaliaram os níveis sanguíneos de várias citocinas por meio de um ensaio multiplex de citometria de fluxo entre pacientes com e sem periodontite. Dentre as citocinas estudadas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, IL-9, IL-10, MIP-1 α , MIP-1 β , eotaxina, G-CSF, GM-CSF, RANTES [*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*], proteína quimioatrativa para monócito (MCP)-1, IL-17, TNF, INF- γ e monocina induzida por INF- γ [MIG], os níveis de RANTES foram menores enquanto os de níveis de MIG e eotaxina foram maiores no grupo com periodontite, quando comparado ao controle periodontalmente saudável.

Em 2009, Sun et al. avaliaram os níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com periodontite agressiva e verificaram que os níveis dessa citocina pro-inflamatória estavam maiores nos pacientes com doença, quando comparado aos controles sem periodontite. Esses achados em relação à maiores níveis séricos de IL-6 em pacientes com periodontite também foram reportados por Marcaccini et al., em 2009. Shimada et al. (2010) comparam os níveis séricos de IL-6 e TNF- α entre pacientes com periodontite crônica e controles periodontalmente saudáveis e verificaram maiores níveis de IL-6 nos pacientes doentes. Entretanto, os níveis de TNF- α não diferiram entre os grupos. Os níveis séricos dessas mesmas citocinas foram avaliados por Nakajima et al. (2010) em japoneses com periodontite e periodontalmente saudáveis. Os resultados demonstraram maiores níveis de IL-6 e menores níveis de TNF- α no soro dos pacientes com periodontite. Duarte et al. (2010) relataram que indivíduos com periodontite agressiva generalizada apresentaram níveis mais elevados de TNF- α e IL-17 que os indivíduos com periodontite crônica generalizada e sem periodontite. Esses dados corroboram os achados de Schenkein et al. (2010) que demonstraram níveis mais elevados de IL-17 no soro de pacientes com periodontite agressiva localizada e generalizada. Passoja et al. (2010) avaliaram os níveis circulantes de IL-10 e TNF- α em um grupo de pacientes com periodontite crônica e um grupo de pacientes com mínima inflamação periodontal. De acordo com os resultados, houve uma associação negativa entre a extensão do sangramento à sondagem e o número de sítios com PS e perda de inserção ≥ 4 mm e os níveis séricos de IL-10. Além disso, indivíduos com periodontite apresentaram níveis séricos de TNF- α bem como a razão TNF- α /IL-10 mais elevados que o grupo controle.

Davies et al. (2011) não encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-18 entre pacientes com periodontite agressiva e sem periodontite. Por outro lado, Sánchez-Hernández et al. (2011) reportaram níveis mais altos de IL-12 no soro de pacientes com periodontite agressiva e de IL-18 nos pacientes com periodontite crônica, quando comparado aos pacientes sem periodontite. Robati et al. (2011) compararam os níveis séricos de IL-4, IL-6 e IL-12 entre pacientes periodontalmente saudáveis e portadores de periodontite agressiva generalizada. Os autores observaram menores níveis de IL-4 e maiores níveis de IL-6 nos pacientes doentes. Ainda em 2017, Ozçaka et al. reportaram níveis plasmáticos de IL-17 similares entre pacientes com periodontite crônica e periodontalmente saudáveis.

Em 2012, Loo et al. demonstraram que os níveis séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4 foram significativamente mais elevados em pacientes com periodontite, em comparação aos controles saudáveis. Gokul et al. (2012) também demonstram que os níveis circulantes de TNF- α estavam mais elevados em pacientes com periodontite. De acordo com Li et al. (2012), os níveis séricos de IL-2 e IL-8 foram maiores nos pacientes com periodontite crônica que nos indivíduos saudáveis. Por outro lado, neste mesmo ano, Becerik et al. (2012) não observaram diferenças estatísticas entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-6 entre pacientes com diferentes tipos de doenças periodontais (periodontite crônica, periodontite agressiva generalizada e gengivite) e saúde periodontal.

Zimmermann et al. (2013) não observaram diferenças nos níveis séricos de TNF- α e IL-6 entre pacientes com e sem periodontite. Da mesma forma, Cetinkaya et al. (2013) também não observaram diferenças nos níveis séricos de IL-1 β e IL-10 entre pacientes com e sem periodontite. Apoiando esses achados, Mattuella et al. (2013) não encontraram diferenças significativas nos níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ entre pacientes com periodontite crônica, agressiva e sem periodontite.

Gümüş et al. (2014) reportaram que os níveis séricos de TNF- α foram mais elevados em pacientes portadores de periodontite crônica e agressiva quando comparado aos pacientes sem periodontite. Neste mesmo ano, Napimoga et al. (2014) também observaram que pacientes portadores de periodontite crônica apresentavam maiores níveis séricos de TNF- α , comparado aos periodontalmente saudáveis. Keles et al. (2014) observaram que indivíduos portadores de gengivite e periodontite crônica apresentaram maiores níveis séricos de IL-6, quando comparados à indivíduos periodontalmente saudáveis.

Boström et al. (2015) compararam os níveis séricos de uma gama de citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ e MIP-1 α) por meio do ensaio multiplex entre pacientes com e sem periodontite. De acordo com os resultados, os níveis sistêmicos de nenhuma das citocinas estudadas foi diferente entre os grupos. Mendoza-Azpur et al. (2015) demonstraram que os níveis séricos de TNF- α não foram diferentes entre pacientes com e sem periodontite. Neste mesmo ano, Chen et al. (2015) compararam os níveis plasmáticos IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- γ entre pacientes com e sem periodontite. Das citocinas estudadas, apenas as taxas de IL-17 foram mais elevadas nos pacientes doentes.

Como a maioria das doenças crônicas, a periodontite compartilha muitos fatores que atuam como risco para a inflamação sistêmica alterada incluindo, estresse, obesidade, DM e tabagismo. Neste contexto, alguns estudos avaliaram as taxas sistêmicas de citocinas em pacientes portadores de periodontite apresentando DM. Entretanto, um número muito restrito de estudos (apenas dois) focaram na avaliação dos níveis circulantes de citocinas em fumantes com periodontite.

Em relação ao DM, Dağ et al. (2009) não observaram diferenças nos níveis sistêmicos de TNF- α entre pacientes com DM (mal e bem controlados) e pacientes não-diabéticos com periodontite. Em 2014, Longo et al. avaliaram a influência do DM controlado e não-controlado associado à periodontite nos níveis séricos de IL-6, IL-8 e MCP-1. Não foram encontradas diferenças entre os grupos para as citocinas estudadas. Acharya et al. (2015) avaliaram os níveis séricos de IL-10 em pacientes com periodontite e/ou DM. Os autores observaram que, os níveis dessa citocina anti-inflamatória foram maiores no grupo controle periodontalmente e sistemicamente saudável. Além disso, o grupo que apresentava apenas periodontite crônica exibiu os menores níveis séricos de IL-10. Mais tarde, esse mesmo grupo de pesquisa (Acharya et al. 2017) compararam os níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), bem como suas proporções, entre pacientes com DM portadores ou não de periodontite, pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite e pacientes sistemicamente e periodontalmente saudáveis. De acordo com os resultados, as proporções entre as citocinas pro- e anti-inflamatórias foram menores no grupo controle em relação aos demais grupos doentes. Além disso, os pacientes com DM e periodontite apresentaram as maiores proporções de citocinas pró-inflamatórias em relação às anti-inflamatórias.

Em relação ao tabagismo, Ikezawa-Suzuki et al. (2008) não encontraram diferenças nos níveis séricos de TNF- α entre fumantes e não-fumantes com periodontite crônica. Anil et al. (2013) observaram maiores níveis da quimiocinas MCP-1 no soro de pacientes fumantes com periodontite, quando comparado aos não-fumantes com e sem periodontite.

Assim, existem evidências científicas de que a periodontite pode contribuir para a carga inflamatória sistêmica, alterando os níveis de algumas citocinas, o que pode, em última análise, aumentar o risco de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e complicações relacionadas ao DM. Entretanto, até o presente momento, há poucas evidências sobre o possível papel do DM e do tabagismo na alteração dos níveis circulantes de citocinas e na modificação do estado

inflamatório sistêmico induzido pela periodontite. Além disso, o feito combinado do DM e do tabagismo nas citocinas circulantes não foi investigado.

2. Proposição

O objetivos deste estudo foram:

- 1- Avaliar as razões entre citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro de pacientes com periodontite crônica generalizada;
- 2- Avaliar as razões entre citocinas pró- e anti-inflamatórias no soro de pacientes com periodontite crônica generalizada apresentando DM tipo 2, hábito de fumar e ambas as condições;
- 3- Avaliar as interrelações entre as citocinas presentes no soro de pacientes com periodontite crônica generalizada com e sem esses fatores de riscos.

3. Artigo Científico

The ratios between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the serum of patients with chronic periodontitis with and without type 2 diabetes and/or smoking habit.

Artigo submetido ao Clinical Oral Investigations

Abstract

Objective: This study assessed the impact of chronic periodontitis (CP) and CP associated with type 2 diabetes mellitus (DM) and/or smoking on the serum ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Materials and methods:** Subjects were assigned into one of the following groups: Control (n=25)- non-diabetic non-smokers with no history of periodontitis; CP (n=26)- non-diabetic non-smokers with CP; DMCP (n=30)- non-smokers with DM and CP, SCP (n=27)- non-diabetic smokers with CP and, SDMCP (n=22)- smokers with type 2 DM and CP. Serum levels of eighteen cytokines were measured using multiplex immunoassays. **Results:** Six ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines were significantly higher in the CP group than in the control group ($p < 0.05$). Eleven, seventeen and nine ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines were significantly higher in the DMCP, SCP and SDMCP groups than in the control group, respectively ($p < 0.05$). The SCP group presented higher serum ratios of tumor necrosis factor (TNF)- α /interleukin (IL)-4, TNF- α /IL-5, IL-17/IL-13 and IL-6/IL-13 ($p < 0.05$) than the CP group. Cluster analysis revealed a relevant cluster composed of ten cytokines (IL-17, IL-23, interferon- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-6, IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]) in the serum of subjects from the DMCP group. **Conclusions:** The ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines shifts to favor a proinflammatory status in the serum of patients with CP and even more when CP is associated with one or both risk factors. **Clinical Relevance:** CP and CP associated with hyperglycemia and/or smoking might contribute to a systemic inflammatory burden and increased risk of systemic complications.

Introduction

Cytokines are biologically active proteins that are secreted in a sequential cascade during infectious and inflammatory processes, in turn playing a specific role in the communication between cells. The cytokine superfamily includes interleukins (IL), chemokines, colony-stimulating factors (CFS), interferons (IFN), transforming growth factor (TGF) and tumor necrosis factor (TNF); all of these exhibit pleiotropic (multiple), redundant (shared), antagonistic and/or synergistic biological activities [1-3].

Previous investigations have shown that the different groups of cytokines are produced locally in the periodontal tissues and that imbalances in these molecules are involved in the pathogenesis of periodontal diseases [4-6]. Diabetes mellitus (DM) and smoking are well-known risk factors for periodontitis, as several investigations have shown that both increase the prevalence, severity and progression of disease [7]. Although the exact biological mechanisms that make these factors risks for periodontitis are still unclear, evidence suggests that DM and smoking might modify the nature of the inflammatory, innate and adaptive immune responses against pathogens and local cytokine networks [8-11].

Besides its local effects, it has been suggested that periodontitis, like other chronic infections, might contribute to a low-grade systemic inflammatory burden. This inflammatory burden is related to the release of bacterial and virulence factors and/or inflammatory mediators from the periodontal tissues into the bloodstream. In turn, these factors may alter the circulating levels of cytokines and enhance the risk for cardiovascular diseases, insulin resistance and DM-related complications, among other systemic diseases [12-22]. To date, there is little evidence regarding the impact of CP, combined with hyperglycemia and tobacco exposure, on circulating levels of cytokines and the systemic inflammatory state [19, 23-27]. Therefore, the main aim of

this study is to assess the impact of CP and CP associated with type 2 DM, smoking habit or both conditions on the ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines in the serum. The secondary aim was to assess the relationships among serum cytokines in subjects presenting CP, with and without these risk factors. All cytokines studied (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, TGF- β , IFN- γ , TNF- α , macrophage inflammatory protein [MIP]-1 α and granulocyte macrophage-CSF [GM-CSF]) are thought to be critical for the pathogenesis of periodontitis, DM and complications related to smoking.

Material and Methods

Study Population

Subjects with generalized CP and periodontal health (PH) were consecutively selected from the population seeking treatment in the Periodontal Clinic of Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil) and distributed into one of the following groups: control: non-diabetic non-smokers with no history of periodontitis; CP: non-diabetic non-smokers with CP; DMCP: non-smokers with type 2 DM and CP, SCP: non-diabetic smokers with CP and, SDMCP: smokers with type 2 DM and CP. During the screening of volunteers, the levels of glycated hemoglobin (HbA1c; High-performance Liquid Chromatography method) and fasting plasma glucose (FPG; Glucose Oxidase method) were assessed by the Guarulhos University Clinical Analysis Laboratory. All eligible individuals were invited to participate in the study, informed of its nature, potential risks and the benefits of their participation in the study and signed their informed consent. This study protocol was approved by the Ethics Committee in Clinical Research of the Guarulhos University (CAAE: 25526913.8.0000.5506). Subjects were referred to the University Dental Clinic in order to receive periodontal treatment, as necessary.

Inclusion criteria

General - All subjects were > 30 years old, had at least 15 teeth, excluding third molars.

Subjects with CP - Subjects with CP had generalized [28] disease, defined as >30% of sites with concurrent probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) \geq 4mm and bleeding on probing (BoP), and a minimum of six teeth distributed in the four quadrants presenting at least one site with PD and CAL \geq 5 mm and BoP.

Subjects with PH - Subjects with no history of periodontitis, no sites with PD and CAL > 3 mm concurrently and <10% of the sites with gingival bleeding and/or BoP.

Smokers - Cigarette smoking history was obtained by questionnaire. The smokers should have smoked at least 10 cigarettes per day for at least the past 10 years.

Diabetic subjects - The diabetic subjects required a diagnosis of DM confirmed by a physician, dating from at least 3 years prior to the study. In addition, all diabetic patients were required to have a glycated HbA1c > 6.5% and FPG > 99 mg/dl.

Non-diabetics - Subjects with no history of DM presenting HbA1c \leq 6.0% and FPG < 99mg/dl.

Non-smokers - The non-smokers had never smoked.

Exclusion criteria

Exclusion criteria were: pregnancy, breast-feeding, subgingival periodontal therapy during the previous 12 months, use of antibiotic, anti-inflammatory, and/or immunosuppressive therapies during the previous 6 months, regular use of mouthrinses containing antimicrobials, use of orthodontic appliances, presence of other infectious, immunological and/or inflammatory systemic conditions (e.g. immunological disorders, rheumatoid arthritis, obesity [defined as BMI \geq 30kg/m²], etc.) and major complications of DM (i.e. ulcers, gangrene, amputation, neuropathy and nephropathy).

Periodontal measurements

One examiner (T.S.M) performed clinical examinations. The following parameters were assessed at six sites per tooth, excluding third molars, using a periodontal probe (UNC15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA): plaque accumulation (1/0), BoP (presence/absence), PD (mm) and CAL (mm). Calibration was performed according to Araujo [29], and the standard error of measurement (SE) was calculated. The intra-examiner variability was 0.22mm for PD and 0.23mm for CAL. The agreement for categorical variables (i.e. BoP, MB) was 94% (Kappa-light test).

Cytokine evaluation

Fasted peripheral blood samples were collected in the morning, within one week after clinical examination, into an appropriate tube (Serum BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tubes, BD, Franklin Lakes, NJ). Immediately after blood collection, the serum was separated by centrifugation (10 min at 1,300 rpm, 4°C) and stored in aliquots at -80°C.

The serum levels of eighteen cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-21, IL-23, TGF- β 1, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α and GM-CSF) were analyzed by means of a multiplex fluorescent bead-based immunoassay using commercially available kits (Milliplex® MAP Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel and Milliplex® MAP TGF- β 1 Single Plex Magnetic Bead Kit, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and a plate reader (Magpix®, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The amount of protein in each sample was extrapolated from standards and calculated using appropriate software (Luminex xPonent® and Milliplex® Analyst 5.1, EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The minimum detectable concentrations for each cytokine were as follows: IL-1 β : 0.14 pg/ml, IL-2: 0.19 pg/ml, IL-4: 1.12 pg/ml, IL-5: 0.12 pg/ml, IL-6: 0.11 pg/ml, IL-7: 0.42 pg/ml, IL-8: 0.13 pg/ml, IL-10: 0.56 pg/ml,

IL-12 (p70): 0.15 pg/ml, IL-13: 0.23 pg/ml, IL-17A: 0.33 pg/ml, IL-21: 0.14 pg/ml, IL-23: 3.25 pg/ml, TGF- β : 6.0 pg/ml, IFN- γ : 0.48 pg/ml, TNF- α : 0.16 pg/ml, MIP-1 α : 0.94 pg/ml and GM-CSF: 0.35 pg/ml.

Statistical Analysis

A post hoc analysis was conducted to determine the power of the analyses presented in this study. Considering differences of at least 0.56 pg/ml for the serum ratio of between IFN- γ /IL-4 (primary outcome variable) between the control and DMCP group and a standard deviation of 0.51 pg/ml, it was determined that 17 subjects per group would provide 90% power with an alpha of 0.05. However, all subjects that met the inclusion criteria during the period of recruitment entered the study.

Clinical data were examined for normality by the Shapiro-Wilk test. The significance of differences for periodontal parameters, age and HbA1c was compared using ANOVA, followed by the Tukey test. The t-test was used to compare years of cigarette smoking, number of cigarettes smoked per day and duration of DM. The significance of differences for gender was compared by the Chi-square test. Ratios were obtained by dividing the absolute serum levels of pro-inflammatory cytokines by the anti-inflammatory cytokine levels. Cytokine data were first transformed using Box-Cox to correct for asymmetry, generate normal distribution of the data and stabilize variance. Subsequently, data were analyzed using mixed-model ANOVA for the comparison of levels and ratios of cytokines with adjustments for age and gender, using individuals as the random effect and, CP, smoking + CP, DM + CP and, smoking + DM + CP as fixed effects (SAS PROC MIXED, SAS 9.1.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). Afterwards, post hoc analyses with the Bonferroni correction were performed. The level of significance for this analysis was set at 5%. The residual analysis validated the assumed models. Pearson correlations

were calculated for all pairs of cytokine in each group. Statistically significant pairs of cytokines were considered and presented when correlation coefficients were ≥ 0.75 and $p < 0.001$. Ward's method and Euclidean distance were applied in hierarchical cluster analysis to group the cytokines into the provided dendrograms.

Results

This study was conducted between August 2013 and September 2016. One hundred and thirty patients ranging from 34 to 70 years of age were selected out of almost 600 screened, totalizing 25 subjects in the control group, 26 in the CP group, 30 in the DMCP group, 27 in the SCP group and 22 in the DMSCP group.

Table 1 presents the demographic characteristics and periodontal parameters of the study population. There were no differences among groups for gender and age. As expected, HbA1c levels were significantly higher in both groups with DM than in the other groups ($p < 0.05$). The control group exhibited lower mean clinical parameters than all the groups with CP ($p < 0.05$). DM treatment included diet, use of oral hypoglycemic agent (metformin) and insulin and did not differ between the two diabetic groups (data not shown).

Table 2 presents the absolute levels of serum cytokines. When compared to the control, the levels of the anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-5, were significantly lower in all groups with CP ($p < 0.05$). The levels of MIP-1 α , IL-6, IFN- γ , IL-17 and IL-7 were lower in the DMCP, SCP and SDMCP groups than in the control group ($p < 0.05$). The levels of IL-13, IL-1 β , IL-12, IL-23 and IL-2 were lower in the DMCP and SCP groups than in the control group ($p < 0.05$). The SCP group presented lower levels of IL-10 and TNF- α , while the DMCP group presented lower levels of GM-CSF than the control group ($p < 0.05$). When compared with the CP

group, the DMCP group exhibited lower levels of IFN- γ , IL-12 and IL-2 ($p < 0.05$). Furthermore, the SCP group presented lower levels of IL-10, IL-4, IL-5, IL-13, MIP-1 α , IL-1 β , IFN- γ , IL-12, IL-17 and IL-2 than the CP group ($p < 0.05$). The levels of IL-5 and IFN- γ were lower in the SDMCP group than in the CP group ($p < 0.05$).

Table 3 presents the serum ratios of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines that achieved statistical significance when comparing the groups ($p < 0.05$). The IL-12/IL-4, IL-17/IL-4, IL-1 β /IL-4, IL-6/IL-4, IFN- γ /IL-4 and IL-1 β /IL-5 ratios were higher in all groups with CP than in the control ($p < 0.05$). The DMCP, SCP and SDMCP groups presented higher ratios of TNF- α /IL-4, IL-17/IL-5 and TNF- α /IL-5 than the control group ($p < 0.05$). The DMCP and SCP groups presented higher ratios of IL-23/IL-4 and IL-6/IL-5 than the control group ($p < 0.05$). The SCP group exhibited higher ratios of TNF- α /IL-10, IL-7/IL-4, IL-12/IL-5, IL-17/IL-13, IL-6/IL-13 and TNF- α /IL-13 than the control group ($p < 0.05$). When compared to the CP group, the SCP group presented higher ratios of TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-5, IL-17/IL-13 and IL-6/IL-13 ($p < 0.05$).

Table 4 presents the correlation coefficients for cytokines. Statistically significant pairs of cytokines were considered when correlation coefficients were > 0.75 and $p < 0.001$. In the control group, IL-5 and IL-13 presented correlation; while in the CP group, statistically significantly correlating pairs of cytokines included MIP-1 α and IL-8, and IL-5 and IL-13. In the DMCP group, statistically significant correlations were identified among IL-13, IL-5 and IL-8. Furthermore, significant correlations were also observed among IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23 and IFN- γ . In the SCP group, statistically significant correlations were observed among IL-17, IL-5 and IL-8. Furthermore, statistically significant pairs of cytokines also included IL-1 β and IL-2, and TGF- β and GM-CSF. In the SDMCP group, statistically significant associations were also observed between TNF- α , MIP-1 α , IL-6 and IL-8. In addition,

IL-1 β and IL-2 correlated significantly in this group. Correlations were all positive. The associations among all cytokines are illustrated in the dendrogram plots (Figure 1).

Discussion

This study assessed the ratios of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in subjects with CP and with CP presenting DM, smoking habit or both conditions. The overall results indicated that CP is related to an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines, in favor of a systemic pro-inflammatory burden. CP, when associated with one or both risk factors (but especially with smoking only), was associated with a circulating profile of cytokines that further favored a pro-inflammatory load. Furthermore, the relationship among cytokines was modulated by each risk factor in a distinctive manner, with a more evident and close interplay between cytokines in non-smokers with DM.

When compared to the control group, the ratios of five pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL17, IL-1 β , IL-6, IFN- γ) to IL-4 and the IL-1 β /IL-5 ratio were higher in the CP group, indicating that periodontal infection might be related to a systemic pro-inflammatory state. These findings are partially supported by previous studies that have shown higher ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in patients with CP than in periodontally healthy controls [13,27]. The majority of studies focusing on the evaluation of the impact of periodontitis on systemic biomarkers have reported on the levels, but not the ratios, of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators. Some studies have reported that the circulating levels of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-17) [12-13, 16-22] were higher while the levels of anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-10) [19,26] were lower in subjects with CP than in periodontally healthy subjects. On the other hand, other investigations have shown that

the systemic levels of cytokines did not differ between patients with and without CP [15, 30-37]. Divergences among studies might be explained by differences in sample size, severity of periodontitis, presence of confounders (e.g. smoking) and the method used to detect the cytokine.

The serum levels of three (IL-4, IL-5, IL-13), four (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13) and two (IL-4 and IL-5) classic anti-inflammatory cytokines were lower in the subjects with CP presenting DM, smoking habit and both conditions, respectively. Furthermore, the levels of the majority of the pro-inflammatory cytokines studied were also lower in at least one of the groups with CP presenting risk factors. One would expect that the absolute levels of anti-inflammatory cytokines should have been lower while the levels of pro-inflammatory cytokines should have been higher in subjects with risk factors, when compared to those without these factors. However, the literature has not been consistent in proving this hypothesis. Some reports have shown that the systemic levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, TGF- β , IFN- γ , TNF- α) did not differ between type 2 diabetics and non-diabetics [38-42] and between smokers and non-smokers [43]. On the other hand, evidence also demonstrates that the levels of cytokines, including IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ and TNF- α , are higher in type 2 DM diabetics than in non-diabetics [38-40] and in smokers than in non-smokers [44]. In agreement with the current findings, other studies have shown reduced levels of cytokines (e.g. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, TNF- α) in the serum of patients with type 2 DM [38, 45] and smoking habit [43]. As pro-inflammatory cytokines amplify and anti-inflammatory cytokines limit inflammatory reactions, the overall effect of an inflammatory response is driven by the balance between them. In the current study, eleven, seventeen and nine ratios between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were higher in the DMCP, SCP and SDMCP groups than in the control group. Of note, the ratios of TNF- α /IL-10, IL-7/IL-

4, IL-12/IL-5, IL-17/IL-13, IL-6/IL-13 and TNF- α /IL-13 were exclusively higher in smokers without DM. These findings indicate that CP, associated with DM and/or smoking habit, is related to a critical systemic pro-inflammatory condition. The findings of the DMCP group were partially supported by those of a previous study [27], which also reported that the ratios of pro-inflammatory cytokines (i.e. IL-1 β , IL-6, TNF- α) to IL-4 were elevated in the serum of subjects with DM and CP, compared to systemically and periodontally healthy controls.

To date, a limited number of studies have focused on the comparison of systemic levels of cytokines among patients with CP, with and without risk factors. Furthermore, the few studies focusing on this subject have assessed a restricted number of cytokines, hampering direct comparisons with our study. In accordance with the current study, previous investigations have reported no differences in the absolute serum levels of some cytokines between diabetic and non-diabetic subjects (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 and IL-8) [24-27] and between smokers and non-smokers (TNF- α and IL-6) [19,23] with periodontitis. A previous study [27] reported higher ratios of some pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in subjects with type 2 DM and CP than in subjects with CP only. However, the diabetic patients of the Acharya study [27] presented higher mean levels of HbA1c (8.9%) compared to the subjects of our diabetic groups (7.8% and 7.6% for the DMCP and SDMCP groups, respectively). One of the most important findings of the current study is that the SCP group exhibited higher serum ratios of TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-5, IL-17/IL-13 and IL-6/IL-13 than subjects with CP only. Therefore, non-diabetic smokers with CP presented a worse systemic inflammatory profile not only in relation to the periodontally and systemically healthy subjects, but also with regard to the subjects presenting CP alone. These findings of the SCP group open prospective for future investigations, as follow:

- i. whether this unfavorable inflammatory systemic profile is a consequence of the release of

pathogens and/or inflammatory biomarkers from the periodontal tissues into the circulation; ii. whether this systemic inflammation might have a detrimental impact on the periodontal destruction; iii. whether and, to what extent, this pro-inflammatory profile might trigger systemic pathological conditions; iv. why and how the presence of DM changes the relationship between periodontitis, smoking and systemic levels of cytokines; v. whether any other cytokine panel would be more influenced by diabetes than by smoking.

Considering that cytokines play roles in network organization, we established correlations and hierarchical clusters to verify the relationships of cytokines in the serum. Data revealed distinct clustering of cytokines according to each study groups. The most robust cluster was observed in the DMCP group. Eight pro-inflammatory cytokines, including IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2, IL-21 and IL-6, clustered closely, as did the anti-inflammatory cytokine, IL-4. These cytokines cluster at a branch further away from the leaf node, which included GM-CSF, to make a larger group of ten proteins. Notably, such relationships were not observed in diabetic-smokers, suggesting that smoking habit might interfere in the cytokine interactions in subjects with DM. In fact, all these cytokines interact with each other in autoimmune, infectious and inflammatory diseases. IL-17 and its congeners, IL-21 and IL-23, are related to T helper (Th)-17 cells, and upregulate the expression of other pro-inflammatory mediators such as GM-CSF, IL-1 β and IL-6 [46-47]. IL-17 also exerts its role as a counterpart of IFN- γ . During immune responses, both IL-17 and IFN- γ are often found at the site of inflammation, either coproduced by Th17 cells in the presence of IL-12 or produced individually by Th1 or Th17 cells and other cells [48-49]. The induction and function of Th17 and Th1 cells is regulated directly and indirectly by cytokines including IL-4, IL-10 and TGF- β , secreted by the other major subtypes of T cells, including Th2 and regulatory T cells (Treg) [50]. Finally, IL-2 is a pleiotropic cytokine

that drives all T-cell growth and expansion, but can also inhibit the differentiation of Th17 cells [51-52]. If and, to what extent, these cytokine interactions may affect the periodontal destruction in diabetic patients needs to be further investigated. Furthermore, further studies are needed to clarify the systemic consequences of such interactions.

The main strength of this study is the evaluation of a wide panel of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as well as their ratios. Furthermore, analyses were adjusted for age and gender and patients with CP were matched for disease severity to avoid the interference of these confounders. This study also presents limitations. Due to its cross-sectional design, it is not possible to predict the systemic and periodontal impact of the observed serum cytokine profiles over the long term. Furthermore, the evaluation of serum cytokine profiles in patients with DM and/or smoking habit without periodontitis would be interesting.

Conclusion:

The ratios of pro- and anti-inflammatory cytokines are shifted to favor a proinflammatory status in the serum of patients with CP. Subjects with CP with one or both risk factors exhibited an even more pro-inflammatory cytokine profile, with non-diabetic smokers presenting more evident imbalances between pro- and anti-inflammatory cytokines. The relationships among serum cytokines were differentially influenced by CP only and by CP associated with DM and smoking, with diabetic non-smokers exhibiting more evident interplays among cytokines.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: Tamires Szeremeske Miranda declares that she has no conflict of interest. Sílvia Lacerda Heluy declares that she has no conflict of interest. Daniele Ferreira Cruz declares that she has no conflict of interest. Hélio Doyle Pereira da Silva declares that he has no conflict of interest. Magda Feres declares that she has no conflict of interest. Luciene Cristina Figueiredo declares that she has no conflict of interest. Poliana Mendes Duarte declares that she has no conflict of interest.

Funding: The work was supported by the São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil, # 2013/10354-4).

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This study protocol was approved by the Ethics Committee in Clinical Research of the Guarulhos University (CAAE: 25526913.8.0000.5506).

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*; 37 Suppl 1: S34-45.
2. Fietta P, Costa E, Delsante G (2015) Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part II: ILs from IL-20 to IL-38. *Theor Biol Forum*; 108(1-2):19-40.
3. Monastero RN, Pentyala S (2017) Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflam*; 2017: 4309485. doi: 10.1155/2017/4309485.
4. Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*; 89(12):1349-63. doi: 10.1177/0022034510376402.
5. Gonzales JR (2015) T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol 2000*; 69(1):181-200. doi: 10.1111/prd.12090.
6. Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C (2016) Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*; 43(9):727-45. doi: 10.1111/jcpe.12557.
7. Albandar JM (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*; 29:177-206.
8. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM (2011) Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 38(3):219-28. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01684.x.
9. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A (2014) Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000*; 64(1):111-26. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00456.x.
10. Sonnenschein SK, Meyle J (2015) Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontol 2000*; 69(1):221-54. doi: 10.1111/prd.12089.
11. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP (2016) Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*; 71(1):22-51. doi: 10.1111/prd.12110.
12. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*; 71(10):1528-34.
13. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K (2003) Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 30(12):1046-52.

14. Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K (2010) Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontal Res*; 45(1):116-22. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01209.x.
15. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Favari M (2010) Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol*; 81(7):1056-63. doi: 10.1902/jop.2010.090732.
16. Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemelä O, Karttunen R, Raunio T, Tervonen T (2010) Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 37(10):881-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01602.x.
17. Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, Liang H, Liao P, Loo WT, Cheung MN, Chow LW (2012) Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*; 60(2):552-60. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.239.
18. Gokul K, Faizuddin M, Pradeep AR (2012) Estimation of the level of tumor necrosis factor- α in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health & disease: A biochemical study. *Indian J Dent Res*; 23(3):348-52. doi: 10.4103/0970-9290.102221.
19. Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, 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):270-80. doi: 10.1902/jop.2013.130117.
20. Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, Duarte PM (2014) Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 41(6):550-7. doi: 10.1111/jcpe.12245.
21. Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G (2014) Analysis of YKL-40 acute-phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease. *J Periodontol*; 85(9):1240-6. doi: 10.1902/jop.2014.130631.
22. Chen XT, Tan JY, Lei LH, Chen LL (2015) Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent*; 28(1):9-12.
23. Ikezawa-Suzuki I, Shimada Y, Tai H, Komatsu Y, Tanaka A, Yoshie H (2008) Effects of treatment on soluble tumour necrosis factor receptor type 1 and 2 in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 35(11):961-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01317.x.
24. Dağ A, Firat ET, Arikan S, Kadiroğlu AK, Kaplan A (2009) The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J*; 54(1):17-22. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.01083.x.

25. Longo PL, Artese HP, Rabelo MS, Kawamoto D, Foz AM, Romito GA, Dib SA, Mayer MP (2014) Serum levels of inflammatory markers in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci*; 22(2):103-8.
26. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV (2015) Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol*; 19(4):388-92. doi: 10.4103/0972-124X.150876.
27. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, Kulkarni RD (2017) Cytokine ratios in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*; 11(4):277-278. doi: 10.1016/j.dsx.2016.12.007.
28. Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*; 4(1):1-6.
29. Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M (2003) Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol*; 74:1736-1740.
30. Ikezawa I, Tai H, Shimada Y, Komatsu Y, Galicia JC, Yoshie H (2005) Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and 2 in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*; 32(10):1047-54.
31. Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ (2005) Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Res*; 40(1):53-8.
32. Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H (2010) The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol*; 81(8):1118-23. doi: 10.1902/jop.2010.090741.
33. Ozçaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N (2011) Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*; 46(5):592-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01377.x.
34. Becerik S, Öztürk VÖ, Atmaca H, Atilla G, Emingil G (2012) Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol*; 83(10):1304-13.
35. Zimmermann GS, Bastos MF, Dias Gonçalves TE, Chambrone L, Duarte PM (2013) Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *J Periodontol*; 84(5):624-33. doi: 10.1902/jop.2012.120254.
36. 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.

37. Boström EA, Kindstedt E, Sulniute R, Palmqvist P, Majster M, Holm CK, Zwicker S, Clark R, Önell S, Johansson I, Lerner UH, Lundberg P (2015) Increased Eotaxin and MCP-1 Levels in Serum from Individuals with Periodontitis and in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS One*; 10(8): e0134608. doi: 10.1371/journal.pone.0134608.
38. Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Al-Abri S, Al-Lawati J, Al-Maskari M (2013) Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients. *Int J Endocrinol*; 2013:976810. doi: 10.1155/2013/976810.
39. Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W, Zhang A, Li Q, Xu X (2014) The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol*; 75(4):289-96. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.007.
40. Madhumitha H, Mohan V, Deepa M, Babu S, Aravindhan V (2014) Increased Th1 and suppressed Th2 serum cytokine levels in subjects with diabetic coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*; 13: 1. doi: 10.1186/1475-2840-13-1.
41. Roohi A, Tabrizi M, Abbasi F, Ataie-Jafari A, Nikbin B, Larijani B, Qorbani M, Meysamie A, Asgarian-Omran H, Nikmanesh B, Bajouri A, Shafiey N, Maleki A (2014) Serum IL-17, IL-23, and TGF- β levels in type 1 and type 2 diabetic patients and age-matched healthy controls. *Biomed Res Int*; 2014:718946. doi: 10.1155/2014/718946.
42. Gupta S, Maratha A, Siednienko J, Natarajan A, Gajanayake T, Hoashi S, Miggin S (2017) Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Sci Rep*; 7(1):7633. doi: 10.1038/s41598-017-07230-8.
43. Dalooe MH, Avan A, Mirhafez SR, Kavousi E, Hasanian-Mehr M, Darroudi S, Tajfard M, Tayefi M, Qazizade H, Mohammadi A, Ferydouni N, Ebrahimi M, Ghayour-Mobarhan M (2017) Impact of Cigarette Smoking on Serum Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines and Growth Factors. *Am J Mens Health*; 11(4):1169-1173. doi: 10.1177/1557988315601724.
44. Petrescu F, Voican SC, Silosi I (2010) Tumor necrosis factor-alpha serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*; 5:217-22.
45. Nadeem A, Javaid K, Sami W, Zafar A, Jahan S, Zaman S, Nagi A (2013) Inverse relationship of serum IL-17 with type-II diabetes retinopathy. *Clin Lab*; 59(11-12):1311-7.
46. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*; 181(1):8-18. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044.
47. Tahmasebinia F, Pourgholaminejad A (2017) The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 79(Pt B):408-416. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.07.023.

48. Barin JG, Talor MV, Schaub JA, Diny NL, Hou X, Hoyer M, Archer NK, Gebremariam ES, Davis MF, Miller LS, Rose NR, Čiháková D (2016) Collaborative Interferon- γ and Interleukin-17 Signaling Protects the Oral Mucosa from *Staphylococcus aureus*. *Am J Pathol*; 186(9):2337-52. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.07.001.
49. Veldhoen M (2017) Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol*; 18(6):612-621. doi: 10.1038/ni.3742.
50. Mills KH (2008) Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*; 38(10):2636-49. doi: 10.1002/eji.200838535.
51. Liao W, Lin JX, Leonard WJ (2011) IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*; 23(5):598-604. doi: 10.1016/j.coi.2011.08.003.
52. Liao W, Lin JX, Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*; 38(1):13-25. doi: 10.1016/j.immuni.2013.01.004.

Table 1 - Demographic characteristics and full-mouth periodontal parameters (mean \pm SD) of the study population.

Parameters	Groups					p-value
	Control	CP	DMCP	SCP	SDMCP	
Gender (M %)	30	32.0	40.0	37.0	33.35	0.83
Age (years)	51.6 \pm 7.2	52.7 \pm 8.3	55.9 \pm 9.2	51.1 \pm 7.7	54.5 \pm 7.9	0.23
Years of smoking	-	-	-	24.1 \pm 12.1	27.5 \pm 12.4	0.48
Cigarettes/day (n)	-	-	-	11.6 \pm 1.3	17.4 \pm 3.8	0.23
Years of DM	-	-	6.7 \pm 3.2	-	6.2 \pm 2.5	0.32
HbA1c (%)	5.9 \pm 0.1 a	5.8 \pm 0.1 a	7.8 \pm 1.2 b	5.7 \pm 0.2 a	7.6 \pm 1.0 b	0.0001*
Sites with plaque (%)	17.2 \pm 4.1 a	61.1 \pm 24.4 b	76.5 \pm 20.7 b	72.2 \pm 19.6 b	73.3 \pm 27.8 b	0.001*
Sites with BoP (%)	8.2 \pm 1.2 a	35.9 \pm 26.2 b	44.4 \pm 26.2 b	39.2 \pm 28.9 b	30.7 \pm 16.7 b	0.001*
PD (mm)	2.2 \pm 0.2 a	3.2 \pm 0.8 b	3.8 \pm 0.9 b	3.8 \pm 1.2 b	3.6 \pm 0.8 b	0.001*
CAL (mm)	2.2 \pm 0.2 a	4.2 \pm 1.2 b	5.3 \pm 1.3 b	4.8 \pm 1.6 b	5.0 \pm 1.3 b	0.002*

* A p-value <0.05 indicate differences among groups by One-way ANOVA.

Different letters indicate differences between groups by and Tukey test (p< 0.05).

M: male; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BoP: bleeding on probing; HbA1c: glycated hemoglobin; SD: standard deviation; CP: chronic periodontitis; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM.

Table 2 - Serum levels (median [mean \pm SD]) of cytokines (pg/ml).

Cytokines	Groups					p-value
	Control	CP	DMCP	SCP	SDMCP	
IL-10	11.3 (14.9 \pm 15.4)	9.9 (10.0 \pm 5.6)	4.8 (10.5 \pm 17.0)	2.4 (5.4 \pm 6.2) *†	5.0 (18.1 \pm 37.5)	0.003
IL-4	46.2 (47.6 \pm 21.6)	18.2 (21.8 \pm 14.9)*	7.9 (16.0 \pm 21.6)*	5.0 (12.3 \pm 21.4)*†	18.2 (15.1 \pm 10.6) *	<.0001
IL-5	1.4 (2.1 \pm 3.0)	0.5 (1.2 \pm 1.5)*	0.1 (1.4 \pm 3.9)*	0.1 (0.6 \pm 1.6)*†	0.1 (0.5 \pm 0.7)*†	<.0001
IL-13	3.7 (15.4 \pm 42.5)	2.4 (10.4 \pm 20.6)	1.3 (11.7 \pm 46.4)*	0.2 (1.1 \pm 1.5) *†	3.0 (12.8 \pm 2.2)	<.0001
IL-2	1.2 (1.2 \pm 0.6)	0.9 (1.1 \pm 0.8)	0.4 (0.7 \pm 0.9) *†	0.4 (0.6 \pm 0.6) *†	1.1 (1.8 \pm 3.5)	<.0001
TGF- β	2.9 (11.3 \pm 19.2)	2.2 (2.6 \pm 1.8)	2.2 (4.5 \pm 5.0)	2.2 (3.0 \pm 2.8)	2.2 (2.6 \pm 1.3)	0.092
IL-8	8.0 (15.2 \pm 21.9)	3.5 (5.1 \pm 5.3)	3.7 (6.8 \pm 9.8)	3.5 (4.7 \pm 5.3)	5.2 (12.9 \pm 26.5)	0.1366
MIP-1 α	18.1 (85.9 \pm 326.8)	12.1 (14.7 \pm 10.5)	8.8 (40.8 \pm 120.4)*	7.4 (7.5 \pm 5.3) *†	8.8 (48.1 \pm 123.9) *	<.0001
IL-1 β	1.1 (1.2 \pm 0.6)	0.9 (1.1 \pm 0.8)	0.4 (0.7 \pm 1.1)*	0.4 (0.5 \pm 0.4) *†	0.9 (1.5 \pm 1.8)	<.0001
TNF- α	4.9 (5.0 \pm 1.7)	3.5 (4.7 \pm 2.9)	3.5 (4.4 \pm 2.4)	3.4 (3.5 \pm 1.1) *	4.4 (6.2 \pm 4.6)	0.0108
IL-6	3.6 (3.5 \pm 1.4)	2.5 (2.9 \pm 2.1)	1.6 (2.0 \pm 2.5)*	1.5 (1.8 \pm 1.2) *	1.3 (2.1 \pm 2.5) *	0.0002
INF- γ	7.5 (7.3 \pm 2.5)	5.9 (5.8 \pm 2.4)	3.1 (3.8 \pm 3.8)*†	2.7 (2.9 \pm 2.4) *†	2.9 (4.6 \pm 2.5) *†	<.0001
IL-12	2.7 (2.6 \pm 1.2)	2.8 (3.1 \pm 2.1)	0.8 (1.4 \pm 2.0)*†	1.1 (1.2 \pm 0.9) *†	1.6 (2.0 \pm 1.6)	<.0001
IL-17	9.8 (10.2 \pm 3.3)	7.8 (8.4 \pm 3.4)	6.1 (7.1 \pm 7.0)*	5.1 (6.2 \pm 5.2) *†	6.8 (7.2 \pm 2.9) *	<.0001
IL-21	0.4 (1.2 \pm 1.7)	0.1 (0.6 \pm 1.2)	0.0 (0.7 \pm 1.6)	0.0 (0.7 \pm 1.5)	0.2 (1.0 \pm 2.1)	0.060
IL-23	283.3 (396.0 \pm 304.6)	157.7 (258.2 \pm 218.2)	78.2 (255.7 \pm 709.1)*	84.1 (130.3 \pm 128.5)*	200.2 (357.4 \pm 475.5)	<.0001
GM-CSF	86.4 (159.1 \pm 193.2)	52.9 (109.9 \pm 198.3)	35.0 (57.8 \pm 63.6) *	43.5 (126.9 \pm 351.4)	79.8 (176.5 \pm 251.6)	0.022

IL-7	9.9 (10.1 ± 4.5)	7.8 (6.8 ± 4.1)	3.8 (5.2 ± 4.7) *	3.5 (4.5 ± 3.5) *	5.9 (5.2 ± 4.4) *	0.0001
------	------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------

* Significantly different from the control group by the mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ($p > 0.05$).

† Significantly different from the CP group by the mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ($p > 0.05$).

SD: standard deviation; CP: chronic periodontitis; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM; IL: interleukin, TGF: transforming growth factor; MIP: macrophage inflammatory protein; TNF: tumor necrosis factor; IFN: interferon; GM-CSF: granulocyte macrophage- colony-stimulating factor.

Table 3 - Ratios (median [mean \pm SD]) of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines that were statistically significantly different to that of the control group or CP.

Ratios	Groups					p-value
	Control	CP	DMCP	SCP	SDMCP	
TNF- α /IL-10	0.43 (0.80 \pm 1.00)	0.45 (0.68 \pm 0.57)	0.75 (2.35 \pm 3.95)	1.37 (3.98 \pm 5.79)*	1.07 (2.15 \pm 2.50)	0.0236
IL-12/IL-4	0.07 (0.06 \pm 0.02)	0.16 (0.24 \pm 0.27)*	0.11 (0.30 \pm 0.52)*	0.22 (1.23 \pm 2.48)*	0.14 (0.81 \pm 2.24)*	<0.001
IL-17/IL-4	0.24 (0.24 \pm 0.08)	0.43 (1.10 \pm 2.25)*	0.75 (1.46 \pm 1.67)*	0.97 (12.91 \pm 41.21)*	0.55 (7.13 \pm 26.09)*	<0.0001
IL-1 β /IL-4	0.03 (0.03 \pm 0.02)	0.11 (0.05 \pm 0.17)*	0.06 (0.12 \pm 0.15)*	0.12 (1.15 \pm 3.57)*	0.12 (0.44 \pm 1.34)*	<0.0001
IL23/IL-4	7.13 (8.76 \pm 7.66)	10.17 (29.08 \pm 75.16)	8.86 (23.33 \pm 37.67)*	21.73 (64.06 \pm 114.10)*	16.60 (320.93 \pm 129.47)	0.0013
IL-6/IL-4	0.06 (0.09 \pm 0.07)	0.12 (0.28 \pm 0.61)*	0.15 (0.36 \pm 0.57)*	0.36 (2.80 \pm 5.59)*	0.21 (0.89 \pm 2.46)*	<0.0001
IL-7/IL-4	0.21 (0.24 \pm 0.15)	0.31 (0.40 \pm 0.32)	0.35 (1.37 \pm 2.77)	0.84 (3.44 \pm 10.84)*	0.35 (1.84 \pm 4.03)	0.0037
INF- γ /IL-4	0.18 (0.17 \pm 0.06)	0.31 (0.87 \pm 1.96)*	0.37 (0.73 \pm 0.96)*	0.68 (2.60 \pm 4.82)*	0.33 (2.91 \pm 9.18)*	0.0002
TNF- α /IL-4	0.10 (0.13 \pm 0.08)	0.19 (0.69 \pm 1.60)	0.41 (1.37 \pm 2.36)*	0.76 (15.78 \pm 46.56)* \dagger	0.53 (5.07 \pm 17.72)*	<0.0001
IL-12/IL-5	1.73 (3.35 \pm 5.21)	5.22 (8.34 \pm 9.23)	5.61 (19.05 \pm 31.58)	9.44 (18.40 \pm 23.55)*	5.99 (21.31 \pm 55.57)	0.0079
IL-17/IL-5	8.16 (14.52 \pm 24.99)	14.61 (31.11 \pm 47.78)	56.33 (110.17 \pm 137.14)*	80.78 (118.53 \pm 146.23)*	21.44 (102.67 \pm 258.17)*	0.003
IL-1 β /IL-5	0.84 (1.63 \pm 3.00)	1.64 (3.20 \pm 4.74)*	2.98 (7.97 \pm 10.39)*	5.83 (9.48 \pm 10.08)*	3.72 (41.66 \pm 162.01)*	0.010
IL-6/IL-5	2.26 (7.17 \pm 21.70)	3.88 (7.47 \pm 8.24)	12.83 (33.17 \pm 67.35)*	20.00 (33.49 \pm 39.61)*	10.00 (22.17 \pm 40.27)	0.0009
TNF- α /IL-5	3.56 (8.94 \pm 20.36)	6.30 (17.33 \pm 25.81)	28.81 (100.25 \pm 165.31)*	52.00 (94.13 \pm 93.90)* \dagger	17.21 (88.68 \pm 222.19)*	<0.0001
IL-17/IL-13	2.31 (3.97 \pm 3.89)	3.39 (4.79 \pm 5.98)	3.88 (50.36 \pm 120.01)	7.17 (52.77 \pm 97.63) * \dagger	2.68 (39.54 \pm 108.43)	0.0117
IL-6/IL-13	0.80 (1.55 \pm 2.82)	0.93 (1.22 \pm 1.26)	0.85 (14.76 \pm 35.99)	2.11 (16.71 \pm 29.81) * \dagger	1.15 (5.07 \pm 9.79)	0.0208
TNF- α /IL-13	1.32 (2.17 \pm 2.82)	1.24 (3.70 \pm 6.65)	2.37 (57.78 \pm 169.24)	5.55 (37.77 \pm 57.52)*	1.98 (35.56 \pm 93.01)	0.0095

* Significantly different from the control group by the mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ($p > 0.05$).

† Significantly different from the CP group by the mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ($p > 0.05$).

SD: standard deviation; CP: chronic periodontitis; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM; IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor; IFN: interferon.

Table 4 - Pearson correlation coefficients for cytokines.

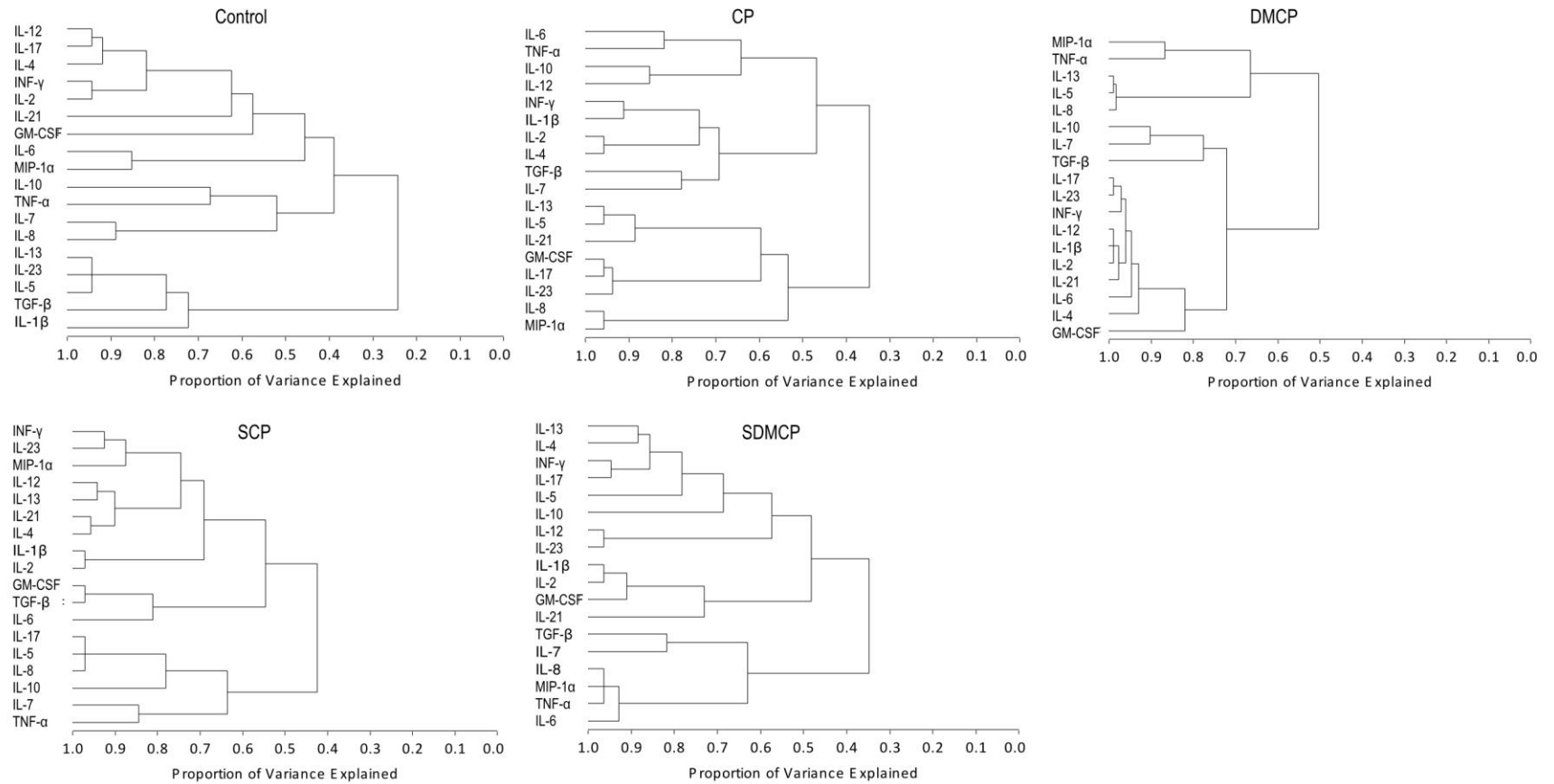
Groups	Cytokines	Cytokines												
		MIP-1 α	IL-8	IL-6	IL-5	IL-23	IL-4	IL-21	IL-2	IL-1 β	IL-17	IL-12	IL-13	TGF- β
Control	IL-5													0.9637
CP	MIP-1 α	0.9253												
	IL-5													0.8957
DMCP	IL-8				0.9001									0.9094
	IL-5													0.9509
	IL-6					0.8544		0.7763	0.8173	0.8255	0.8640			
	IL-23						0.81640	0.87740	0.8918	0.8959	0.9507			
	IL-4							0.8210	0.8118	0.7924	0.7787			
	IL-21								0.9330	0.9260	0.8430			
	IL-2									0.9770	0.9129			
	IL-1 β											0.9087		
	IL-12			0.8056		0.8676		0.8802	0.9443	0.9425		0.9058		
	INF- γ					0.8759	0.7774	0.8490	0.9313	0.9254	0.9260	0.8745		

SCP	IL-8		0.8786			0.7982
	IL-5					0.8962
	IL-2				0.8875	
	GM-CSF					0.8644
SDMCP	TNF- α	0.8677	0.8669	0.7689		
	MIP-1 α		0.9953	0.7515		
	IL-8			0.7526		
	IL-2				0.8333	

Statistically significant pairs of cytokines were considered when correlation coefficients was >0.75 and $p < 0.001$.

Figure legend

Figure 1 - Dendrogram plots demonstrate hierarchical clustering patterns of biomarkers.



4. Conclusões finais

Em conclusão:

- 1- As razões entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias estão alteradas no soro de pacientes com periodontite crônica generalizada, favorecendo um estado pro-inflamatório.
- 2- Os indivíduos com periodontite crônica generalizada apresentando um ou ambos fatores de risco exibem um perfil de citocinas ainda mais pró-inflamatório, sendo que os fumantes não-diabéticos apresentam um desequilíbrio mais evidente entre citocinas pró- e anti-inflamatórias.
- 3- As relações entre as citocinas séricas são influenciadas de forma diferente pela periodontite crônica sozinha e associada à DM e ao tabagismo, sendo que as interrelações mais robustas estão observadas nos pacientes diabéticos não-fumantes.

Referências Bibliográficas

Abduljabbar T, Al-Sahaly F, Al-Kathami M, Afzal S, Vohra F. Comparison of periodontal and peri-implant inflammatory parameters among patients with prediabetes, type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. *Acta Odontol Scand.* 2017 Jul; 75(5): 319-324.

Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol.* 2015 Jul Aug; 19(4): 388-392.

Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, Kulkarni RD. Cytokine ratios in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr.* 2017 Oct -Dec; 11(4): 277-278.

Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol.* 2000 Dec; 71(12): 1874-1881.

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med.* 2007 Jun; 261(6): 511-528.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013 Jan; 36 Suppl 1: S67-74.

Anil S, Preethanath RS, Alasqah M, Mokeem SA, Anand PS. Increased levels of serum and gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 in smokers with periodontitis. *J Periodontol.* 2013 Sep; 84(9): e23-28.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 675-705.

Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol.* 1998 Apr; 25(4): 297-305.

Becerik S, Öztürk VÖ, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol.* 2012 Oct; 83(10): 1304-1313.

Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity.* 2016 Nov 15; 45(5): 963-973.

Bhattacharya P, Thiruppathi M, Elshabrawy HA, Alharshawi K, Kumar P, Prabhakar BS. GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity. *Cytokine.* 2015 Oct; 75(2): 261-271.

Boström EA, Kindstedt E, Sulniute R, Palmqvist P, Majster M, Holm CK, Zwicker S, Clark R, Önell S, Johansson I, Lerner UH, Lundberg P. Increased Eotaxin and MCP-1 Levels in Serum

from Individuals with Periodontitis and in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS One*. 2015 Aug 4; 10(8): e0134608.

Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005 Mar; 76 (3): 418-425.

Cetinkaya B, Guzeldemir E, Ogus E, Bulut S. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2013 Jan; 84(1): 84-93.

Chen XT, Tan JY, Lei LH, Chen LL. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *Am J Dent*. 2015 Feb; 28(1): 9-12.

Choi YH, McKeown RE, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Song KB, Merchant AT. Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Feb; 34 (2): 381-386.

Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Portinaro NM, Aldini G, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Pathophysiology of tobacco smoke exposure: recent insights from comparative and redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2014 May-Jun; 33(3): 183-218.

Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 1996 Jan; 59(1): 61-66.

Dağ A, Firat ET, Arikan S, Kadiroğlu AK, Kaplan A. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J*. 2009 Mar; 54(1): 17-22.

Das S, Khader S. Yin and yang of interleukin-17 in host immunity to infection. *F1000Res*. 2017 May 23; 6: 741.

Davies RC, Jaedicke KM, Barksby HE, Jitprasertwong P, Al-Shahwani RM, Taylor JJ, Preshaw PM. Do patients with aggressive periodontitis have evidence of diabetes? A pilot study. *J Periodontal Res*. 2011 Dec; 46(6): 663-672.

de Queiroz AC, Taba M Jr, O'Connell PA, da Nóbrega PB, Costa PP, Kawata VK, Trevisan GL, Novaes AB Jr, de Souza SL, Palioto DB, Grisi MF. Inflammation markers in healthy and periodontitis patients: a preliminary data screening. *Braz Dent J*. 2008; 19(1): 3-8.

Dietrich T, Walter C, Oluwagbemigun K, Bergmann M, Pischon T, Pischon N, et al. Smoking, Smoking Cessation, and Risk of Tooth Loss: The EPIC-Potsdam Study. *J Dent Res*. 2015 Oct; 94(10): 1369-1375.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996; 87:2095-2147.

Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007 Nov; 37 Suppl 1:S 34-45.

Dong R, Zheng S. Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Jun; 30(6): 970-976.

Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol.* 2010 Jul; 81(7): 1056-1063.

Duarte PM, Bastos MF, Fermiano D, Rabelo CC, Perez-Chaparro PJ, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *J Periodontal Res.* 2015 Feb; 50(1): 18-27.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991; 62: 123-131.

Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 2009; 102: 61-74.

Fietta P, Costa E, Delsante G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part II: ILs from IL-20 to IL-38. *Theor Biol Forum.* 2015; 108(1-2): 19-40.

Firatli E, Yilmaz O, Onan U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 362-366.

Floss DM, Schröder J, Franke M, Scheller J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct; 26(5): 569-578.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013 Jun; 62 (1): 59-94.

Gokul K, Faizuddin M, Pradeep AR. Estimation of the level of tumor necrosis factor- α in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health & disease: A biochemical study. *Indian J Dent Res.* 2012 May-Jun; 23(3): 348-352.

Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2003 Dec; 30(12): 1046-1052.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65: 260-267.

Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- α in patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2014 Feb; 85(2): 270-280.

Habib T, Nelson A, Kaushansky K. IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec; 112(6): 1033-1045.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 (6): 196-209.

Hong M, Kim HY, Seok H, Yeo CD, Kim YS, Song JY, Lee YB, Lee DH, Lee JI, Lee TK, Ahn HS, Ko YH, Jeong SC, Chae HS, Sohn TS. Prevalence and risk factors of periodontitis among adults with or without diabetes mellitus. *Korean J Intern Med*. 2016 Sep; 31(5): 910-919.

Ikezawa I, Tai H, Shimada Y, Komatsu Y, Galicia JC, Yoshie H. Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and 2 in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct; 32(10):1047-1054.

Ikezawa-Suzuki I, Shimada Y, Tai H, Komatsu Y, Tanaka A, Yoshie H. Effects of treatment on soluble tumour necrosis factor receptor type 1 and 2 in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008 Nov; 35(11): 961-968.

Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016 Feb; 70(1): 164-183

José BPS, Corrêa RA, Malta DC, Passos VMA, França EB, Teixeira RA, Camargos PAM. Mortality and disability from tobacco-related diseases in Brazil, 1990 to 2015. *Rev Bras Epidemiol*. 2017 May; 20Suppl 01(Suppl 01): 75-89.

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014 Nov; 93(11): 1045-1053.

Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2009 Sep; 36 (9): 765-774.

Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G. Analysis of YKL-40 acute-phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease. *J Periodontol*. 2014 Sep; 85(9): 1240-1246.

Khan S, Khalid T, Awan KH. Chronic periodontitis and smoking. Prevalence and dose-response relationship. *Saudi Med J*. 2016 Aug; 37(8): 889-94.

Kibayashi M, Tanaka M, Nishida N, Kuboniwa M, Kataoka K, Nagata H, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. *J Periodontol*. 2007 May; 78(5): 859-867.

Kovarik P, Ebner F, Sedlyarov V. Posttranscriptional regulation of cytokine expression. *Cytokine*. 2017 Jan; 89: 21-26.

Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, Liang H, Liao P, Loo WT, Cheung MN, Chow LW. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*. 2012 Nov; 60(2): 552-560.

Liao C, Zhang C, Yang Y. Pivotal roles of Interleukin-17 as the Epicenter of Bone Loss Diseases. *Curr Pharm Des*. 2017 May 19.

Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol* 1994; 65: 718-723.

Loo WT, Fan CB, Bai LJ, Yue Y, Dou YD, Wang M, Liang H, Cheung MN, Chow LW, Li JL, Tian Y, Qing L. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. *J Transl Med*. 2012 Sep 19;10 Suppl 1: S8.

Longo PL, Artese HP, Rabelo MS, Kawamoto D, Foz AM, Romito GA, Dib SA, Mayer MP. Serum levels of inflammatory markers in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2014 Apr; 22(2): 103-108.

Loo WT, Fan CB, Bai LJ, Yue Y, Dou YD, Wang M, Liang H, Cheung MN, Chow LW, Li JL, Tian Y, Qing L. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. *J Transl Med*. 2012 Sep 19; 10 Suppl 1:S8.

Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005 Nov; 76(11 Suppl): 2106-15.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*. 2000 Oct; 71(10): 1528-1534.

Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol*. 2012 Jun; 24(3): 218-24.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MC, de Souza AM, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Novaes AB, Gerlach RF. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol*. 2009 Apr; 80(4): 594-602.

Mattuella LG, Campagnaro MB, Vargas AE, Xavier LL, Oppermann RV, Chies JA, Miranda LA. Plasma cytokines levels in aggressive and chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul; 71(3-4): 683-688.

Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Oct; 36(10): 1882-6.

Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev.* 2004 Dec; 202: 84-95.

Mendoza-Azpur G, Castro C, Peña L, Guerrero ME, De La Rosa M, Mendes C, Chambrone L. Adiponectin, leptin and TNF- α serum levels in obese and normal weight Peruvian adults with and without chronic periodontitis. *J Clin Exp Dent.* 2015 Jul 1; 7(3): e380-6.

Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol.* 2003 Sep; 30 (9): 761-772.

Monastero RN, Pentylala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflamm.* 2017; 2017: 4309485.

Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontal Res.* 2010 Feb; 45(1): 116-122.

Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, Duarte PM. Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014 Jun; 41(6): 550-557.

Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* 2010 Feb; 6(2): e1000661.

Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol.* 2013 May 31; 4:129.

Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2008; 79: 629-36.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248-266.

Organização Mundial da Saúde. O diagnóstico, definição e classificação do Diabetes Mellitus e suas complicações. Parte 1: Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. WHO/NCD/NCS/99.2 Ed. Genebra; 1999.

Ozçaka O, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2011 Oct; 46(5): 592-598.

Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemelä O, Karttunen R, Raunio T, Tervonen T. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Oct; 37(10): 881-887.

- Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis. I. Statistical examination of the significance of tobacco in the development of ulceromembranous gingivitis and in the formation of calculus. *J Dent Res.* 1947; 26: 261-264.
- Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris KV, Kono DH. Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discov Med.* 2013 Sep; 16(87): 123-131.
- Pussinen PJ, Paju S, Mäntylä P, Sorsa T. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: a review. *Curr Med Chem.* 2007; 14(22): 2402-2412.
- Ramseier CA, Ånerud Å, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, Faddy MJ, Büergin W, Schätzle M, Lang NP. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol.* 2017 Jul 22.
- Robati M, Ranjbari A, Ghafourian Boroujerdnia M, Chinipardaz Z. Detection of IL-4, IL-6 and IL-12 serum levels in generalized aggressive periodontitis. *Iran J Immunol.* 2011 Sep; 8(3): 170-175.
- Rosenblum MG, Donato NJ. Tumor necrosis factor alpha: a multifaceted peptide hormone. *Crit Rev Immunol.* 1989; 9(1): 21-44.
- Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 941: 89-116.
- Sánchez-Hernández PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2011 Jul;17(5): 522-529.
- Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2010 Sep; 89(9): 943-947.
- Šedý J, Bekiaris V, Ware CF. Tumor necrosis factor superfamily in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Dec18; 7(4): a016279.
- Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol.* 2010 Aug; 81(8):1118-1123.
- Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994; (18): S684-5, 688-693.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb; 25 (2): 134-144.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 135-187.

Stadler AF, Angst PD, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016 Sep; 43(9): 727-745.

Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol*. 2017 Apr 21; 8:405.

Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, Feng XH, Lu RF, Ren XY. Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009 Jun; 44(3): 311-316.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 1998; 69: 76-83.

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2000 May; 71(5): 743-751.

Torrunguang K, Nisapakultorn K, Sutdhibhisal S, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Vanichjakvong O, Prapakamol S, Pemsirinirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Kusump S, Rajatanavin R. The effect of cigarette smoking on the severity of periodontal disease among older Thai adults. *J Periodontol*. 2005 Apr; 76(4): 566-572.

Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32: 51-82.

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 251-276.

Tu E, Chia PZ, Chen W. TGF β in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Aug; 25(4): 423-435.

Varricchi G, Bagnasco D, Borriello F, Heffler E, Canonica GW. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016 Apr; 16(2): 186-200

Vouros ID, Kalpidis CD, Chadjipantelis T, Konstantinidis AB. Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* 2009; 11: 250-257.

Welsby I, Goriely S. Regulation of Interleukin-23 Expression in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 941: 167-189.

World Health Statistics 2016: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. ISBN 978 92 4 156526 4.

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 425-456.

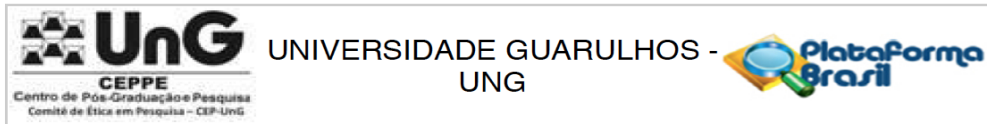
Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2005 Feb; 40(1): 53-58.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 Spring; 45(2): 27-37.

Zimmermann GS, Bastos MF, Dias Gonçalves TE, Chambrone L, Duarte PM. Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2013 May; 84(5): 624-633.

Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct; 26(5):559-568.

Anexo



Continuação do Parecer: 518.426

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apto a ser desenvolvido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

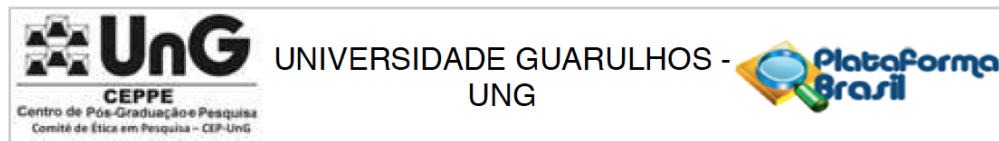
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisa pode ser iniciada. Esta aprovação é válida pelo período previsto no cronograma. Enviar relatório final, via Plataforma Brasil até 31 de janeiro de 2017.

GUARULHOS, 30 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Jumara Sílvia Van De Velde
 (Coordenador)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência dos fatores de risco para periodontite crônica no perfil imunoinflamatório, nos antagonistas da sinalização Wnt/ β -catenina e no perfil microbiológico subgengival

Pesquisador: Poliana Mendes Duarte

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25526913.8.0000.5506

Instituição Proponente: Universidade Guarulhos - UNG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 518.426

Data da Relatoria: 28/01/2014

