

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Mestrado em Odontologia

Jenifer Diana Souza da Fonseca

**TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL: AVALIAÇÃO DE
DUAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS**

São Paulo
2021

Jenifer Diana Souza da Fonseca

**TRATAMENTO PERIODONTAL NÃO CIRÚRGICO EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA: AVALIAÇÃO DE DUAS CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Hiromi Tanaka

São Paulo

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela dádiva da vida, obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por seu infinito amor e bondade, pela sua voz “invisível” que não me permitiu desistir.

A minha mãe, Marli Eliete, verdadeiramente a maior mestra da minha vida, que sempre acreditou em mim e manteve a fé.

A minha orientadora, Professora Márcia Tanaka, pela oportunidade de realizar este trabalho, obrigada pela confiança e por me atender com paciência, agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável e por me guiar, muito obrigada por tudo!

Ao programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro pela bolsa de estudos que possibilitou a minha formação, sob a coordenação do Prof. Dr. Wilson R. Sendyk, em nome do qual estendo meu reconhecimento e agradecimento a todos os demais professores da equipe, pela dedicação na nobre missão de ensinar. Todos nos proporcionaram condições para nosso crescimento profissional.

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é uma desordem genética cromossômica, também conhecida como trissomia do cromossomo 21 (T21), caracterizada por genótipos dismórficos entre os afetados. Pacientes com SD apresentam diversas alterações bucais importantes para o cirurgião dentista, incluindo o aumento da prevalência e gravidade de doença periodontal (DP). Diante do exposto objetivo desse estudo é quantificar interleucina 6 (IL-6) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) no fluido gengival de indivíduos com SD com doença DP e comparar com indivíduos não síndrômicos com DP. Foi selecionado para este estudo longitudinal um total de 40 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos com 20 indivíduos cada: Grupo 1- SD com DP e Grupo 2- Não-sindrômicos com DP (Controle). Todos os indivíduos participantes do estudo receberam tratamento periodontal básico (raspagem, alisamento e polimento supragengival) e posteriormente a raspagem subgengival. Nos acompanhamentos de 45 e 90 dias, foi realizada nova coleta de fluido gengival crevicular nos mesmos sítios determinados para a coleta inicial, e foi repetido o exame periodontal. No entanto, os dados do acompanhamento de 90 dias foram apenas descritivos e não foi realizada a análise estatística pelo n da amostra (Grupo SD - 9 pacientes e Grupo controle - 5 pacientes). Os indivíduos com SD possuíam um maior volume de fluido gengival e maior concentração de citocinas (IL-6 e GM-CSF) em comparação com indivíduos do grupo Controle antes do tratamento periodontal ($p < 0,05$). Após o tratamento, todas as citocinas (IL-6 e CSF-GM) tiveram uma maior quantidade no grupo síndrômico em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Porém, o volume do fluido não apresentou diferença nos grupos estudados. No grupo SD, o volume do fluido e a citocinas GM-CSF apresentou uma diminuição significativa depois do tratamento ($p < 0,05$). As citocinas analisadas podem sugerir que nos indivíduos com SD o sistema imune não é eficiente na função e na produção destes mediadores inflamatórios. Notavelmente, podemos observar uma maior quantidade de citocinas IL-6 e GM-CSF no fluido gengival desses indivíduos em comparação com os do grupo controle. Após o tratamento periodontal, embora houvesse melhora nos parâmetros clínicos e redução na concentração de ambas as citocinas, elas ainda permaneceram em altas concentrações nos sítios doentes dos indivíduos com SD, o que pode demonstrar que eles apresentam uma resposta muito mais intensa frente ao processo inflamatório, explicando em parte, a alta prevalência e severidade da DP em pacientes com SD.

Palavras chave: Interleucina 6, doença periodontal, Síndrome de Down, GM-CSF.

ABSTRACT

Down Syndrome (DS) is a chromosomal genetic disorder, also known as trisomy 21 (T21), characterized by dysmorphic genotypes among those affected. Patients with DS have several oral changes that are important for the dental surgeon, including an increase in the prevalence and severity of periodontal disease (PD). Given the above objective of this study is to quantify IL-6 and CSF-GM in the gingival fluid of individuals with DS with PD disease and compare with non-syndromic individuals with PD. A total of 40 individuals were selected for this longitudinal study, which were divided into the following groups of 20 individuals each: Group 1- SD with PD and Group 2- Non-syndromic with PD (Control). All individuals participating in the study received basic periodontal treatment (shaving, smoothing and supragingival polishing) and subsequent subgingival scaling. In the 45 and 90 day follow-ups, a new crevicular gingival fluid collection was performed in the same sites determined for the initial collection, and the periodontal examination was repeated. However, the 90-day follow-up data were only descriptive and statistical analysis was not performed by the number of the sample (SD Group - 9 patients and Control Group - 5 patients). Individuals with DS had a greater volume of gingival fluid and a higher concentration of cytokines (IL-6 and CSF-GM) compared to individuals in the Control group before periodontal treatment ($p < 0.05$). After treatment, all cytokines (IL-6 and CSF-GM) had a higher amount in the syndromic group compared to the Control group ($p < 0.05$). However, the fluid volume did not differ in the studied groups. In the SD group, fluid volume and CSF-GM cytokines showed a significant decrease after treatment ($p < 0.05$). The analyzed cytokines may suggest that in individuals with DS the immune system is not efficient in the function and production of these inflammatory mediators. Notably, we can observe a greater amount of IL-6 and CSF-GM cytokines in the gingival fluid of these individuals compared to the control group. After periodontal treatment, although there was an improvement in the clinical parameters and a reduction in the concentration of both cytokines, they still remained in high concentrations in the diseased sites of individuals with DS, which may demonstrate that they have a much more intense response to the inflammatory process, partially explaining the high prevalence and severity of PD in DS patients.

Key words: Interleukin 6, periodontal diseases, down syndrome, CSF-GM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SD	Síndrome de Down
T21	Trissomia do cromossomo 21
DP	Doença periodontal
IL-6	Interleucina 6
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
NDSS	National Down Syndrome Society
ONU	Organização das Nações Unidas
LPS	Lipopolissacarídeos
TLR	Receptor Toll-like
DNA	Ácido desoxirribonucleico
NFKB	nuclear factor kappa B
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1	Interleucina 1
TNF	Fator de necrose tumoral
AR	Artrite reumatoide
Tregs	Linfócitos T reguladores
RANKL	Ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante
TAM	Mielopoiese anormal transitória
APAEs	Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais
FOAr-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araraquara
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
IPV	Índice de placa visível
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento a sondagem
NI	Nível de inserção
NIC	Nível de inserção clínica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 SÍNDROME DE DOWN.....	9
2.2 DOENÇA PERIODONTAL.....	11
2.3 DOENÇA PERIODONTAL EM PACIENTES COM SINDROME DE DOWN.....	13
2.4 CITOCINAS	14
3. OBJETIVO.....	9
4. MATERIAL E MÉTODO	18
4.1. Delineamento do estudo e seleção da casuística	18
4.2. Exame Clínico Periodontal.....	19
4.3. Tratamento periodontal não-cirúrgico	19
4.4. Coleta de Fluido Gengival para Análise Imunológica.....	20
4.5. Análise Imunológica.....	21
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
6. RESULTADO	22
6.1. Características demográficas e Parâmetros clínicos	22
6.2. Avaliação dos sítios selecionados nos diferentes períodos	25
6.3. Volume do fluido gengival crevicular e as concentrações das citocinas estudadas	27
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÃO.....	34
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1. Introdução

A Síndrome de Down (SD), também conhecida como Trissomia do cromossomo 21 (T21), é um distúrbio genético cromossômico causado por um erro na divisão celular que resulta na presença de todo ou parte de um cromossomo 21 extra, caracterizada por genótipos dismórficos entre os afetados. A super expressão de genes específicos encontrados no cromossomo 21 podem causar uma condição complexa com mais de 30 características clínicas (Tanaka et al., 2012) além de manifestações bucais como língua fissurada, erupção tardia, erupção ectópica, retenção prolongada, prevalência reduzida de lesões cariosas e um aumento da prevalência de DP (Teitelbaum 2009, Scalioni et al., 2018, Díaz-Quevedo et al., 2021).

A severidade e a rápida progressão da DP em pacientes com SD, está relacionada a uma gama de fatores como deficiência na higiene bucal, anatomia dentária alterada, além de resposta imune prejudicada com produção alterada de mediadores inflamatórios e função imunológica deficiente (Ferreira et al., 2016, Habibe et al., 2020).

O comprometimento do sistema imunológico destes pacientes pode interferir na resposta inflamatória do tecido periodontal, pois numerosas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, e o GM-CSF são liberados das células e estão associadas ao estabelecimento e progressão da destruição periodontal (Cavalla et al., 2018).

Assim, o objetivo desse estudo foi quantificar os níveis de IL-6 e o GM-CSF em pacientes com SD e não sindrômicos, ambos com DP, antes, 45 e 90 dias após o tratamento periodontal não cirúrgico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome de Down

No Brasil estima-se que a cada 700 nascimentos ocorra um caso de T21, totalizando em torno de 270 mil pessoas com SD (Ministério da Saúde, 2019). Em relação aos EUA, a National Down Syndrome Society (NDSS) determina por meio de estimativas, que a cada 691 nascimentos ocorra um caso da SD, totalizando cerca de 400 mil pessoas com a síndrome, numa perspectiva mundial, a incidência estimada é de 01 portador da SD a cada 01 mil nascidos vivos, totalizando de 3 a 5 mil crianças nascidas com SD por ano no mundo (Fonseca et al., 2021), sendo a alteração cromossômica mais comum em humanos, com aproximadamente 95% dos casos com cromossomo 21 extra completo, 4% translocação e 1% mosaïcismo (Ferreira et al., 2016)

As manifestações sistêmicas da SD incluem distúrbios musculoesqueléticos, alterações neurológicas, anormalidades hematológicas e imunológicas, deficiências cardíacas congênitas, problemas respiratórios, além da predisposição em desenvolver leucemia, hipertensão, problemas gastrointestinais e início precoce da doença de Alzheimer (Nuernberg et al., 2019)

Cerca de 50% das crianças com SD possuem doenças cardiovasculares, são mais propensas a serem internadas por infecções do trato respiratório, e apresentam um aumento de 30% na mortalidade por sepse, além disso, possuem uma incidência aumentada de infecções, inflamações crônicas e autoimunes (Huggard et al., 2020).

As características faciais típicas incluem braquicefalia, ponte nasal plana, prega epicântica, fendas oculares estreitas e inclinadas, catarata, defeitos de visão e estrabismo (Contaldo et al, 2021)

Em relação a oclusão o sinal mais frequente nesses pacientes é a má oclusão de classe III, devido a uma combinação de deficiência maxilar e prognatismo mandibular, além de apresentarem com mais frequência mordida aberta anterior e posterior, mordida profunda e cruzada, respiração bucal com a consequente falta de desenvolvimento maxilar e alterações no desenvolvimento da oclusão normal (Díaz-Quevedo et al., 2021).

Especificamente em relação às manifestações bucais, esses pacientes apresentam macroglossia, língua fissurada, erupção tardia, erupção ectópica, hipodontia (ausência de até 6 germes dentários) relacionado a alterações no sistema nervoso periférico e na vascularização de botões dentais, microdontia, taurodontia devido a mitose deficiente nos germes dentários, retenção prolongada, palato estreito, profundo e ogival, respiração bucal, prevalência reduzida de lesões cariosas e um aumento da prevalência de DP (Teitelbaum 2009, Scalioni et al., 2018, Díaz-Quevedo et al., 2021).

Esse aumento da DP em pacientes com SD está associada a quimiotaxia deficiente de neutrófilos, monócitos, disfunção de linfócitos T e senescência prematura do sistema imunológico, predispondo a um estado pró-inflamatório crônico e aumento do estresse oxidativo, devido a disfunção mitocondrial que, concomitante a doenças metabólicas, como diabetes, são responsáveis por maior suscetibilidade a infecções orais e sistêmicas, quando comparados a indivíduos euplóides imunocompetentes (Contaldo et al., 2021).

2.2 Doença Periodontal (DP)

A DP é responsável por afetar as estruturas do periodonto de suporte incluindo o osso alveolar, tem origem inflamatória, multifatorial e constitui uma das formas mais prevalentes de enfermidade óssea destrutiva em humanos. É causada pela interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro bem como fatores genéticos e ambientais. O seu início ocorre quando há interrupção da homeostasia entre o hospedeiro e bactérias periodontopatogênicas, causando uma grande colonização por cerca de 20 espécies bacterianas diferentes no interior do sulco gengival, especialmente bactérias gram-negativas anaeróbicas e microaerofílicas incluindo *Porphyromonas gingivalis*. É uma das bactérias mais comuns que desencadeiam respostas inflamatórias através de vários metabólitos secundários, incluindo os lipopolissacarídeos (LPS), que podem levar a destruição tecidual, por meio da ativação de citocinas pró inflamatórias como a IL-6 e o GM-CSF. (Tanaka et al., 2014, Carrada 2016, Cavalla et al., 2018, Li et al., 2018, Tsukahara et al., 2020).

O sulco gengival é delimitado por células epiteliais juncionais que são conectados por hemidesmossomos, criando uma superfície porosa e vascularizada, através da qual células imunológicas podem trafegar e detectar sinais de bactérias patogênicas. E existem aproximadamente 30.000 neutrófilos residentes trafegando através das células epiteliais juncionais a cada minuto, associados a outras células de defesa primária como células epiteliais e dendríticas que secretam citocinas e quimiocinas inflamatórias para preparar o sistema imunológico do hospedeiro para a resposta à invasão bacteriana (Rudick et al., 2019).

Uma vez que a inflamação subclínica está instalada, favorece o aumento da colonização de bactérias gram-negativas e perturbam a homeostasia do sulco gengival. E em sintonia receptores celulares reconhecem os componentes bacterianos, por exemplo, ácido desoxirribonucleico (DNA), fímbrias, flagelos, peptidoglicanos, LPS e aumentam o Receptor Toll-like (TLR) -2 e TLR - 4 sinalizando para amplificar a resposta imune do hospedeiro e a inflamação, causando danos colaterais aos tecidos periodontais (Degasperi et al., 2018).

Os microrganismos que estão presentes na região subgengival estimulam a produção de citocinas pelo epitélio gengival, resultando na expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade dos capilares, migração de células dendríticas e neutrófilos. Os fagócitos atuam na captura de bactérias periodontopatogênicas do biofilme e produzem citocinas pró-inflamatórias que perpetuam a inflamação, bem como regulam a sua amplitude. Especialmente em fagócitos, a secreção de citocinas é dependente da ativação do nuclear factor kappa B (NFkB) após o reconhecimento de Padrões Moleculares associados a Patógenos (PAMPs) como LPS através da via TLR. Depois deste tipo de reconhecimento microbiano, citocinas pró-inflamatórias da resposta inata são produzidos na doença periodontal, entre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e IL-6 (Degasperi et al., 2018).

2.3 Doença periodontal em pacientes com Síndrome de Down.

De acordo com a nova classificação das DPs é possível identificar e distinguir uma série de doenças e condições sendo a DP em pacientes com SD classificada em:

- Outras condições que afetam o periodonto: doenças sistêmicas ou condições que afetam os tecidos de suporte periodontal; abscessos periodontais e endodôntico-periodontais; deformidades e condições mucogengivais; forças oclusais traumáticas; dente e fatores relacionados à prótese (Albandar et al., 2018).

Cerca de 33% a 49% dos pacientes com SD apresentam problemas periodontais avançados, na faixa etária 16-45 anos, e 70% tornaram-se edêntulos pela DP (Wiel et al., 2018).

Indivíduos com SD tem um aumento na prevalência da DP em comparação com pacientes cromossomicamente normais, a má higiene bucal por si só não pode ser capaz de explicar a rápida e generalizada destruição periodontal, essa condição está associada ao comprometimento do sistema imunológico, como redução de células T e B, ausência de expansão normal de linfócitos na infância sub ótima, resposta de anticorpos às imunizações, diminuição da imunoglobulina A na saliva e quimiotaxia deficiente de neutrófilos (Ferreira et al., 2016, Caton et al., 2018, Papapanou et al., 2018, Habibe et al., 2020).

2.4 Citocinas

As citocinas são consideradas os principais reguladores do sistema imunológico, agindo em diferentes estágios de inflamação, tendo funções pró e anti-inflamatórias. E estas proteínas solúveis ligam-se a receptores específicos nas células-alvo e iniciam cascatas de sinalização que resultam em mudanças fenotípicas na célula, via regulação da expressão gênica, sendo o equilíbrio

fundamental para determinar a progressão ou regressão da cascata inflamatória (Miranda et al., 2020, Caldeira et al., 2021).

Em relação a IL-6, essa citocina é considerada pleiotrópica, ou seja, ela pode aumentar ou suprimir a destruição óssea inflamatória, sendo produzida no osso após estimulação por interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), e por uma variedade de células, como monócitos, fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais vasculares em resposta a desafios inflamatórios. Portanto, a variabilidade individual na capacidade de sintetizar e liberar IL-6 pode modificar a suscetibilidade, o desenvolvimento e a progressão de uma série de doenças autoimunes e doenças inflamatórias que podem estar associadas à desregulação na produção de IL-6 (Jawzali JI, 2018).

Essa super expressão da IL-6 foi observado num estudo de Zhang et al. (2017) onde observaram uma deficiência do sistema imune via células glias que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de alterações neuropatológicas como o Alzheimer aos 40 anos de idade e em 70% dos casos de demência por volta dos 55 a 60 anos de idade (Zhang et al., 2017).

Outras doenças, também podem estar associadas a desregulação da IL-6 como a artrite reumatoide (AR) caracterizada por inflamação da sinóvia, destruição da cartilagem articular e do osso, capaz de afetar várias articulações diatroidianas e órgãos como coração, pulmões e vasos sanguíneos, e a DP através da secreção de citocinas pró-inflamatórias via células imunes adaptativas e inatas, responsáveis por promover a osteólise (Li et al., 2018, Patschan et al., 2020).

A destruição inflamatória do tecido conjuntivo e do osso circundante são características tanto da AR quanto da DP, sendo a IL-6 principal indutora da

proteína C reativa, fibrinogênio e proteína amiloide, bem como outros fatores, que contribuem para perpetuação e gravidade de ambas as doenças (Ayravainen et al, 2018).

A IL-6 está associada a disfunção de linfócitos T reguladores (Tregs), um subconjunto de linfócitos T CD4 + com funções imunossupressoras contribuintes para a persistência da tolerância periférica, prevenção da autoimunidade e limitação da inflamação crônica. O desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea depende da relação antagônica entre as células lideradas pela atividade de linfócitos T auxiliares do tipo (TH17) que são células não supressoras do processo inflamatórios e células reguladoras da inflamação como os Tregs. O desequilíbrio entre essas células pode causar uma regulação positiva do ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL) e outras citocinas pró-inflamatórias, que promovem ainda mais perda óssea (Alvarez et al., 2020).

Essa citocina possui um papel fundamental na cascata inflamatória da DP, por meio de algumas funções biológicas fundamentais, incluindo a estimulação da proliferação de linfócitos T, diferenciação de linfócitos B, diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros causando uma inibição da osteogênese e estimulação da osteoclastogênese (Caldeira et al., 2021).

No início da resposta inflamatória do tecido periodontal, numerosas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 são produzidas e estão associadas ao estabelecimento e progressão da destruição periodontal, como mostra um estudo de Coorte realizado por Shaddox e colaboradores em 2011 com o objetivo de avaliar as condições periodontais locais, perfis inflamatórios e níveis

sistêmicos de LPS que observou níveis maiores de IL-6 em sítios doentes comparados com sítios saudáveis, perpetuando o ciclo de inflamação e destruição periodontal (Shaddox et al., 2011).

Num estudo realizado por Thunell et al (2010) com o objetivo de avaliar quantitativamente o efeito da terapia periodontal nos níveis de citocinas e quimiocinas, incluindo a IL-6 a partir de amostras do fluido gengival crevicular obtidas de seis indivíduos com DP e puderam concluir que a terapia periodontal diminuiu significativamente os níveis em locais doentes (Thunell et al., 2010).

A IL-6 também atua estimulando a produção do GM-CSF que é uma glicoproteína monomérica secretada por macrófagos, células T, mastócitos, células assassinas naturais, células endoteliais e fibroblastos (Hamilton 2019), e capaz de estimular a diferenciação de osteoclastos quando estimulado pela IL-6 como demonstra um estudo realizado por Gorny et al 2004.

O GM-CSF estimula as células-tronco a produzirem neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos que saem da circulação e migram para o tecido, amadurecem e se transformam em macrófagos podendo ter efeitos profundos na gravidade e progressão de AR, esclerose múltipla, e asma (Lam et al 2015).

Além de possuir efeitos sobre as células maduras do sistema imunológico, estes incluem, por exemplo, aumento da migração de neutrófilos que causam uma alteração dos receptores expressos na superfície das células, sendo encontrado em níveis elevados nas articulações em AR (Hamilton 2019). Tem sido associado ao desenvolvimento de mielopoiese anormal transitória (TAM) em pacientes com SD, afetando cerca de 10% dos bebês, podendo levar à mielodisplasia e leucemia aguda (Huggard et al., 2019).

No contexto da DP, o níveis de GM-CSF encontrados em pacientes com DP foi de 83,3% em pacientes adultos com periodontite e 63,3% em pacientes do grupo controle (Gamonal et al., 2003).

O que corrobora com um estudo realizado por Sakai et al (2006), com o objetivo de detectar citocinas inflamatórias e demonstraram que o GM-CSF está elevado em tecidos com DP quando comparado a tecidos saudáveis, participando diretamente do processo de destruição dos tecidos por meio da evolução do processo inflamatório, assim como o estudo realizado por Lam et al 2015, que induziu a DP em camundongos através de *Porphyromonas gingivalis* e concluiu que os níveis de GM-CSF estavam elevados em tecidos gengivais inflamados.

Uma revisão sistemática realizada por Akram et al. (2016) mostra a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana ou laserterapia como um complemento para raspagem e alisamento radicular na redução de citocinas inflamatórias na DP, os autores observaram que houve uma redução significativa da GM-CSF em mais de 70% dos estudos incluídos na revisão que mostraram uma redução da degradação do tecido ósseo (Akram et al., 2016).

3. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi determinar os níveis das citocinas IL-6 e CSF-GM no fluido gengival crevicular de indivíduos com SD e indivíduos cromossomicamente normais, ambos com DP em diferentes períodos do tratamento periodontal não cirúrgico.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Delineamento do estudo e seleção da casuística

Foram selecionados para este estudo longitudinal um total de 40 indivíduos, os quais foram divididos nos seguintes grupos com 20 indivíduos cada: Grupo 1- SD com DP e Grupo 2- Não-sindrômicos com DP (Controle).

Foram diagnosticados com DP aqueles pacientes com (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al. 2018):

- 1.O NIC interdental detectável em ≥ 2 dentes não adjacentes, ou
2. NIC ≥ 3 mm com bolsa ≥ 3 mm detectável em ≥ 2 dentes.

Esse número amostral foi estimado com base em estudo anterior (Tanaka et al., 2010), com a finalidade de se obterem valores estatisticamente relevantes para comprovar associação clínica, microbiológica e imunológica com a DP, a um valor de $\alpha = 0,05$ e poder de 80% (Tonetti et al. 2018).

Os indivíduos com SD foram selecionados em Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) e os não-sindrômicos, nas Clínicas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – UNESP). Todos os indivíduos que foram selecionados para compor a casuística deste estudo tiveram seu histórico médico e odontológico avaliados. Foram excluídos indivíduos com menos de 20 dentes na cavidade bucal, aqueles que necessitem de antibiótico terapia profilática para realização de procedimentos odontológicos invasivos (ex: exodontia, gengivectomia), que fizeram uso de antibióticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, antiinflamatórios e/ou de imunossupressores nos últimos 3 meses, com história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, com alteração sistêmica ou alguma doença infecciosa, fumantes e aqueles com SD do tipo mosaico.

Após explicar de maneira acessível, os objetivos da pesquisa aos indivíduos selecionados e seus responsáveis, estes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos da FOAr (número do protocolo 62/11) (ANEXO 1).

4.2. Exame Clínico Periodontal

Os participantes desta pesquisa foram submetidos a um exame periodontal realizado por meio de secagem prévia da região com jato de ar, e uso de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams, espelho plano e pinça clínica, devidamente esterilizados. Este exame foi realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado e consistiu das seguintes avaliações:

- Índice de placa visível (IPV) (Ainamo, Bay, 1975).
- Profundidade de sondagem (PS) (Mombelli, Lang, 1994).
- Sangramento à sondagem (SS) (Ainamo, Bay, 1975).
- Nível de inserção (NI) (Mombelli, Lang, 1994).

As análises foram realizadas em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual e os dados obtidos foram anotados em ficha específica.

4.3. Tratamento periodontal não-cirúrgico

Todos os indivíduos participantes do estudo receberam tratamento periodontal básico (raspagem, alisamento e polimento supragengival), que foi realizado por um único cirurgião-dentista especialista em Periodontia, e receberam orientação de higiene bucal, sendo esta reforçada a cada consulta. Posteriormente à raspagem supragengival e contando com a colaboração

quanto à higienização bucal, foram realizados a raspagem e alisamento radicular subgengival. Após o término do tratamento periodontal, a orientação de higiene bucal foi reforçada nas consultas de manutenção que foram agendadas a cada 15 dias, até totalizar 90 dias. Nos acompanhamentos de 45 e 90 dias, foi realizada nova coleta de fluido gengival crevicular nos mesmos sítios determinados para a coleta inicial, e foi repetido o exame periodontal.

4.4. Coleta de Fluido Gengival para Análise Imunológica

Para evitar interferências devido à sondagem, as coletas do fluido gengival foram realizadas uma semana após o exame clínico periodontal. Estas coletas foram feitas pelo mesmo pesquisador com a finalidade de diminuir possíveis variações no método.

Para a coleta, para ambos os grupos (indivíduos com SD e não sindrômicos), foram selecionados 3 sítios doentes com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm e perda de inserção maior ou igual a 3 mm; e 3 sítios sadios com profundidade de sondagem menor que 3 mm e com ausência de perda de inserção, em dentes diferentes, não-adjacentes. Previamente à coleta, foi removido o biofilme supragengival com gaze esterilizada, a região será isolada com rolos de algodão, e, cuidadosamente seca com suaves jatos de ar.

O fluido gengival foi coletado com o auxílio de um filtro especial (*Periopaper* - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA) que foi introduzido em cada sítio selecionado permanecendo durante 1 minuto. Posteriormente, o volume de fluido coletado de cada sítio foi quantificado utilizando-se um equipamento específico para esta metodologia (*Periotron 8000* - ProFlow Inc., Amityville, NY, USA). Como meio de transporte do fluido coletado, foi utilizado 100 µL de uma

solução à base de PBS (solução salina fosfatada tamponada) associada a um coquetel de inibidores de proteases para a manutenção da viabilidade das substâncias. Os tubos foram conservados a uma temperatura de -80°C para posterior análise.

No caso de a amostra estar contaminada com sangue está foi descartada, o sangramento do sulco foi controlado por irrigação com solução fisiológica e nova coleta foi realizada após 10 minutos.

4.5. Análise Imunológica

As amostras de fluido gengival foram utilizadas para avaliação da quantidade das proteínas IL-6 e o GM-CSF. As concentrações foram medidas utilizando os kits de Elisa para IL-6 e GM-CSF, seguindo o protocolo do fabricante (Human IL-6 Elisa Kit ab100572 e Human CSF-GM Elisa Kit (CSF2) ab174448).

A quantidade total de citocinas foi expressa em pg e a concentração em pg/ml.

5. Análise Estatística:

As condições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos, antes e após o tratamento foram confirmadas pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O programa utilizado para as análises os dados foi o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados demográficos e clínicos, e o volume do fluido gengival crevicular tiveram uma distribuição normal. Para as citocinas, quando necessário, os dados foram transformados em logaritmos decimais para a normalização. Além disso, uma correção dos graus de liberdade foi aplicada quando ocorreu heterogeneidade

de variâncias com normalidade dos resíduos. Assim, para a variável gênero foi utilizado o teste Qui-quadrado e, para os dados clínicos, volume do fluido gengival e dosagens de citocinas foi utilizado o teste-t de Student para analisar as diferenças entre os grupos, e o teste-t de Student para dados pareados para analisar os diferentes períodos em ambos os grupos. Quando os dados clínicos foram separados de acordo com a condição dos sítios (sadios e doentes), a normalidade não pode ser provada mesmo com a transformação logarítmica. Neste caso, adotou-se o teste U de Mann-Whitney para a comparação entre os dois grupos antes e após o tratamento e o teste de Wilcoxon para dados pareados para avaliar o efeito do tratamento sobre cada grupo. Para estudar a correlação da concentração de cada citocina com a condição dos sítios (sadios e doentes) foram empregados os coeficientes de correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi de 0,05.

6. Resultados

Os momentos avaliados para ambos os grupos foram antes, acompanhamento de 45 dias e 90 dias após o tratamento periodontal.

6.1. Características demográficas e Parâmetros clínicos

As características demográficas e os dados clínicos estão presentes na Tabela 1 e Figura 1. O grupo Controle apresentou uma idade média maior do que o grupo SD ($p=0,001$). Em relação ao gênero, não foi observada diferença estatística entre os grupos. Para profundidade de sondagem (PS) não foi observada diferença estatística entre os grupos nos momentos antes e 45 dias após o tratamento periodontal. Porém, houve uma redução da PS no grupo SD e controle 45 dias após do tratamento ($p=0.0012$ e $p=0,001$, respectivamente) e

se manteve 90 dias após o tratamento. O nível de inserção (NI) também não mostrou diferença estatística entre os grupos, mas houve diferença estatística entre os períodos (antes x 45 dias) tanto para o grupo SD quanto para o Controle ($p=0,0084$ e $p=0,0007$, respectivamente) e se manteve após 90 dias após o tratamento. O índice de placa visível foi maior para o grupo SD, tanto no início como 45 dias após o tratamento ($p<0,0001$ e $p=0,0158$, respectivamente) mesmo no período de 90 dias após e, para ambos os grupos, o tratamento determinou uma redução significativa deste ($p\leq 0,0001$). Para a variável sangramento marginal, as análises demonstraram efeito significativo do período de avaliação (antes x 45 dias), sugerindo que o tratamento diminuiu as médias dos dois grupos (SD e controle; $p<0,0001$ e $p=0,0004$, respectivamente) e se manteve menor 90 dias após o tratamento. Após o tratamento, não foi observado nenhuma diferença estatística em ambos os grupos. Para o sangramento à sondagem não houve diferença estatística entre os dois grupos, porém 45 dias após o tratamento determinou redução deste, tanto no grupo SD quanto no grupo Controle ($p<0,0001$ e $p=0,0002$, respectivamente) e se manteve menor 90 dias após o tratamento.

Tabela 1. Características Demográficas (\pm DP) dos grupos estudados

Características (Média \pm DP)	Grupos		Valor de p^*
	Síndrome de Down n=20	Controle n=10	
Idade (anos) (\pm)	31,91 (\pm 5,85)B	41,25 (\pm 6,17)A	0,001
Gênero (M/F)	12/8 ^a	6/4A	NS

Letras diferentes (maiúscula na horizontal comparando entre os grupos) indicam diferenças estatisticamente significantes.

valor de p^* = Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle, exceto o gênero, o qual foi utilizado o teste Qui-quadrado.

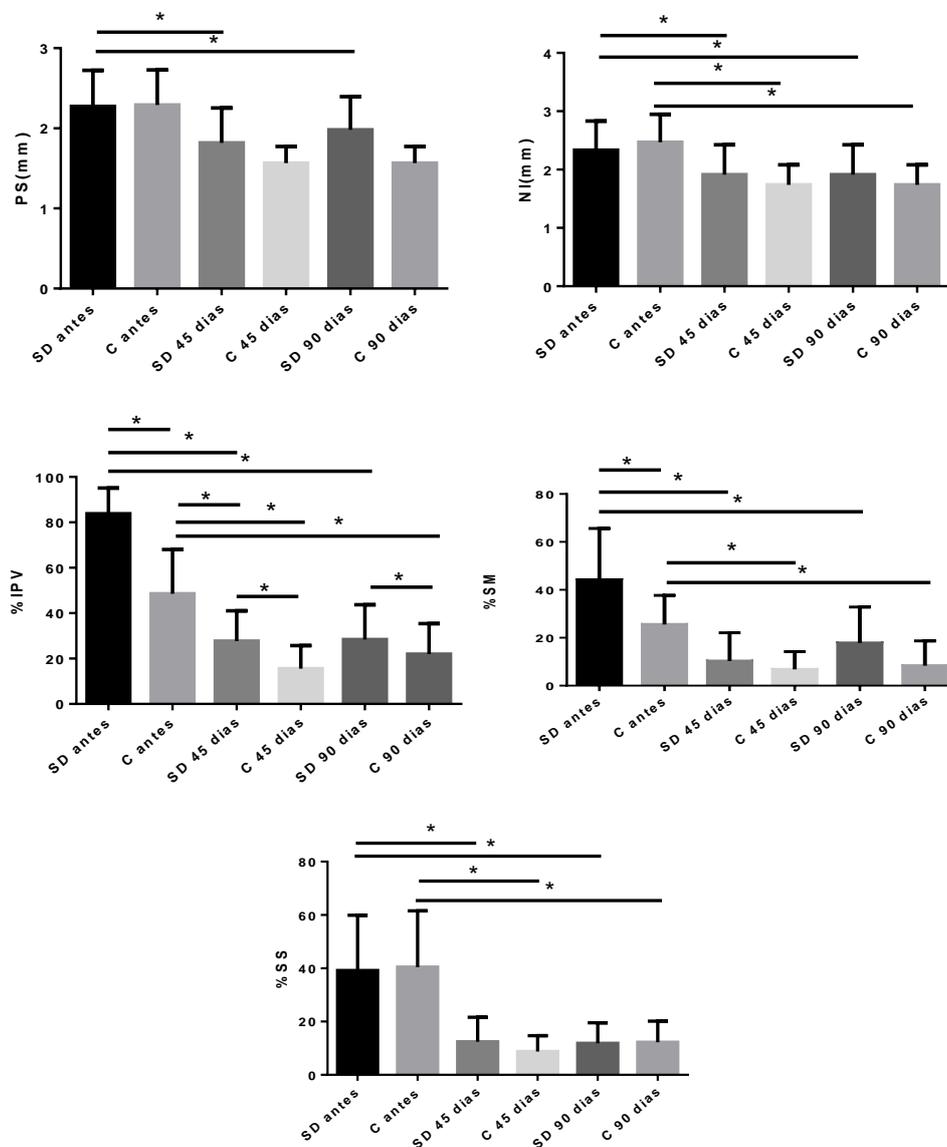


Figura 1. Parâmetros clínicos dos grupos estudados.

PS: Profundidade de sondagem; NI: Nível de inserção; IPV: Índice de placa visível; SM: Sangramento marginal e SS: Sangramento à sondagem.

Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle e Teste-t pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle em diferentes períodos.

* $p < 0.05$

6.2. Avaliação dos sítios selecionados nos diferentes períodos

Os parâmetros clínicos (PS, NI e SS) dos sítios coletados foram similares nos grupos SD e Controle tanto para os sítios doentes como para os sadios nos períodos antes e 45 dias após o tratamento (teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$; Tabela 2 e Figura 2). Nos sítios doentes, o tratamento periodontal não cirúrgico resultou numa diminuição significativa nos parâmetros clínicos analisados em ambos os grupos (SD e Controle) (teste de Wilcoxon, $p < 0,05$, Tabela 2 e Figura 2) e a redução se manteve 90 dias após o tratamento. Para os sítios sadios, antes e 45 dias após o tratamento, não houve diferença estatística para ambos os grupos e se manteve 90 dias após o tratamento. Assim, observamos que o tratamento foi eficiente nos sítios doentes e manteve a saúde periodontal nos sítios sadios, em ambos os grupos SD e controle.

Tabela 2 – Sangramento a sondagem (porcentagem) em ambos os grupos com DP (antes e depois do tratamento) dos sítios coletados.

	Parâmetros Clínicos	Grupos		valor de p^*
		Síndrome de Down	Controle	
Sítios doentes	SS (%)			
	Antes	89Aa	75Aa	NS
	45 dias	9,52Ab	12,5Ab	NS
	90 dias*	11Ab	15Ab	NS
	valor de p^{**}	<0,0001	<0,0001	
Sítios sadios	SS (%)			
	Antes	4,35Aa	0Aa	NS
	45 dias	0Aa	0Aa	NS
	90 dias*	0Aa	0Aa	NS
	valor de p^{**}	NS	NS	

Letras diferentes (maiúscula na horizontal comparando entre os grupos e minúscula na vertical comparando entre os tempos) indicam diferenças estatisticamente significantes. teste de Mann-Whitney para avaliar diferença entre Síndrome de Down e Controle em cada período e teste de Wilcoxon test para avaliar cada grupo em diferentes períodos.

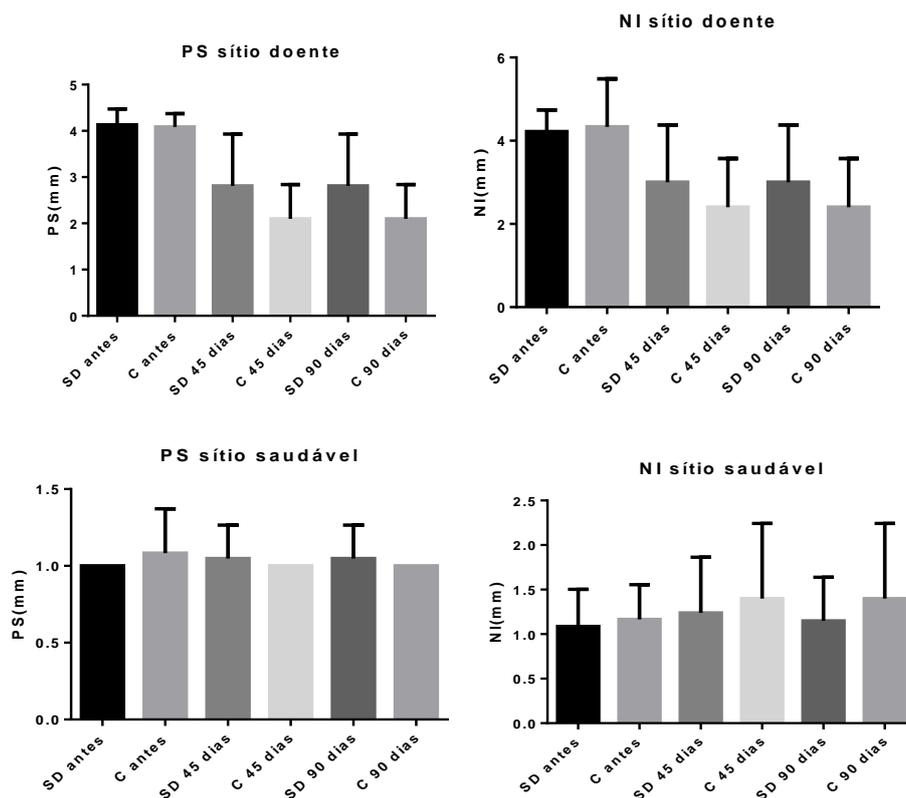


Figura 2. Profundidade de sondagem e nível de inserção em ambos os grupos com DP (antes e depois do tratamento) dos sítios coletados. Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle. Teste-t pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle em diferentes períodos.

6.3. Volume do Fluido gengival crevicular e as Concentrações das citocinas estudadas

5.3.1. Sítios doentes: antes e depois do tratamento

Os indivíduos com SD possuíam um maior volume de fluido gengival e maior concentração de citocinas (IL-6 e CSF-GM) em comparação com indivíduos do grupo Controle antes do tratamento periodontal ($p < 0,05$; Tabela 3 e Figura 3).

Após o tratamento, todas as citocinas (IL-6 e CSF-GM) tiveram uma maior quantidade no grupo síndrômico em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Porém, o volume do fluido não apresentou diferença nos grupos estudados.

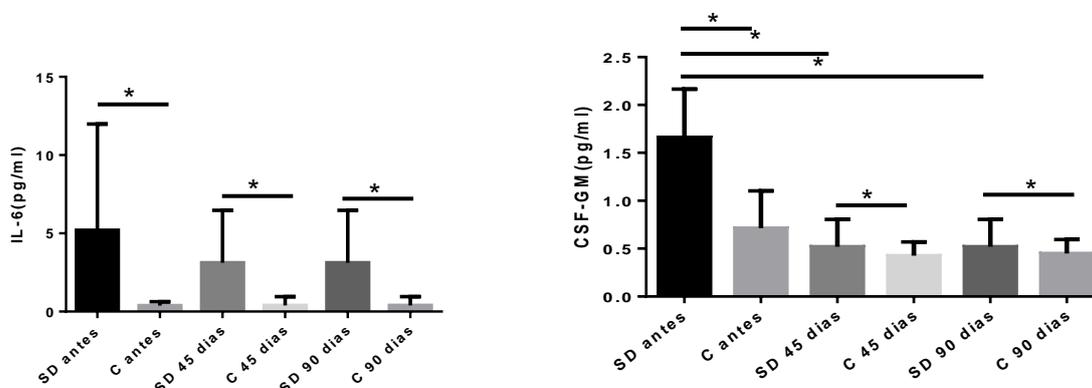
No grupo SD, o volume do fluido e a citocinas CSF-GM apresentou uma diminuição significativa depois do tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Volume de fluido gengival crevicular (μL) e a concentração de citocinas (pg/mL) encontradas nos sítios doentes dos grupos estudados antes e depois do tratamento

			Síndrome de Down	Controle	valor de p^*
Sítios Sadios	Fluido gengival crevicular (μL)	Antes	0,28 ($\pm 0,21$)Aa	0,25 ($\pm 0,15$)Aa	NS
		45 dias	0,29 ($\pm 0,19$)Aa	0,25 ($\pm 0,17$)Aa	NS
		90 dias	0,28 ($\pm 0,21$)Aa	0,25 ($\pm 0,16$)Aa	NS
	valor de p		NS	NS	
Sítios doente	Fluido gengival crevicular (μL)	Antes	0,95 ($\pm 0,40$)Aa	0,65 ($\pm 0,38$)Ba	0,0373
		45 dias	0,70 ($\pm 0,31$)Ab	0,53 ($\pm 0,30$)Aa	NS
		90 dias	0,78 ($\pm 0,35$)Ab	0,56 ($\pm 0,31$)Aa	NS
	valor de p		0,0114	NS	

Letras diferentes (maiúscula na horizontal comparando entre os grupos e minúscula na vertical comparando entre os tempos) indicam diferenças estatisticamente significantes.

Sítios doentes



Sítios sadios

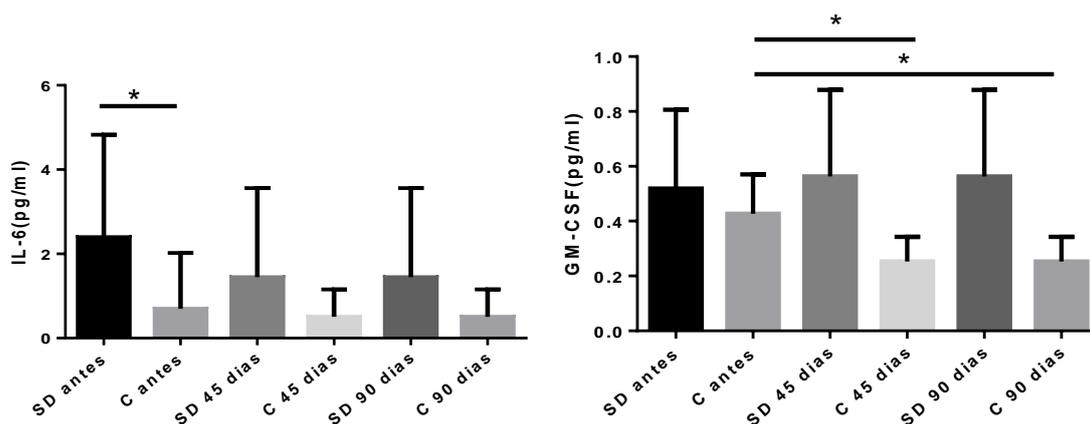


Figura 3 - Concentração de citocinas (pg/mL) encontradas nos sítios coletados dos grupos estudados antes e depois do tratamento.

Teste-t não pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle e Teste-t pareado para analisar os grupos Síndrome de Down e Controle em diferentes períodos.

* $p < 0.05$

5.3.2. Sítios sadios: antes e depois do tratamento

Nos sítios sadios, não foram encontradas diferenças nos volumes do fluido e nem nas concentrações da citocina CSF-GM em ambos os grupos. Somente a citocina IL-6 apresentaram concentrações maiores nos grupos com SD em comparação com os grupos controle antes do tratamento ($p < 0,05$; Tabela 3 e Figura 3).

No grupo SD, o volume do fluido e as concentrações das proteínas não tiveram diferença estatística em ambos os períodos. Já para o grupo Controle, somente a citocina CSF-GM teve uma redução na concentração destas proteínas depois do tratamento ($p < 0,05$). Para a citocina IL-6 podemos observar uma correlação positiva ($r: 0,89$) nos períodos estudados (Tabela 4).

5.3.3. Síndrome de Down: sítios doentes x sítios sadios nos períodos antes e 45 dias após o tratamento

Antes do tratamento, o volume do fluido e a citocina CSF-GM tem uma maior concentração nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios

($p < 0,05$; Tabela 3 e Figura3). Na IL-6 foi observada uma correlação positiva ($r:0,45$) entre ambos os sítios antes do tratamento (Tabela 4). Depois do tratamento, o volume do fluido e as citocinas IL-6 e CSF-GM tiveram uma maior concentração em sítios doentes, (Tabela 3 e 4).

5.3.4. Controle: sítios doentes x sítios sadios nos períodos antes e 45 dias após o tratamento

Antes do tratamento, o volume do fluido tem maior quantidade nos sítios doentes em comparação com os sítios sadios. Correlação positiva foi encontrada para a citocina CSF-GM ($r:0,96$; Tabela 4) entre ambos os sítios após 45 dias do tratamento, mas essa correlação não é significativa estatisticamente.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação (valor de p) comparações das quantidades das citocinas transformadas em log10 entre os sítios doentes e saudáveis dos grupos estudados, nos períodos de antes e 45 dias após o tratamento periodontal.

	Síndrome de Down				Controle			
	doente	Sadio	antes	45dias	doente	Sadio	antes	45dias
Citocinas	antes x 45dias	antes x 45dias	doente x sadio	doente x sadio	antes x 45dias	antes x 45dias	doente x sadio	doente x sadio
IL-6	0,29 (0,19)	0,20 (0,42)	0,45 (0,03)	0,39 (0,10)	0,32 (0,44)	0,89 (0,04)	0,44 (0,24)	0,48 (0,41)
CSF-GM	0,16 (0,52)	0,06 (0,82)	-0,11 (0,64)	0,44 (0,09)	-0,59 (0,60)	0,82 (0,18)	-0,31 (0,55)	0,96 (0,17)

Concentração das citocinas transformadas em log10. Distribuição normal para todas as citocinas, assim foi aplicada a correlação de Person ($p < 0,05$). Em negrito, estão os valores estatisticamente significante. *dados de antes e 45 dias após o tratamento periodontal.

7. Discussão

Diversas evidências mostram que o aumento da prevalência e gravidade da DP em indivíduos com SD pode ser atribuído a resposta deficiente do sistema imune frente ao processo inflamatório como a disfunção de neutrófilos, disfunção de linfócitos T, mediadores inflamatórios, redução do fluxo salivar e capacidade quimiotática reduzida (Ferreira et al., 2016, Caton et al., 2018, Papapanou et al., 2018, Habibe et al., 2020).

Precusores vindos da medula óssea se diferenciam no timo em células T que migram para periferia, circulam nos órgãos linfoides secundários, e fazem o reconhecimento de antígenos através de células apresentadoras de antígenos. A partir desse processo essas células se diferenciam em células TCD4+, sendo sua função auxiliar (T helper) e podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 ou ainda outros subtipos, cada um deles secretor de um conjunto particular de citocinas (Cutress et al., 1971).

Neste estudo, as citocinas produzidas pelas células Th1 (IL-6 e CSF-GM) estão em maior quantidade nos sítios doentes de indivíduos com SD com DP em comparação com o grupo Controle, antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico. Eventualmente, o desbalanço desses mediadores inflamatórios possam levar a uma maior severidade da DP nesses indivíduos com SD.

No sangue de indivíduos com SD foi encontrada em menores concentrações em comparação com o grupo controle (Cetiner et al., 2010). No entanto, na cultura de células e no fluido gengival foram observadas em maior concentração nos SD (Tsilingaridis G et al., 2012, Domeij H et al., 2002, Cetiner et al., 2010, Jawzali JI., 2018) resultados que estão de acordo com os

observados neste estudo tanto para os sítios doentes e saudáveis, antes do tratamento.

Segundo Offenbacher et al. (2010), Becerik et al. (2012), e Shimada et al. (2013), para os indivíduos cromossomicamente normais, as concentrações de IL-6 são baixas e as diferenças entre pacientes com periodontite e pacientes periodontalmente saudáveis são bastante discretas. Porém, Johnson et al. (2004) observaram que as concentrações aumentavam de forma gradual de acordo com o aumento da profundidade de sondagem em sítios doentes de pacientes com periodontite, sugerindo que esta citocina pode estar colaborando no processo de reabsorção óssea. A IL-6 parece estar envolvida com as fases iniciais da DP, ela atua intensificando a inflamação e fibroblastos gengivais obtidos de tecidos com periodontite são mais responsivos ao LPS da *P. gingivalis* do que fibroblastos de tecidos saudáveis, secretando níveis elevados de IL-6 quando expostos por menos tempo e em menor dose (Kang et al., 2016).

Não foi encontrado na literatura nenhum estudo avaliando a citocina CSF-GM no fluido gengival de indivíduos com SD com DP. Em indivíduos cromossomicamente normais, a concentração desta citocina não teve diferença antes e depois do tratamento periodontal em pacientes com periodontite crônica (Thunell et al., 2010). No entanto, outros estudos relataram diferenças significativas em níveis de citocinas entre locais saudáveis e doentes, com a maioria dos níveis mais elevados de citocinas em locais doentes (Sakai et al., 2006, Akram et al., 2016). No presente estudo a concentração dessa citocina foi maior em pacientes SD do que nos não sindrômicos apenas em sítios doentes e, houve uma redução significativa após o tratamento.

8. Conclusão

As citocinas analisadas podem-se sugerir que nos indivíduos com SD, o sistema imune não é competente na função e na produção destes mediadores inflamatórios. Notavelmente, podemos observar uma maior quantidade de citocinas IL-6 e CSF-GM no fluido gengival desses indivíduos em comparação com os do grupo controle. Após o tratamento periodontal, embora houvesse melhora nos parâmetros clínicos e redução na concentração de ambas as citocinas, elas ainda permaneceram em altas concentrações nos sítios doentes dos indivíduos com SD, o que pode demonstrar que eles apresentam uma resposta muito mais intensa frente ao processo inflamatório, explicando em parte, a alta prevalência e severidade da DP em pacientes com SD.

Referências bibliográficas

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975 Dec;25(4):229-35.
2. Akram Z, Abduljabbar T, Sauro S, Daood U. Effect of photodynamic therapy and laser alone as adjunct to scaling and root planing on gingival crevicular fluid inflammatory proteins in periodontal disease: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016 Dec;16:142-153.
3. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;45(July 2016):S171–89.
4. Alvarez, C., Suliman, S., Almarhoumi, R. et al. Regulatory T cell phenotype and anti-osteoclastogenic function in experimental periodontitis. *Sci Rep* 10, 19018 (2020).

5. Äyräväinen L, Heikkinen AM, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Laasonen L, Moilanen E, Hämäläinen M, Tervahartiala T, Meurman JH, Leirisalo-Repo M, Sorsa T. Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status. *Ann Med*. 2018 Jun;50(4):333-344.
6. Brasil, Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. “Não deixe ninguém para trás”: Dia Internacional da Síndrome de Down 2019.
7. 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):1304-13.
8. Caldeira, François Isnaldo Dias et al. Systematic review of ratios between disease /health periodontitis modulators and meta-analysis of their levels in gingival tissue and biological fluids. *Archives of Oral Biology* 2021, v. 127.
9. Carrada CF, Almeida Ribeiro Scalioni F, Evangelista Cesar D, Lopes Devito K, Ribeiro LC, Almeida Ribeiro R. Salivary Periodontopathic Bacteria in Children and Adolescents with Down Syndrome. *PLoS One*. 2016 Oct 11;11(10):e0162988.
10. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8.
11. Cavalla F, Bigueti CC, Dionisio TJ, Azevedo MCS, Martins W Jr, Santos CF, Trombone APF, Silva RM, Letra A, Garlet GP. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with decreased risk of chronic and aggressive periodontitis: A case-control analysis based in disease resistance and susceptibility phenotypes. *Cytokine*. 2018 Mar;103:142-149.
12. Cetiner S, Demirhan O, Inal TC, Tastemir D, Sertdemir Y. Analysis of peripheral blood T cell subsets, natural killer cells and serum cytokine levels in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet* 2010; 37: 233-237.

13. Contaldo M, Lucchese A, Romano A, Della Vella F, Di Stasio D, Serpico R, Petruzzi M. Oral Microbiota Features in Subjects with Down Syndrome and Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 26;22(17):9251.
14. Cutress TW. Periodontal disease and oral hygiene in trisomy 21. *Arch Oral Biol*, v. 16, no. 11, p. 1345-55, Nov 1971.
15. Degasperi, G. , Etchegaray, A. , Marcelino, L. , Sicard, A. , Villalpando, K. and Pinheiro, S. (2018) Periodontal Disease: General Aspects from Biofilm to the Immune Response Driven by Periodontal Pathogens. *Advances in Microbiology*, 8, 1-17.
16. Díaz-Quevedo AA, Castillo-Quispe HML, Atoche-Socola KJ, Arriola-Guillén LE. Evaluation of the craniofacial and oral characteristics of individuals with Down syndrome: A review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2021 Jan 20:S2468-7855(21)00008-2.
17. Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2002 Aug;110(4):302-6.
18. Ferreira R, Michel RC, Gregghi SL, Resende ML, Sant'Ana AC, Damante CA, Zangrando MS. Prevention and Periodontal Treatment in Down Syndrome Patients: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016 Jun 29;11(6):e0158339.
19. Fonseca FM, Oliveira LST, Pereira RGB. The importance of early stimulation in children with down syndrome. *Rev. Saúde dos Vales ISSN: 2674-8584 V.1 - N.1 – 2021.*
20. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2003 Jul;30(7):616-23.
21. Gorny G, Shaw A, Oursler MJ. IL-6, LIF, and TNF-alpha regulation of GM-CSF inhibition of osteoclastogenesis in vitro. *Exp Cell Res.* 2004 Mar 10;294(1):149-58.
22. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation. *J Exp Med.* 2020 Jan 6;217(1):e20190945.
23. Habibe CH, Yoshida RA, Gorjão R, de Gutierrez GM, Heller D, Birbrair A, Santos MT. Comparison of salivary cytokines levels among individuals

- with Down syndrome, cerebral palsy and normoactive. *J Clin Exp Dent*. 2020 May 1;12(5):e446-e451.
24. Huggard D, Kelly L, Ryan E, McGrane F, Lagan N, Roche E, Balfe J, Leahy TR, Franklin O, Doherty DG, Molloy EJ. Increased systemic inflammation in children with Down syndrome. *Cytokine*. 2020 Mar;127:154938.
25. Jawzali JI. Salivary Interleukin 6 and Sialic acid in Periodontitis. *Braz. J. Oral Sci.* [Internet]. 2018Apr.3 [cited 2021Nov.28];17:e18015.
26. John A. Hamilton; GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* 6 January 2020; 217 (1): e20190945.
27. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):196-209.
28. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Hamilton JA, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Orth RK, Tan Y, Walsh KA, Fleetwood AJ, Reynolds EC. GM-CSF and uPA are required for Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. *Immunol Cell Biol*. 2015 Sep;93(8):705-15.
29. Li R, Tian C, Postlethwaite A, Jiao Y, Garcia-Godoy F, Pattanaik D, Wei D, Gu W, Li J. Rheumatoid arthritis and periodontal disease: What are the similarities and differences? *Int J Rheum Dis*. 2017 Dec;20(12):1887-1901.
30. Miranda TS, Figueiredo NF, Figueiredo LC, Silva HDPD, Rocha FRG, Duarte PM. Cytokine profiles of healthy and diseased sites in individuals with periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2020 Dec;120:104957.
31. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000*. 1994 Feb;4:81-6.
32. Nuernberg MAA, Ivanaga CA, Haas AN, Aranega AM, Casarin RCV, Caminaga RMS, Garcia VG, Theodoro LH. Periodontal status of individuals with Down syndrome: sociodemographic, behavioural and family perception influence. *J Intellect Disabil Res*. 2019 Oct;63(10):1181-1192.
33. Offenbacher S, Barros S, Mendoza L, Mauriello S, Preisser J, Moss K, de Jager M, Aspiras M. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory

- mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol*. 2010 Apr;37(4):324-33.
34. Papapanou Panos N et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182.
 35. Patschan S, Bothmann L, Patschan D, Henze E, Schmalz G, Ritter O, Ziebolz D. Association of cytokine patterns and clinical/laboratory parameters, medication and periodontal burden in patients with rheumatoid arthritis (RA). *Odontology*. 2020 Jul;108(3):441-449.
 36. Rudick, CP, Lang, MS, Miyamoto, T. Understanding the pathophysiology behind chairside diagnostics and genetic testing for IL-1 and IL-6. *Oral Dis*. 2019; 25: 1879– 1885.
 37. Sakai, Akihiko et al. “Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array.” *Journal of periodontology* 77 5 (2006): 856-64 .
 38. Scalioni FAR, Carrada CF, Martins CC, Ribeiro RA, Paiva SM. Periodontal disease in patients with Down syndrome: A systematic review. *J Am Dent Assoc*. 2018 Jul;149(7):628-639.e11.
 39. Shaddox, L M et al. “Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis.” *Journal of dental research* vol. 90,9 (2011): 1140-4.
 40. Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, Yoshie H. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay. *Arch Oral Biol*. 2013 Jun;58(6):724-30.
 41. Tanaka, Marcia H. et al. Expression of interferon-gamma, interferon-alpha and related genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *Cytokine*. London: Academic Press Ltd- Elsevier B.V. Ltd, v. 60, n. 3, p. 875-881, 2012.
 42. Tanaka, Marcia Hiromi et al. The effect of conventional mechanical periodontal treatment on red complex microorganisms and clinical parameters in Down syndrome periodontitis patients: a pilot study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 34, n. 3, p. 601-608, 2014.

43. Tanaka, Marcia Hiromi. Análise dos parâmetros clínicos periodontais e expressão genética de interferons alfa, gama e genes relacionados em indivíduos portadores de Síndrome de Down com doença periodontal. 2010. 129 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2010;
44. Teitelbaum AP, Pochapski MT, Jansen JL, Sabbagh-Haddad A, Santos FA, Czulniak GD. Evaluation of the mechanical and chemical control of dental biofilm in patients with Down syndrome. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009 Oct;37(5):463-7.
45. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontal Res.* 2010 Feb;45(1):148-52.
46. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172.
47. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modéer T. T-helper-related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clin Oral Investig.* 2012 Feb;16(1):267-73.
48. Tsukahara, Takamitsu et al. Consecutive intra-gingival injections of lipopolysaccharide and butyric acid to mice induce abnormal behavior and changes in cytokine concentrations. *J Neuroinflammation* 17, 331 (2020).
49. Wiel B, van Loon M, Reuland W, Bruers J. Periodontal disease in Down's syndrome patients. A retrospective study. *Spec Care Dentist.* 2018 Sep;38(5):299-306.
50. Zhang Y, Che M, Yuan J, Yu Y, Cao C, Qin XY, Cheng Y. Aberrations in circulating inflammatory cytokine levels in patients with Down syndrome: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Sep 19;8(48):84489-84496

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

 Comitê de Ética em Pesquisa 

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "*ANÁLISE CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN COM DOENÇA PERIODONTAL*" sob o protocolo nº 62/11, de responsabilidade do Pesquisador (a) *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 06 (seis) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "*CLINICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENE EXPRESSION ANALYSIS IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME WITH PERIODONTAL DISEASE*", protocol number 62/11, under Dr. *ELISA MARIA APARECIDA GIRO* responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 06 (six) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 14 de fevereiro de 2012.


Prof. Dr. Mauricio Meirelles Nagle
Coordenador