

# EXPRESSÃO DE CITOCINAS RELACIONADAS À RESPOSTA Th17 NOS TECIDOS GENGIVAL E INTESTINAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Expression of Th17 related cytokines response in the gingival and intestinal tissue from patients with periodontitis and inflammatory bowel disease

Carlos Marcelo da Silva Figueredo<sup>1</sup>, Ana Paula Morais Martins Côrtes<sup>2</sup>, Ronaldo Lira-Junior<sup>3</sup>, Juliana Bittencourt Menegat<sup>4</sup>, Ana Teresa Carvalho<sup>5</sup>, Ricardo Guimarães Fischer<sup>1</sup>, Anders Gustafsson<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Professor associado de Periodontia da Faculdade de odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

<sup>2</sup> Mestre em Periodontia pela Faculdade de odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

<sup>3</sup> Doutorando em Periodontia pela Faculdade de odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

<sup>4</sup> Pós-doutoranda em Periodontia pela Faculdade de odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

<sup>5</sup> Professora Associada da Disciplina de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva - HUPE- da Faculdade de Medicina da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>6</sup> Divisão de periodontia, Departamento de Medicina dentária, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia.

Recebimento: 09/11/16 - Correção: 12/12/16 - Aceite: 23/01/17

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a expressão das citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e do ligante solúvel do CD40 (sCD40L) no tecido gengival (G) e compará-la com a expressão na mucosa intestinal (MI) de forma pareada em pacientes com periodontite crônica e Doença Inflamatória Intestinal (DII).

**Material e métodos:** Participaram do estudo 22 pacientes com DII, média de idade de 40 anos (DP  $\pm$  14,5 anos). Foram registrados os parâmetros clínicos e periodontais, e foram coletadas biópsias gengivais e intestinais pareadas. As mesmas foram homogeneizadas usando um disruptor celular. Os níveis das citocinas foram analisados pelo método multiensaio multiplex e posteriormente compensados pelo peso das amostras.

**Resultados:** Após análise estatística, observamos níveis significativamente maiores de IL-23 ( $p=0,02$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p=0,01$ ) e significativamente menores de IL-31 ( $p=0,02$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,01$ ) no tecido gengival quando comparamos com o intestinal. Correlações significantes ocorreram entre o tecido gengival e o intestinal de forma positiva para a IL-6 (G) com a IL-23(MI) e de forma negativa entre IL-23 (G) com IL-1 $\beta$  (MI), IL-10(MI), IL-17A (MI) e IFN- $\gamma$  (MI).

**Conclusão:** Concluímos que a IL-23 e IFN- $\gamma$  encontram-se significativamente aumentadas no tecido gengival, quando comparados à mucosa intestinal, sugerindo um papel importante destas citocinas na manifestação da periodontite em pacientes com DII.

**UNITERMOS:** Periodontite. Doença inflamatória intestinal. Citocinas. Th17. IL-23. R Periodontia 2017; 27: 11-22.

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica inflamatória que compromete a integridade dos tecidos de suporte do dente, que incluem gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar, resultando na destruição do aparato de inserção e, em casos severos, levando a perda dentária. Ela ocorre após a agressão bacteriana desencadear respostas imunológicas

do hospedeiro causando danos aos tecidos. As espécies bacterianas são necessárias para iniciar e manter essas respostas que levam à destruição, entretanto, o papel central da patogênese da doença é exercido pelo desequilíbrio das respostas inata e adaptativa do hospedeiro (Kinane & Mark Bartold, 2007). O perfil imunoinflamatório da periodontite tem sido estudado em associação com diversas doenças crônicas inflamatórias como diabetes mellitus (Corbella *et*

*al.*, 2013; Preshaw and Bissett, 2013), doença cardiovascular (Lira-Junior *et al.*, 2014), artrite reumatoide (Smit *et al.*, 2015), doença renal crônica (Brito *et al.*, 2012) e doença inflamatória intestinal (DII) (Brito *et al.*, 2008; Figueredo *et al.*, 2011). Alguns estudos mostram uma prevalência aumentada de periodontite nos pacientes com DII (Flemmig *et al.*, 1991; Grössner-Schreiber *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2008) 62 patients seeking treatment of IBD and 59 matched healthy controls of a dental practice were clinically examined. Oral soft-tissue alterations, the decayed, missing and filled tooth surface (DMF-S).

A DII é uma doença crônica, complexa, mediada imunologicamente, dividida em duas principais entidades distintas: a Doença de Crohn (DC) e Retocolite ulcerativa idiopática (RCUI). Os fatores imunológicos desempenham um papel chave em ambas as doenças (Ananthakrishnan, 2015). Uma resposta inapropriada do sistema imune intestinal à sua flora ou a outros agentes é característica da DII. As alterações na resposta imune na DII, entretanto, incluem mudanças tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Apesar de muitos tipos diferentes de células T estarem envolvidos no processo, as células T regulatórias (Treg) e T auxiliares (Th) 17 parecem desempenhar o papel patogênico mais importante (Indriolo *et al.*, 2011).

Na periodontite, uma alteração no equilíbrio entre respostas Th1 e Th2, e a ativação da Th17, modulam a expressão da doença, levando à inflamação e induzindo perda óssea (Preshaw & Taylor, 2011). A resposta Th1 desencadeia predominantemente uma resposta imune celular através principalmente da secreção de interleucina (IL-2), IL-12 e IFN- $\gamma$  e a resposta Th2 é considerada uma resposta imune humoral onde ocorre principalmente a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-31 (Gaffen & Hajishengallis, 2008). Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, demonstramos que os níveis da citocina IL-4 estavam significativamente mais baixos no fluido gengival dos sítios com periodontite nos pacientes com DII. Os indivíduos com RCUI possuíam níveis significativamente mais altos de IL-6 nos sítios com periodontite quando comparados com os do grupo controle. No entanto, nosso estudo não demonstrou um padrão de resposta Th1 ou Th2 no fluido gengival destes pacientes (Figueredo *et al.*, 2011).

As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , sCD40L e TNF- $\alpha$  são relevantes na via da resposta imune Th17 (Geng *et al.*, 2000), e desempenham um papel importante na doença periodontal (Gaffen & Hajishengallis, 2008; Cheng *et al.*, 2014) e na DII (Andoh *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2014). A maioria destas citocinas encontra-se aumentada em pacientes com DII em atividade (Jiang *et al.*, 2014) e estudos da relação

da periodontite com a resposta Th17 vêm sendo realizados (Gaffen & Hajishengallis, 2008; Cheng *et al.*, 2014) de forma a melhor entender a patogênese dessa doença. A resposta Th17 estimula a produção das citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que podem induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (Gálvez, 2014). A IL-17A é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias dentro da rede de citocinas criada tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Tanto a IL-17A como a IL-17-F agem como uma ponte entre a resposta imune imediata e tardia (Isailovic *et al.*, 2015). IL-17A e IL-17F funcionam como potentes estimuladoras da produção de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (Yucel-Lindberg & Båge, 2013) sugerindo uma amplificação da maturação de células Th17. Um dos mais importantes papéis da IL-17A\F é o aumento da resposta inflamatória induzida por TNF- $\alpha$  (Andoh *et al.*, 2008). A IL-17A se encontra aumentada na mucosa de indivíduos com periodontite (Souto *et al.*, 2014). A completa diferenciação de Th17 é dependente da IL-23, uma citocina pró-inflamatória da família da IL-12 que pode induzir a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa Beta (RANKL) em células TCD4+ e promover a osteoclastogênese. Uma ação conjunta desta citocina com a IL-17 está relacionada a perda óssea na periodontite além de estimular a expressão de IL-17 (Ohyama *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

A avaliação das lesões periodontais e intestinais em um mesmo paciente portador de periodontite e DII poderia nos ajudar a entender o papel da resposta Th17, e uma possível influência da IL-23, na coexistência destas doenças. Por esse motivo, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão das citocinas: IL-1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e do ligante solúvel do CD40 (sCD40L) no tecido gengival e compará-la com a expressão na mucosa intestinal, de forma pareada, em pacientes com periodontite e DII.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Caracterização da amostra

Foram considerados como critérios de inclusão para os grupos DC e RCUI: pertencer ao ambulatório de DII do Hospital universitário Pedro Ernesto (HUPE) e possuir, periodontite crônica localizada (Lindhe *et al.*, 2010) (menos de 30% dos sítios afetados) ou generalizada (mais de 30% dos sítios afetados) com perda de inserção no mínimo moderada (3-4 mm). Foram considerados como critérios de exclusão: gravidez, amamentação, tratamento periodontal prévio e uso de antibióticos há menos de seis meses da realização da coleta da biópsia gengival e ou intestinal. Os pacientes

assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de serem examinados.

Vinte e sete pacientes foram selecionados, destes, cinco foram excluídos pois, por estarem na fase de atividade da DII e sem medicação, estavam impossibilitados de comparecer à consulta odontológica. Vinte e dois pacientes com DII (18 mulheres e 4 homens) média de idade de  $40,0 \pm 14,5$  anos foram incluídos no estudo. Dez eram do grupo de DC e doze do grupo de RCUI. Foram coletados 22 espécimes intestinais e 22 gengivais. Os pacientes foram atendidos na clínica de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE da UERJ (CEP/HUPE-CAAE: 36883514.6.0000.5259).

Os pacientes do grupo DC utilizavam como medicação: Mesalazina (n=2), Mesalazina + Azatioprina (n=4), Mesalazina + Azatioprina + inibidor de TNF- $\alpha$  (n=4). Os pacientes do grupo RCUI utilizavam como medicação: Mesalazina (n=5), Mesalazina + Azatioprina (n=4), Corticóide + Mesalazina (n=2) e um paciente não estava fazendo uso de nenhuma medicação.

## COLETA DE DADOS

### Calibragem examinadores

Os exames foram realizados por duas periodontistas (APMMC e JSBM). Para a calibragem interexaminadores foram avaliados 390 sítios em três pacientes diferentes com periodontite crônica. A calibragem intraexaminador foi realizada em 402 sítios de 3 pacientes. O nível de concordância interexaminador foi de 85% e intraexaminador de 95%, aceitando-se um 1 mm para mais ou para menos.

### Medidas clínicas

O exame clínico compreendeu: anamnese, com história médica e odontológica, e exame clínico periodontal, que foi realizado com uma sonda manual milimetrada do tipo Carolina do Norte (15 mm), da marca Hu-Friedy®, em seis sítios sendo avaliados os seguintes parâmetros:

**a)** Índice de placa visível (IPV): padrão binomial da presença ou não de placa bacteriana visível, após secagem das superfícies dentárias com jato de ar, em 4 sítios por dente (superfícies vestibular, mesial, distal e lingual), apresentado em percentual; (Ainamo & Bay, 1975).

**b)** Sangramento gengival a sondagem (SS): presença ou ausência de sangramento após realizar a sondagem com sonda periodontal milimetrada no sulco gengival, percorrendo o espaço do sulco de uma proximal a outra, em todas as faces de todos os dentes. Este índice foi mensurado considerando

os mesmos 4 sítios por dente descritos para o índice de placa visível, apresentado em percentual; (Ainamo & Bay, 1975).

**c)** Profundidade de bolsa à sondagem (PB): distância compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco ou bolsa periodontal, medida em milímetros, em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual); considerando-se PB leve para bolsas  $< 3$  mm; moderada para  $PB \geq 4$  e  $\leq 6$  mm; severa para  $PB \geq 7$  mm.

**d)** Nível de inserção (NI): distância compreendida entre a junção cimento-esmalte e o fundo do sulco ou bolsa periodontal, medida em milímetros, em 6 sítios por dente (mesmos sítios descritos para profundidade de sondagem); considerando-se a severidade da doença periodontal: leve para  $NI \leq 1$  mm; moderado para  $NI \geq 2$  mm e  $\leq 4$  mm severo para  $NI \geq 5$  mm.

## COLETA E PREPARO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS E GENGIVAIS

### Coleta das biópsias

As biópsias gengivais foram coletadas de sítios com sangramento à sondagem que foram previamente selecionados no momento do exame clínico periodontal. Após a área ser anestesiada, a biópsia foi coletada com um *punch* de 1.5 mm posicionado na direção do fundo da bolsa periodontal ( $PB \geq 4$  mm e  $NIC \geq 3$  mm). A mediana (intervalo interquartil) das áreas coletadas para PB foi de 5 mm (2,00 mm) e para o NI foi de 3 mm (2,25 mm). As etapas da coleta da biópsia gengival estão demonstradas na Figura 1 (Belier *et al.*, 2015).



Legenda: A – Incisão com punch de 1.5 mm; B – Tecido gengival biopsiado  
Fonte: Belier (Belier *et al.* 2015)

As amostras intestinais foram coletadas de pacientes com DII, por médicos do HUPE no momento dos exames de colonoscopias. A atividade da DII foi avaliada clinicamente e laboratorialmente pelos médicos do HUPE empregando-se o índice de atividade da doença de Crohn (Best, 1976) e Truelove e Witts (Truelove & Witts, 1955) para a RCUI. As áreas de coleta

da biópsia intestinal estão exemplificadas na Figura 2. Após a coleta, os tecidos gengivais e intestinais foram congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento que as amostras foram preparadas.

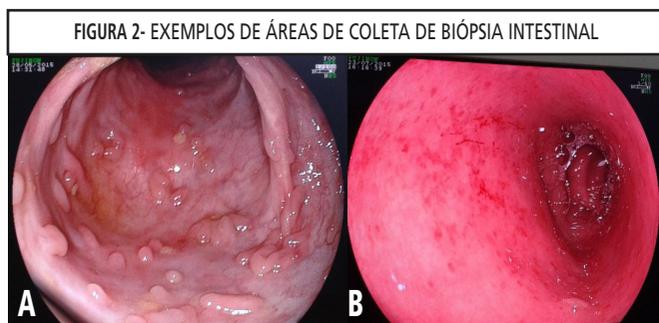


FIGURA 2- EXEMPLOS DE ÁREAS DE COLETA DE BIÓPSIA INTESTINAL  
 Legenda: **A-** Cólon com pólipos (DC que já esteve em intensa atividade); **B-** Reto em atividade (RCUI).

### Preparo das biópsias

O material, após ser descongelado, foi pesado em balança analítica (Ohaus, Parisppany, EUA) e, então, transferido para um tubo contendo 7 microesferas de zircônio ultrapuras de 3,0 mm (beads), 100  $\mu\text{l}$  de solução salina tamponada (PBS, Sigma-Aldrich, St-Louis, EUA) e 100  $\mu\text{l}$  de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St-Louis, EUA), no qual foi realizada a homogeneização tecidual pelo disruptor de células por beads - L-Beader 3 (Loccus biotecnologia, Cotia, Brasil) em 6 ciclos de 30 seg, com intervalos de 20 seg no gelo, com velocidade de 4000 rotações por minuto (rpm) (7,5 m/s).

Após a maceração, foi adicionado ao tubo mais 100  $\mu\text{l}$  de solução salina tamponada e, então, o material homogeneizado foi retirado do tubo com uma pipeta, colocado em um eppendorfe foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. Depois disso, o sobrenadante foi coletado e imediatamente congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A análise das biópsias foi realizada no laboratório de periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

### Análise das citocinas pelo método multiensaio multiplex

Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e do ligante solúvel do CD40 (sCD40L) foram determinados utilizando um imunoensaio com microesferas do tipo multiplex. Cinquenta microlitros das amostras da solução homogeneizada foram analisadas usando um kit disponível comercialmente (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA) em um analisador multiplex (Bio-plex 200®, Bio-RadLaboratories, Hercules, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Uma placa com 96-poços foi utilizada. Microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os alvos

analisados foram adicionadas aos poços. Amostras e padrões foram pipetados nos poços e incubados sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados e aspirados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada às microesferas e incubadas por 30 minutos. As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager Software (Bio-RadLaboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas analisadas foram expressos em quantidade total e depois compensados pelo peso da biópsia (pg/mg).

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 20.0 (IBM, Chicago, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Esse teste demonstrou a não-normalidade dos dados, exceto para a idade. Optou-se então pelo uso de testes não paramétricos sendo as variáveis contínuas apresentadas como mediana e intervalo interquartil e as categóricas como porcentagem. As comparações entre os grupos de pacientes foram realizadas usando o Teste U de Mann-Whitney. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar os níveis das citocinas em cada tecido no mesmo paciente. A significância foi determinada em 5% ( $p \leq 0,05$ ). A correlação entre as citocinas foi realizada com o Teste de Correlação de Spearman. Somente foram consideradas as correlações moderadas e fortes ( $r \geq 0,5$  e  $p \leq 0,01$ ) para a análise dos dados.

## RESULTADOS

### Dados demográficos e clínicos periodontais

A média de idade dos pacientes com DC e RCUI foi, respectivamente, 33,2 ( $\pm 12,5$ ) e 45,8 ( $\pm 14,0$ ) anos, sendo a diferença significativa ( $p=0,036$ ). Quando analisamos os dois grupos juntos, a média da idade foi de 40,0 ( $\pm 14,5$ ) anos. O grupo de DC era composto por 8 mulheres e 2 homens e o grupo de RCUI por 10 mulheres e 2 homens. Só existia um fumante no grupo de RCUI e nenhum no de DC, o fumante foi mantido nas análises pois não houve alteração significativa dos resultados com a sua remoção. Quatro pacientes no grupo de RCUI e quatro no de DC estavam em atividade da DII. Os pacientes possuíam no mínimo 9 dentes. Os dados demográficos e os parâmetros clínicos periodontais de ambos os grupos estão demonstrados na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros clínicos periodontais avaliados ( $p>0,05$ ).

**TABELA1 - DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS PERIODONTAIS EXPRESSOS EM MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DOS PACIENTES COM DOENÇA DE CHRON (DC) E RETOCOLITE ULKERATIVA INESPECÍFICA (RCUI). PARÂMETROS PERIODONTAIS EXPRESSOS EM PORCENTAGEM (%): PROFUNDIDADE DE BOLSA À SONDAÇÃO (PB); NÍVEL DE INSERÇÃO (NI); ÍNDICE DE PLACA VISÍVEL (IPV); ÍNDICE DE SANGRAMENTO A SONDAÇÃO (SS)**

		DC n= 10	RCUI n= 12	Valor p
Gênero	Masculino	20%	17%	–
	Feminino	80%	83%	–
Raça	Branco	50%	42%	–
	Não-brancos	50%	58%	–
Fumo	Fumantes	0	1	–
	Não-fumantes	10	11	–
Idade		33,2 ± 12,5*	45,8 ± 14,0*	<b>0,036</b>
PB %	≤3 mm	86,5 (19,0)	82,5 (15,0)	0,667
	4-6mm	13,5 (18,3)	17,5 (14,0)	0,741
	≥ 7mm	0,0 (0,3)	0,0 (1,0)	0,298
NI %	≤ 1 mm	82,5 (25,8)	72,0 (58,8)	0,147
	2-4 mm	16,5 (24,5)	24,0 (21,5)	0,176
	≥5 mm	0,0 (1,3)	4,5 (26,8)	0,160
IPV %		23,5 (32,0)	49,0 (24,5)	0,166
SS %		30,0 (35,0)	37,5 (23,5)	0,531

Nota: \*Idade expressa em média e desvio padrão.  
 Comparação usando o Teste U de Mann-Whitney.

### Dados imunológicos

Os níveis de IL-23 e IFN- $\gamma$  foram significativamente mais altos no tecido gengival e uma tendência para a IL-17A foi observada, quando comparamos com a mucosa intestinal de pacientes com DII. Ao contrário, as citocinas IL-31 e TNF- $\alpha$  estavam significativamente mais baixas no tecido gengival do que no intestinal e uma tendência foi encontrada para IL-17F e IL-25 (Tabela 2).

Quando os pacientes foram divididos em pacientes com DC e RCUI, não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de citocinas nos pacientes com DC mas pode ser observada uma tendência para as citocinas IL-23 e IFN- $\gamma$  no tecido gengival destes pacientes (Tabela 3). Nos pacientes

com RCUI, os níveis de IL-17F e TNF- $\alpha$  foram significativamente mais baixos no tecido gengival do que na mucosa intestinal e uma tendência para a IL-31 e a IL-33 também foi notada. Houve uma tendência para níveis mais altos no tecido gengival das citocinas IL-23 e IFN- $\gamma$  nesses pacientes (Tabela 4).

Os dados da Tabela 5 mostram os grupos separados por atividade e remissão na doença inflamatória intestinal. Avaliando apenas as amostras intestinais, níveis significativamente mais altos foram observados nos pacientes em atividade do que nos que estavam em remissão para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-31, IL-33 e sCD40L. E houve uma tendência para níveis significativamente mais altos para a TNF- $\alpha$  nos pacientes em atividade.

TABELA 2- MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS E GENGIVAS DE PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL E PERIODONTITE.

	<b>Intestino n=22</b>	<b>Gengiva n=22</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	12,1 (56,2)	2,65 (9,0)	0,114
IL-4	1,0 (1,88)	0,8 (1,5)	0,632
IL-6	2,1 (12,2)	1,4 (4,3)	0,267
IL-10	1,8 (3,7)	2,0 (4,2)	0,968
IL-17A	3,5 (7,5)	10,1 (6,6)	0,062
IL-17F	0,6 (3,4)	0,0 (0,0)	0,060
IL-21	3,6 (11,1)	6,5 (14,4)	0,370
IL-22	2,0 (3,6)	3,5 (5,2)	0,592
IL-23	0,0 (1,4)	8,1 (16,5)	<b>0,022</b>
IL-25	0,2 (0,7)	0,0 (0,0)	0,073
IL-31	2,9 (7,1)	0,0 (2,1)	<b>0,024</b>
IL-33	139,9 (609,9)	199,1 (192,9)	0,445
IFN- $\gamma$	3,5 (6,9)	12,1 (13,7)	<b>0,014</b>
sCD40L	2,9 (9,4)	3,0 (7,5)	0,808
TNF- $\alpha$	1,9 (2,7)	0,4 (0,7)	<b>0,012</b>

Nota: Comparação usando o Teste de Wilcoxon

TABELA 3- MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS E GENGIVAS DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN E PERIODONTITE.

	<b>Intestino n=10</b>	<b>Gengiva n=10</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	5,3 (39,32)	2,7 (8,1)	0,155
IL-4	1,0 (1,9)	1,0 (1,6)	0,635
IL-6	2,0 (4,8)	1,8 (3,9)	0,889
IL-10	1,2 (3,7)	2,6 (3,8)	0,646
IL-17A	2,4 (8,8)	8,8 (9,5)	0,285
IL-17F	0,0 (3,3)	0,0 (0,0)	0,500
IL-21	3,2 (14,6)	6,8 (11,9)	0,575
IL-22	1,6 (6,4)	4,5 (3,8)	0,445
IL-23	0,0 (6,4)	12,5 (15,9)	0,093
IL-25	0,1 (0,7)	0,0 (0,2)	0,248
IL-31	3,5 (14,8)	0,0 (2,1)	0,173
IL-33	118,4 (257,4)	285,1 (382,7)	0,508
IFN- $\gamma$	2,8 (7,0)	13,5 (11,3)	0,074
sCD40L	2,5 (5,6)	3,3 (6,0)	0,635
TNF- $\alpha$	1,7 (2,6)	0,4 (0,9)	0,103

Nota: Comparação usando o Teste de Wilcoxon.

TABELA 4- MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS E GENGIVAS DE PACIENTES COM RETOCOLOITE ULCERATIVA INESPECÍFICA E PERIODONTITE.

	<b>Intestino n=12</b>	<b>Gengiva n=12</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	17,3 (62,4)	2,9 (9,3)	0,327
IL-4	0,9 (2,0)	0,4 (1,5)	0,214
IL-6	2,1 (30,8)	1,2 (5,2)	0,114
IL-10	2,2 (3,6)	0,6 (4,5)	0,594
IL-17A	4,8 (7,0)	11,5 (6,5)	0,117
IL-17F	1,9 (3,5)	0,0 (0,0)	<b>0,043</b>
IL-21	4,0 (8,8)	4,4 (17,0)	0,333
IL-22	2,4 (2,5)	2,4 (6,3)	0,969
IL-23	0,0 (0,0)	0,0 (7,7)	0,068
IL-25	0,3 (0,7)	0,0 (0,0)	0,123
IL-31	2,9 (5,8)	0,0 (2,0)	0,086
IL-33	396,2 (1208,2)	171,3 (121,2)	0,084
IFN- $\gamma$	3,6 (14,8)	8,3 (14,4)	0,060
sCD40L	3,0 (12,6)	1,4 (12,0)	0,814
TNF- $\alpha$	2,1 (10,7)	0,4 (0,5)	<b>0,045</b>

Nota: Comparação usando o Teste de Wilcoxon

 TABELA 5- MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS, COMPARANDO ATIVIDADE E REMISSÃO NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL.

	<b>Atividade n=8</b>	<b>Remissão n=14</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	62,0 (93,7)	4,4 (12,7)	<b>0,002</b>
IL-4	1,6 (2,2)	0,2 (1,4)	<b>0,024</b>
IL-6	8,3 (29,2)	0,8 (3,9)	<b>0,016</b>
IL-10	2,5 (2,7)	1,3 (3,5)	0,365
IL-17A	10,3 (24,3)	3,0 (2,6)	<b>0,035</b>
IL-17F	3,0 (5,0)	0,0 (1,7)	<b>0,024</b>
IL-21	7,6 (15,1)	2,1 (6,3)	<b>0,016</b>
IL-22	2,0 (6,6)	2,1 (2,7)	0,973
IL-23	0,0 (3,2)	0,0 (1,4)	0,973
IL-25	0,3 (0,6)	0,0 (0,5)	0,188
IL-31	5,2 (10,2)	2,2 (5,5)	<b>0,042</b>
IL-33	561,9 (1381,0)	98,6 (295,2)	0,042
IFN- $\gamma$	4,2 (14,6)	2,1 (7,2)	0,212
sCD40L	7,5 (13,4)	0,5 (3,0)	<b>0,020</b>
TNF- $\alpha$	3,2 (2,1)	1,3 (2,3)	0,095

Nota: Comparação usando o Teste U de Mann-Whitney.

TABELA 6 - MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS, COMPARANDO ATIVIDADE E REMISSÃO NA DOENÇA DE CHRON.

	<b>Atividade n=4</b>	<b>Remissão n=6</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	61,8 (105,1)	2,8 (6,9)	<b>0,019</b>
IL-4	1,5 (2,0)	0,0 (1,2)	0,067
IL-6	4,1 (11,4)	0,3 (3,9)	0,114
IL-10	2,3 (3,6)	1,2 (4,0)	0,914
IL-17 <sup>a</sup>	12,5 (26,0)	2,4 (2,2)	0,762
IL-17F	1,8 (5,9)	0,0 (1,6)	0,171
IL-21	11,3 (13,7)	0,7 (13,6)	0,114
IL-22	1,4 (6,6)	1,6 (7,5)	0,762
IL-23	2,2 (29,2)	0,0 (5,0)	0,610
IL-25	0,4 (0,8)	0,0 (1,1)	0,476
IL-31	4,3 (10,4)	1,8 (16,5)	0,476
IL-33	392,5 (1415,4)	98,6 (112,3)	0,114
IFN- $\gamma$	4,6 (35,8)	2,1 (7,5)	0,476
sCD40L	3,7 (13,7)	1,1 (4,5)	0,352
TNF- $\alpha$	2,6 (1,8)	0,7 (1,8)	0,171

Nota: Comparação usando o Teste U de Mann-Whitney.

TABELA 7 - MEDIANA (INTERVALO INTERQUARTIL) DAS QUANTIDADES TOTAIS DE IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , SCD40L E TNF- $\alpha$  EM PICOGRAMAS NAS BIÓPSIAS DE MUCOSAS INTESTINAIS, COMPARANDO ATIVIDADE E REMISSÃO NA RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA.

	<b>Atividade n=4</b>	<b>Remissão n=8</b>	<b>Valor p</b>
IL1- $\beta$	62,0 ( 290,0)	10,5 (38,0)	<b>0,048</b>
IL-4	1,9 (4,3)	0,5 (1,7)	0,214
IL-6	23,7 (45,0)	1,1 (12,3)	0,154
IL-10	2,5 (27,8)	1,8 (4,0)	0,368
IL-17A	10,3 (23,2)	3,3 (3,2)	<b>0,016</b>
IL-17F	3,5 (9,5)	0,0 (2,6)	<b>0,048</b>
IL-21	4,7 (16,4)	2,9 (9,4)	0,214
IL-22	3,3 (11,0)	2,4 (1,5)	0,683
IL-23	0,0 (0,0)	0,0 (0,83)	0,570
IL-25	0,3 (1,5)	0,1 (0,7)	0,283
IL-31	6,1 (15,2)	2,2 (3,5)	0,073
IL-33	979,6 (1298,0)	121,5 (749,0)	0,214
IFN- $\gamma$	4,2 (14,2)	2,7 (15,2)	0,368
sCD40L	12,0 (28,1)	0,5 (3,0)	<b>0,028</b>
TNF- $\alpha$	3,5 (15,0)	2,0 (10,7)	0,368

Nota: Comparação usando o Teste U de Mann-Whitney.

Ao analisarmos separadamente cada doença dividindo ainda por atividade ou não da mesma, vemos que na DC houve diferença estatisticamente significativa somente para a IL-1 $\beta$  e uma tendência pôde ser observada para a IL-4 (Tabela 6).

Na RCUI houve diferença estatisticamente significativa nos pacientes em atividade para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-17F e sCD40L. Uma tendência pôde ser observada para a IL-31 como demonstrado na Tabela 7.

Separando, na doença de Crohn, os pacientes entre os que faziam uso (n=4) ou não (n=6) de drogas anti-TNF- $\alpha$ , e analisando a quantidade de citocinas no tecido gengival e no intestinal dos pacientes não encontramos diferenças significantes entre os grupos ( $p>0,05$ ).

### Correlação entre as citocinas

Na Tabela 8 estão expressas correlações significantes moderadas ( $r \geq 0,5$  e  $p \leq 0,01$ ) encontradas entre as citocinas nos tecidos gengivais e intestinais dos pacientes com DII.

Quando analisamos separadamente cada doença, encontramos, na DC, correlação forte significativa negativa entre IL-10 gengival e TNF- $\alpha$  intestinal ( $r=0,8$ ,  $p=0,006$ ) e entre IL-23 na gengiva e IFN- $\gamma$  no intestino ( $r=0,8$ ,  $p=0,01$ ). Encontramos, na RCUI, correlações significantes moderadas e fortes negativas entre a IL-23 no tecido gengival com as seguintes citocinas na mucosa intestinal: IL-1 $\beta$  ( $r=-0,7$ ,  $p=0,01$ ), IL-10 ( $r=-0,8$ ,  $p=0,002$ ), IL-31 ( $r=-0,7$ ,  $p=0,006$ ) e moderada positiva entre a IL-23 gengival e IL-23 intestinal ( $r=0,7$ ,  $p=0,01$ ).

TABELA 8- CORRELAÇÕES ENTRE CITOCINAS NA MUCOSA INTESTINAL (MI) E GENGIVAL (G) NOS PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII) E PERIODONTITE.

DII (n=22)		IL-1 $\beta$ (MI)	IL-10(MI)	IL-17A(MI)	IL-23(MI)	IFN- $\gamma$ (MI)
IL-6 (G)	r	-	-	-	0,6	-
	p	-	-	-	0,002	-
IL-17A (G)	r	-	-	-	-	-0,5
	p	-	-	-	-	0,01
IL-23 (G)	r	-0,5	-0,5	-0,6	-	-0,5
	p	0,01	0,01	0,004	-	0,01

Nota: Correlação usando o Teste de Correlação de Spearman

### DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que na DII o nível de IL-23 e de IFN- $\gamma$  foram significantemente mais altos no tecido gengival do que no intestinal. Além disso, notamos também uma tendência da IL-17A ser mais elevada no tecido gengival dos pacientes com DII. Ao nosso conhecimento, o nosso trabalho é o primeiro a ser realizado avaliando a expressão de citocinas na mucosa intestinal e gengival coletados de forma pareada de pacientes com DII e periodontite tornando difícil a comparação com outros trabalhos. Lester e colaboradores (Lester et al., 2007) encontraram um aumento significativo da IL-23, IFN- $\gamma$  e IL-17 no tecido gengival de sítios com perda de inserção moderada e severa, quando compararam com sítios saudáveis e uma correlação entre IL-23 e IL-17. Esse trabalho foi realizado com a papila interdental adjacente a elementos dentários extraídos analisadas por imunohistoquímica, o que difere da técnica utilizada pelo nosso grupo de biópsias minimamente invasivas com análise multiensaio multiplex. E

um outro trabalho usando a técnica de imunohistoquímica (Cardoso *et al.*, 2009) também relatou níveis mais elevados de IL-23 e IL-17A no tecido gengival de pacientes com periodontite quando comparado a dentes saudáveis. Luo e colaboradores (Luo *et al.*, 2014) encontraram IL-17A e IL-17F aumentadas no sangue de pacientes com periodontite quando comparados a indivíduos saudáveis e esses níveis só eram maiores quando ocorria a estimulação por IL-23. A IL-23 é uma citocina fortemente relacionada a osteoclastogênese (Ohyama *et al.*, 2009; Kang & Zhang, 2014; Angelica & Fong, 2015) e uma ação conjunta desta citocina com a IL-17 está relacionada a perda óssea na periodontite, além desta estimular a expressão de IL-17 (Liu *et al.*, 2010). Isto pode indicar que a IL-23 aumentada no tecido gengival pode estar relacionada a perda óssea periodontal dos pacientes com DII.

Níveis significantemente mais baixos para IL-31 e TNF- $\alpha$  e uma tendência para níveis mais baixos para IL-17F e IL-25 foram observados no tecido gengival quando comparados com a mucosa intestinal. Estes achados vêm de encontro ao

trabalho prévio do nosso grupo, onde não houve expressão de citocinas maior na mucosa intestinal (Menegat, 2015). Esta diferença pode ter ocorrido devido ao fato de termos analisado apenas amostras pareadas, uma vez que no nosso estudo, ambos os tecidos estão sob as mesmas condições de estímulos quando coletados. Nossos achados estão de acordo com os de Andoh e colaboradores (Andoh *et al.*, 2008) que observaram que a ambas as citocinas estão relacionadas a secreção de mediadores inflamatórios na DII e cooperam na patofisiologia da doença. Nossos resultados também mostraram que a IL-17-F e IL-31 estavam significativamente aumentadas nas biópsias intestinais de pacientes com DII em atividade indicando uma importância destas citocinas na atividade e severidade da doença.

Observamos que a IL-23 intestinal apresenta correlação significativamente positiva com a IL-6 gengival nos pacientes com DII e periodontite. Na mucosa intestinal, a IL-23 é essencial para a manifestação da inflamação crônica e induz a liberação de IL-6 e IL-17 (Yen *et al.*, 2006). Nosso achado pode implicar a ação de uma resposta imunológica de bases similares coexistindo no mesmo indivíduo em sítios doentes diferentes. Um estudo do nosso grupo demonstrou que os níveis de IL-6 estavam significativamente mais altos no fluido de sítios com periodontite em indivíduos com RCUI e periodontite quando comparados com os do grupo controle (Figueredo *et al.*, 2011). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que estimula a atividade osteoclastogênica e a reabsorção óssea. Sua ação está inter-relacionada com a IL-1 e TNF- $\alpha$  (Steeve *et al.*, 2004). Portanto, esse aumento no tecido gengival de IL-6 pode ser devido a importante ação desta citocina na osteoclastogênese.

Quando avaliamos os níveis de citocinas na mucosa intestinal comparando atividade ou remissão da doença, das quinze citocinas avaliadas, nove apresentaram resultado significativamente mais altos na atividade do que na remissão (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-31, IL-33 e sCD40L) e uma tendência pode ser observada para a TNF- $\alpha$ . Isto pode demonstrar que a caracterização de atividade clínica da DII condiz com aumento da produção destas citocinas pelo sistema imune, este achado está em conformidade com o estudo de Jiang e colaboradores (Jiang *et al.*, 2014) que mostraram que a IL-17 e a IL-21 estavam significativamente mais altas em pacientes com DII em atividade e o estudo de Nunes e colaboradores (Nunes *et al.*, 2014) que mostrou a IL-33 aumentada em pacientes com DII em atividade. Enquanto na DII a caracterização de atividade e remissão é bem definida (Truelove & Witts, 1955; Best, 1976) não temos ainda um padrão na periodontite que caracterize quando a doença está em atividade ou não. Diversos trabalhos tentaram

encontrar um bom marcador de atividade da periodontite (Subrahmanyam & Sangeetha, 2003; Ito *et al.*, 2014) e esse assunto foi recentemente abordado na revisão feita por Jadicke, Presahw e Taylor (Jadicke *et al.*, 2016) na qual os autores fazem um compêndio dos estudos sobre citocinas salivares como biomarcadores de doenças periodontais e concluíram que, na saliva, apenas a IL-1 pode ser considerada como citocina com mais evidência de biomarcador para doença periodontal. Este seria um dos motivos para que continuássemos a estudar melhor a relação entre as duas doenças de forma a melhorar nosso entendimento da periodontite através do estudo da DII de forma a conseguir identificar também na periodontite os períodos de atividade e remissão da mesma.

Nosso estudo apresentou algumas limitações como ser um estudo transversal com um tamanho amostral pequeno dificultando assim a extrapolação dos resultados. Um aumento do tamanho amostral seria necessário para que conseguíssemos também subdividir os grupos de acordo com a medicação usada, que é um outro limitador do estudo pois, devido a doença de base dos pacientes, os mesmo fazem uso de diversas medicações além de, durante o tratamento, ocorrerem constantemente mudanças nas medicações e nas posologias. No nosso estudo também não tivemos um grupo controle de forma a poder comparar os resultados com pacientes com periodontite que não apresentassem DII.

## CONCLUSÃO

Concluimos então que a IL-23 e IFN- $\gamma$  encontram-se significativamente aumentadas no tecido gengival, quando comparados à mucosa intestinal, sugerindo um papel importante destas citocinas na manifestação da periodontite em pacientes com DII.

## ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study was to analyze the levels of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and sCD40L in the gingival tissue (G), and compare to the levels of the paired intestinal mucosa (MI) in patients having both chronic periodontitis and Inflammatory Bowel Disease (IBD).

**Material and methods:** Twenty-two IBD patients with chronic periodontitis and IBD, mean age 40.0 ( $\pm$  14.5), were enrolled in the study. Patients were assessed using anamnesis and periodontal examination. Gingival and intestinal biopsies were collected and homogenized using a cell disruptor. Cytokine's expression was evaluated through multiplex

technology and then compensated by weight.

**Results:** After statistical analysis, significant higher levels of gingival IL-23 ( $p=0.02$ ) and IFN- $\gamma$  ( $p=0.01$ ), and significant lower levels of IL-31 ( $p=0.02$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p=0.01$ ) were found when compared to intestinal mucosa. Significant positive correlation between gingival and intestinal tissue were observed between IL-6 (G) and IL-23 (M) and significant negative correlation between IL-23 (G) and IL-1 $\beta$  (MI), IL-10 (MI), IL-17A (MI) and IFN- $\gamma$  (MI).

**Conclusion:** We conclude that IL-23 and IFN- $\gamma$  are significantly increased in the gingival tissue, when compared to the intestinal tissue, suggesting an important role of these cytokines in the manifestation of periodontitis in patients with IBD.

**UNITERMS:** Periodontitis. Inflammatory bowel disease. Cytokines. Th 17. IL-23.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kinane DF, Mark Bartold P. Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2007;43(1):278–93.
- 2- Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis. Oral Complication of Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013;42(4):849–67.
- 3- Corbella S, Francetti L, Taschieri S, De Siena F, Fabbro M Del. Effect of periodontal treatment on glycemic control of patients with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Investig*. 2013;4(5):502–9.
- 4- Lira-Junior R, Figueredo CM, Bouskela E, Fischer RG. Severe chronic periodontitis is associated with endothelial and microvascular dysfunctions: a pilot study. *J Periodontol* [Internet]. 2014;85(12):1648–57. Available from: <http://0-www.joponline.org.custos.uandes.cl/doi/abs/10.1902/jop.2014.140189>
- 5- de Smit MJ, Westra J, Brouwer E, Janssen KMJ, Vissink A, van Winkelhoff AJ. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: What Do We Know? *J Periodontol* [Internet]. 2015;86(9):1013–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25968957>
- 6- Brito F, Almeida S, Figueredo CMS, Bregman R, Suassuna JHR, Fischer RG. Extent and severity of chronic periodontitis in chronic kidney disease patients. *J Periodontal Res*. 2012;47(4):426–30.
- 7- Brito F, Barros FC de, Zaltman C, Pugas Carvalho AT, de Vasconcellos Carneiro AJ, Fischer RG, et al. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2008;35(6):555–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-051X.2008.01231.x>
- 8- Figueredo CM, Brito F, Barros FC, Menegat JSB, Pedreira RR, Fischer RG, et al. Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011;46(1):141–6.
- 9- Grössner-Schreiber B, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: A case-control study. *J Clin Periodontol*. 2006;33(7):478–84.
- 10- Flemmig TF, Shanahan F, Miyasaki KT. Prevalence and severity of periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Periodontol*. 1991;18(9):690–7.
- 11- Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;12(April):205–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732745>
- 12- Indriolo A, Greco S, Ravelli P, Fagioli S. What can we learn about biofilm/host interactions from the study of inflammatory bowel disease. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2011;38 (Suppl):36–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323702>
- 13- Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* [Internet]. 2011;38 Suppl 1:60–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323705>
- 14- Gaffen SL, Hajishengallis GA. New Inflammatory cytokine on the Block: Re-thinking Periodontal Disease and the Th1/Th2 Paradigm in the context of Th17 cell and IL-17. *J Dent Res*. 2008;87(9):817–28.
- 15- Geng W, Ma L, Jin C, Kellermann G. Multiplex Analysis of Inflammatory Markers Using Bio-Plex Pro™ Human Th17 Cytokine Assays [Internet]. 2000 [cited 2016 Feb 12]. p. 2–3. Available from: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6251A.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6251A.pdf)
- 16- Cheng WC, Hughes FJ, Taams LS. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(6):541–9.
- 17- Andoh A, Yagi Y, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(33):5154–61.
- 18- Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* [Internet]. 2014;63(11):943–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129403>
- 19- Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm* [Internet]. 2014;2014(928461):1–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4005031&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 20- Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;60:1–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841115000591>
- 21- Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2013;15(August):e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23915822>
- 22- Souto GR, Queiroz-Junior CM, de Abreu MHNG, Costa FO, Mesquita RA. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 Cytokines and Dendritic Cells: A Cross-sectional Study in Chronic Periodontitis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(3):e91636. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091636>
- 23- Liu YCG, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: Protective and destructive roles. *Periodontol* 2000. 2010;52(347):163–206.
- 24- Ohshima H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*. 2009;88(7):633–8.
- 25- Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 1326 p.
- 26- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25(4):229–35.
- 27- Belier TFCSB, Fischer RG, Pires FR, Lomba KSB, Figueredo CMS. Expressão do interferon-  $\gamma$  em biópsias gengivais de pacientes com periodontite crônica severa. *Braz J Periodontol*. 2015;25(2):13–21.
- 28- Best WR. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology*. 1976;70(3):439–44.
- 29- Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955;2(4947):1041–8.
- 30- Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol* [Internet]. 2007;78(8):1545–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668974>
- 31- Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Junior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(1):1–6.
- 32- Luo Z, Wang H, Wu Y, Sun Z, Wu Y. Clinical Significance of IL-23 Regulating IL-17A and/or IL-17F Positive Th17 Cells in Chronic Periodontitis. *Mediators Inflamm* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/627959/>
- 33- Kang YK, Zhang MC. IL-23 promotes osteoclastogenesis in osteoblast-osteoclast co-culture system. *Genet Mol Res*. 2014;13(2):4673–9.
- 34- Angelica MD, Fong Y. Crosstalk among interleukin 23 and DNAX activating protein 12- dependent pathways promotes osteoclastogenesis. *J Immunol*. 2015;194(1):316–24.
- 35- Menegat JSB. Níveis elevados de citocinas relacionadas a resposta Th17 no tecido gengival em comparação a mucosa intestinal de pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal. Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2015.
- 36- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1310–6.
- 37- Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2004;15(1):49–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610103001011>
- 38- Nunes T, Bernardazzi C, De Souza HS. Interleukin-33 and inflammatory bowel diseases: Lessons from human studies. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–10.
- 39- Subrahmanyam M, Sangeetha M. Gingival crevicular fluid a marker of the periodontal disease activity. *Indian J Clin Biochem*. 2003;18(1):5–7.
- 40- Ito H, Numabe Y, Sekino S, Murakashi E, Iguchi H, Hashimoto S, et al. Evaluation of bleeding on probing and gingival crevicular fluid enzyme activity for detection of periodontally active sites during supportive periodontal therapy. *Odontology*. 2014;102(1):50–6.
- 41- Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):164–83.

Endereço para correspondência:

Carlos Marcelo Figueredo

Rio de Janeiro State University, Faculty of Odontology, Boulevard 28 de Setembro 157, 2o Andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ 20551-030, Brazil.

Phone: +55 21 28688282

E-mail address: [cmfigueredo@hotmail.com](mailto:cmfigueredo@hotmail.com)