



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA AKEMI IZUMI

QUAL A RESPOSTA DOS FIBROBLASTOS GENGIVAIS FRENTE AO DESAFIO
MICROBIANO DO BIOFILME DENTAL? UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

CURITIBA

2022

CAMILA AKEMI IZUMI

QUAL A RESPOSTA DOS FIBROBLASTOS GENGIVAIS FRENTE AO DESAFIO
MICROBIANO DO BIOFILME DENTAL? UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Odontologia,
nível Mestrado, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Clínica Odontológica - Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Geisla Mary Silva Soares

Coorientadora: Profa. Dra. Reila Taina Mendes

CURITIBA

2022

Izumi, Camila Akemi

Qual a resposta dos fibroblastos gengivais frente ao desafio microbiano do biofilme dental [recurso eletrônico]? Uma revisão sistemática / Camila Akemi Izumi – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Gelsia Mary Silva Soares
Coorientador: Profa. Dra. Reila Tainá Mendes

1. Periodontite. 2. Fibroblastos. 3. Biofilme. 4. Inflamação. I. Soares, Gelsia Mary Silva. II. Mendes, Reila Tainá. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.632

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECTOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA AKEMI IZUMI** intitulada: **Qual a resposta dos fibroblastos gengivais frente ao desafio microbiano do biofilme dental? Uma revisão sistemática**, sob orientação da Profa. Dra. **GEISLA MARY SILVA SOARES**, que após terem inquirido a autora e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

15/02/2022 16:23:22.0

GEISLA MARY SILVA SOARES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/02/2022 13:51:31.0

MARTA FERREIRA BASTOS

Avaliador Externo (33072019)

Assinatura Eletrônica

15/02/2022 16:36:13.0

JOÃO PAULO STEFFENS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

À minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, me inspirando a ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho, me proteger e me fortalecer nos momentos mais difíceis. Além de me permitir exercer minhas atividades de forma justa e ética.

À minha querida orientadora, Prof^ª Dr^ª Geisla Mary Silva Soares, por ter confiado em mim e me fornecido essa oportunidade de crescimento científico, profissional e pessoal. Obrigada pelo privilégio de poder ser sua orientada em um momento tão importante da minha vida pessoal e profissional. Obrigada por todo aprendizado, carinho, suporte e incentivo.

À minha querida co-orientadora, Prof^ª Dr^ª Reila Taina Mendes, pela dedicação, paciência, auxílio e conhecimento fornecido durante essa jornada. Obrigada pelo carinho, dentro e fora, do Programa de Pós-Graduação.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná, Prof^ª Dr^ª Juliana Schussel, e demais professores, pela dedicação, paciência e desempenho na contribuição do desenvolvimento científico de nós, alunos. Além dos demais professores da equipe de Periodontia, Prof. Dr. João Paulo Steffens e Prof. Dr. Humberto Schwartz-Filho, por sempre estarem dispostos a me ajudar e contribuir para meu conhecimento.

Ao meu estimado Prof. Dr. Bruno Marques da Silva, por sempre ter sido um espelho profissional para mim e ter me apoiado e ajudado a alcançar tal conquista.

À minha colega de Mestrado Letícia Ferreira, pelas risadas nos momentos bons e as lágrimas nos momentos ruins, mas principalmente pela amizade verdadeira que perdurará para sempre.

Ao meu colega doutorando, Eduardo Oliveira, por ter me ajudado desde o primeiro dia, me orientando e guiando. Por ter se tornado um grande amigo fora do programa. Me orgulho de ter sido sua mestranda e sua amiga. Obrigada pelos ensinamentos, científicos, acadêmicos e de vida. Te adoro.

Aos meus pais, Dioni Izumi e Kasutoshi Izumi, por terem me proporcionado condições e educação para me tornar a mulher e profissional que eu sou hoje. Pelo amor incondicional, pelo exemplo de força e ética, pela doação constante e por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã e melhor amiga, Gabriela Keiko Izumi, por me apoiar e incentivar a cultivar meus sonhos, sempre me puxando para a realidade. Por ter acreditado em mim, mesmo quando eu mesmo duvidava. Te amo incondicionalmente.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis os tornando mais leves, Amanda Santos, Janaína Castro, Carlos Botelho e Ricardo Nascimento. O colo e sorriso de vocês tem preço inestimável. Sou grata de poder chamá-los de amigos.

Let everything happen to you: beauty and terror.
Just keep going. No feeling is final.
(Rainer Maria Rilke)

RESUMO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória, crônica, multifatorial associada a um biofilme disbiótico. Clinicamente se caracteriza pela perda progressiva dos tecidos de proteção e sustentação do dente, que ocorre quando não tratada. Esta destruição periodontal é causada, principalmente, pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias e seus produtos. Os fibroblastos gengivais (FG) são o principal tipo celular do periodonto, principalmente nos tecidos conjuntivos. Entre suas funções se destacam a secreção de mediadores inflamatórios e sua ligação à manutenção, reparo e regeneração do tecido conjuntivo periodontal. No entanto, ainda faltam informações na literatura sobre a resposta celular dos FG frente ao biofilme dental disbiótico e como isso interfere na patogênese da periodontite. Dessa forma, uma revisão sistemática foi realizada com objetivo de responder à seguinte questão: qual a resposta dos fibroblastos gengivais frente ao desafio microbiano do biofilme dental? As bases de dados PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), EMBASE e Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO) via Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) foram consultadas. Não foram feitas restrições de ano ou idioma. Os descritores padronizados (*Medical Subject Headings*, MeSH) utilizados foram: "fibroblasts", "biofilm", "periodontitis" e "inflammatory response", com o uso do operador booleano "AND" para uma combinação de fibroblastos e periodontite com biofilme ou resposta inflamatória. A avaliação de risco de viés foi realizada por meio da ferramenta adaptada ROBINS-I. Como resultados um total de 1.074 títulos foram encontrados, dos quais 12 artigos foram incluídos nesta revisão sistemática. Destes, onze estudos foram considerados de baixo risco e 1, com risco moderado de viés. Em seis estudos o desafio microbiano foi realizado a partir de um biofilme *in vitro*, e nos demais, o desafio foi em pacientes com periodontite. Em todos os artigos a regulação de citocinas por fibroblastos gengivais (FG) foi considerada como influente na resposta inflamatória na doença periodontal, com aumento na expressão de Interleucina 6, COX-2, RANK/RANKL, CSF1 e IL-34, e redução nas expressões de IL-1 β quando desafiado por biofilmes patogênicos. Assim, apesar da heterogeneidade dos estudos avaliados, que não permitiu uma avaliação mais aprofundada do tema, observou-se que os fibroblastos gengivais reagem com um perfil predominantemente pró-inflamatório diante da exposição ao biofilme dental, podendo então atuar tanto para o início quanto para a progressão da periodontite.

Palavras-chave: Fibroblastos gengivais humanos; periodontite; biofilme; resposta inflamatória

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic, multifactorial, infectious inflammatory disease associated with a dysbiotic biofilm. Clinically, it is characterized by the progressive loss of protection's and support's tissues of the tooth, which occurs when untreated. This periodontal destruction is mainly caused by the response of the host's immune system to bacteria and their products. Gingival fibroblasts (GF) are the main cell type of the periodontium, mainly in connective tissues. Among its functions are the secretion of inflammatory mediators and their connection to the maintenance, repair and regeneration of periodontal connective tissue. However, there is still a lack of information in the literature on the cellular response of GF against dysbiotic dental biofilm and how this interferes with the pathogenesis of periodontitis. In this way, a systematic review was carried out in order to answer the following focused question: what is the response of gingival fibroblasts to the microbial challenge of dental biofilm? PubMed, Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS), EMBASE and Brazilian Bibliography of Dentistry (BBO) databases were searched by Virtual Health Library (BVS). No year or language restrictions were made. The standardized descriptors (Medical Subject Headings, MeSH) used were: "fibroblasts", "biofilm", "periodontitis", and "inflammatory response", with the use of the Boolean operators "AND" for a combination of fibroblasts and periodontitis with biofilm or inflammatory response. From a total of 1.074 titles found 12 articles were included. Bias risk assessment was performed for ROBINS-I adapted tool. 11 studies were considered to have low risk and 1, moderate risk of bias. Thus, six studies performed the biofilm challenge from the in vitro model. In all the articles included cytokine regulation by fibroblasts was found to influence the inflammatory response in periodontal disease, with an increase of IL-6, COX-2, RANK/RANKL, CSF1 and IL-34, and a reduction in IL-1 β expressions when challenged by pathogenic biofilms. Conclusion: Besides the heterogeneity of the studies evaluated, it was observed that gingival fibroblasts react with a predominantly pro-inflammatory profile when exposed to dental biofilm, and can therefore act both for the onset and for the progression of periodontitis.

Keywords: Human gingival fibroblasts; periodontitis; biofilm; inflammatory response

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – RESUMO DA ANÁLISE DE RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS DE ACORDO COM O FORMULÁRIO ADAPTADO DE ROBINS-1	28
FIGURA 2 – FLUXOGRAMA	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	16
TABELA 2: PRINCIPAIS RESULTADOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AMPs	- Peptídeos antimicrobianos
BBO	- Bibliografia Brasileira de Odontologia
BVS	- Biblioteca Virtual em Saúde
COX-2	- Ciclooxigenase 2
CSF-1	- Fator estimulador de colônias 1
FG	- Fibroblastos gengivais
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL-17	- Interleucina 17
IL-18	- Interleucina 18
IL-34	- Interleucina 34
JBI	- Instituto Joanna Briggs
LILACS	- Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
LPS	- Lipopolissacarídeo
MeSH	- Medical Subject Headings
MMP-8	- Metaloproteinase da matriz 8
NLRP1	- Receptor da família dos NLR contendo o domínio Pyrin 1
NLRP2	- Receptor da família dos NLR contendo o domínio Pyrin 2
NLRP3	- Receptor da família dos NLR contendo o domínio Pyrin 3
PGE2	- Prostaglandia E2
PS	- Profundidade de sondagem
qPCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RANK	- Recetor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	- Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B
OPG	- Osteoprotegerina
SS	- Sangramento a sondagem
TNF-alpha	- Fator de necrose tumoral alpha
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 CAPÍTULO: ARTIGO CIENTÍFICO	22
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
Formato e protocolo.....	25
População, intervenção, comparação, outcome/desfecho e tipo de estudo (picot).....	25
Foco da questão	26
Critérios de seleção.....	26
Estratégia de busca, seleção de estudos e extração de dados	26
Análise de viés.....	27
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
6 REFERÊNCIAS.....	23
APÊNDICE 1	32
APÊNDICE 2 –	38

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória, crônica, multifatorial associada a um biofilme disbiótico, com mudanças na diversidade e proporção de espécies bacterianas subgingivais (LAMONT et al., 2018). Se não controlada, a inflamação pode progredir e acometer os tecidos de sustentação, caracterizando-se pela destruição progressiva do aparato de inserção dental (CATON et al., 2018). Suas características clínicas incluem alteração da cor gengival, textura e volume, perda de inserção em dois ou mais locais interproximais não adjacentes, ou perda de inserção de 3 mm ou mais nas regiões vestibular ou lingual/palatina, em pelo menos dois dentes, sem causas associadas a trauma, mau posicionamento, entre outras, e é classificada de acordo com seu estágio e grau (CATON et al., 2018).

A destruição dos tecidos periodontais é causada, principalmente, pela resposta exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias e seus produtos (VAN DYKE, 2020). Após análise de milhares de amostras de biofilme dental provenientes de centenas de indivíduos as espécies bacterianas mais prevalentes tanto em saúde quanto em doença periodontal foram definidas e separadas no grupo dos *Actinomyces* e nos complexos verde, amarelo, roxo, laranja e vermelho, de acordo com a correlação entre espécies e com a associação delas com saúde ou doença periodontal (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002). O complexo vermelho - composto pelas espécies bacterianas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* - e o laranja, em que se destacam principalmente as *Fusobacterium ssp.*, são fortemente associados à doença, sendo o vermelho associado a maiores profundidades de sondagem (PS) e sangramento a sondagem (SS), enquanto o laranja, precede a colonização do complexo vermelho. Nos demais complexos foram agrupadas as espécies consideradas compatíveis com a saúde do hospedeiro. O complexo amarelo, formado em sua maioria por bactérias do gênero *Streptococcus sp.*, o complexo verde é formado por *Capnocytophaga sp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serótipo a*, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter concisus* e o complexo roxo formado pelas espécies bacterianas *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*.

A sucessão microbiana no biofilme dental se dá de forma que organismos pioneiros colonizam o ambiente e ocasionalmente são substituídos por outras espécies após terem alterado o habitat, e dessa forma, o tornando mais adequado para outras espécies mais patogênicas (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). A sucessão microbiana pode ser autogênica, onde as espécies são substituídas por espécies mais adequadas ao habitat modificado, ou alogênica, em que um tipo de comunidade é substituído por outro devido a mudanças no habitat por fatores

externos à microbiota. Assim, a colonização inicial dá origem ao biofilme supragengival, formado principalmente espécies dos complexos amarelo, verde e roxo, além de espécies de *Actinomyces*. A sucessão autogênica causará uma dominância pelas espécies do complexo laranja, inicialmente, e posteriormente do complexo vermelho. Essa sucessão microbiana causará mudanças no habitat, estimulará a resposta inflamatória e levará a manifestação clínica das doenças periodontais (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005; VAN DYKE, 2020).

Biofilmes supragengivais se desenvolvem na superfície do dente, acima da margem gengival livre. É um nicho primariamente aeróbico, com as bactérias expostas diretamente a cavidade oral. À medida que o biofilme supragengival persiste na superfície dentária ocorre um desafio celular contínuo que leva à inflamação marginal, conhecida como gengivite (KOLENBRANDER & LONDON, 1993; VAN DYKE, 2020; MARSH, 2006; MARSH & DEVINE, 2011).

O biofilme patogênico é caracterizado principalmente por bactérias como *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005; HAJISHENGALLIS & LAMONT, 2012), *Fretibacterium* sp., *TM7* sp. e *Filifactor alocis* (DEWHIRST et al., 2010; MARK WELCH et al., 2016; GRIFFEN et al., 2011; GRIFFEN et al., 2011). A homeostase comum em humanos é caracterizada por uma inflamação subclínica de baixo grau permanente, com modesta e seletiva expressão de citocina e quimiocina, guiando a infiltração dos neutrófilos no epitélio juncional e auxiliando no controle da invasão tecidual de bactérias do biofilme (VAN DYKE et al., 2020).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e a microbiota, uma reação inflamatória aumentada é estimulada (KAMADA et al., 2013; PLOTNIKOFF & RILEY, 2014; ZENG et al., 2017). Esse desequilíbrio pode ser favorecido por uma disbiose na microbiota, que induzirá o aumento da resposta imunológica e conseqüentemente à inflamação (DUTZAN et al., 2018). Mas, também, a inflamação aumentada pode preceder e favorecer a disbiose microbiana, onde espécies bacterianas patogênicas aumentam em contagens e proporções (VAN DYKE, 2020). A inflamação exacerbada pode levar à destruição dos tecidos (HAJISHENGALLIS & KOROSTOFF, 2017) e induzir a expressão dos genes de virulência de várias espécies de bactérias periodontais (VAN DYKE, 2020; VAN DYKE et al., 2020). Quando uma infecção está em curso, a resposta inata é desencadeada e os mecanismos imunes são ativados rapidamente, o que induz à liberação de proteinase, quimiocinas e citocinas, dentre as quais se destacam a Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral (TNF-alpha) e metaloproteinases (MMP) (ALBIGER et al., 2007).

A resposta imunológica alterada por condições sistêmicas, conseqüentemente, poderá afetar a progressão da doença periodontal ou causar impactos negativos sobre os tecidos periodontais de suporte (JEPSEN et al., 2018). Como exemplo dessas condições pode-se citar a redução em número ou função de leucócitos polimorfonucleares, que resultaria em um aumento na gravidade da periodontite e destruição periodontal (KINANE, PETERSON & STATHOPOULOU, 2006). Outras condições sistêmicas modificam as doenças periodontais por meio de seus efeitos sobre o sistema imunológico e resposta inflamatória, dentre essas condições estão o diabetes mellitus e o tabagismo (JEPSEN et al., 2018; KINANE, PETERSON & STATHOPOULOU, 2006).

O diabetes é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla que se caracteriza por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, resultante do defeito da secreção e/ou ação de insulina (KARAA & GOLDSTEIN, 2015). As principais categorias de diabetes são a tipo 1 e a tipo 2. O diabetes tipo 1, conhecido como insulino-dependente, é caracterizado pela deficiência de insulina, possivelmente causada pela predisposição genética e gatilhos ambientais. Enquanto a diabetes tipo 2, conhecida como diabetes não insulino-dependente, é responsável pela maior quantidade de casos, e é causada por secreção deficiente de insulina e/ou aumento da insulina (KARAA & GOLDSTEIN, 2015). A ligação entre diabetes e periodontite é estudada há muitos anos e é provável que a inflamação aumentada decorrente de cada patologia afete adversamente a outra (PRESHAW & BISSETT, 2019). Estudos demonstram que o risco de periodontite é aumentado de 2 a 3 vezes em pessoas com diabetes em comparação a pessoas saudáveis (MEALEY & OLAMPO, 2007).

O fumo é bem reconhecido na literatura por aumentar o risco de distúrbios sistêmicos, como obstrução pulmonar crônica, doenças cardiovasculares, câncer, complicações na gravidez, entre outros (COLOMBO et al., 2014; GLASTONBURY, 2020; GANDINI et al., 2008; GIULIETTI et al., 2020). Diversos estudos fornecem evidências de uma associação positiva entre tabagismo e gravidade da doença periodontal. O hábito de fumar aumenta o risco de desenvolvimento e progressão da doença periodontal (NOCITI, CASATI & DUARTE, 2015). Também se estima, por meio de uma revisão sistemática, que fumar regularmente aumenta o risco de periodontite em 85% (LEITE et al., 2018), além de ser um fator favorável a maior perda dentária em pacientes com doença periodontal (HELAL et al., 2019). Apesar dos diversos estudos, os mecanismos que levam a piora periodontal ainda não foram completamente elucidados. Tem sido hipotetizado que o tabagismo afeta a vascularização, o sistema imunológico humoral e o sistema inflamatório celular (LEITE et al., 2018; INOUE et al., 2016; RAVIDÀ et al., 2020). Vale ressaltar, dessa forma, que a relação prejudicial entre tabagismo,

diabetes e doença periodontal, foi bem estabelecido e reconhecido em 2017, no novo esquema de classificação das doenças periodontais, sendo incluídos como modificadores de grau, devido ao seu agravamento sobre o risco da progressão da periodontite (PAPAPANOU et al., 2018).

Os fibroblastos são o tipo celular mais abundante do periodonto e são encontrados em todos os tecidos, predominantemente nos tecidos conjuntivos (TAKEUCHI et al., 2001). Eles apresentam origem mesenquimatosa e são fusiformes e/ou alongados, com várias funções, incluindo a produção de matriz extracelular e a secreção de mediadores inflamatórios (JANG et al., 2017), e estão fortemente ligados à manutenção, reparo e regeneração do tecido conjuntivo periodontal e à resposta inflamatória tecidual (BARTOLD et al., 2000). Os fibroblastos participam no processo de reparo tecidual devido a sua capacidade de proliferação, migração e preenchimento, além de sintetização de fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular (HÄKKINEN et al., 2000).

Há uma heterogeneidade de fibroblastos encontrados no periodonto (BORDIN et al., 1984; HASSELL & STANEK, 1983; McCULLOCH & Bordin, 1991, SCHOR et al., 1996) que garante características variáveis de morfologia, estrutura, proliferação, migração, entre outros. Essa heterogeneidade aparenta ser necessária para o funcionamento normal dos tecidos na saúde, doença e reparo (BARTOLD et al., 2000). Os fibroblastos são envolvidos nos processos de síntese da matriz extracelular via fagocitose e secreção de collagenases, o que garante a renovação e remodelação sem prejudicar a função do tecido (TEN CATE & DEPORTER, 1975). Também são capazes de sintetizar MMPs, proteoglicanos e outros componentes de matriz (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993), o que permite, junto com seus inibidores, um controle tardio da matriz para remodelação (OVERALL, 1994). Os fibroblastos gengivais (FG) possuem habilidade de quimiotaxia e adesão a diferentes substratos, influenciando positivamente na sua função de reparo.

Além disso, os fibroblastos gengivais e os fibroblastos dos ligamentos periodontais são responsáveis pela produção de várias citocinas, incluindo as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), TNF-alfa, e o receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK) (YAMAMOTO et al., 2006; BELIBASAKIS et al., 2011 entre outros mediadores inflamatórios. Há também uma ação marcante contra a microbiota periodontal através da produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (JANG et al., 2017). Entretanto, dependendo do grau de patogenicidade, as espécies bacterianas têm maior ou menor capacidade de regular algumas citocinas e AMPs. As espécies patogênicas, tais como as do complexo vermelho (SOCRANSKY et al., 1998), controlam estes fatores em níveis baixos; enquanto na presença de cepas menos patogênicas, a expressão é mantida em altas taxas (JANG et al., 2017).

A produção desregulada de citocinas está intimamente relacionada ao aparecimento e progressão de diversas doenças infecto-inflamatórias (DINARELLO, 2007). Foi hipotetizado em diversos estudos o papel fundamental das citocinas na progressão da doença periodontal, além de demonstrar que o desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias causa danos nos tecidos periodontais e dificulta a resolução inflamatória (THOMSON et al., 2006; VAN DYKE et al., 2020; VAN DYKE, 2020; TELES et al., 2018; TELES et al., 2010; CEKICI et al., 2014). O estado de saúde periodontal, o desafio microbiológico e a resposta inflamatória tende a ser equilibrada, quando existe um número adequado de neutrófilos infiltrantes, além de células imunes, como Th17 e células linfoides inatas (VAN DYKE, 2020). Em situações de mudanças na patogênese da microbiota, a resposta imune do hospedeiro frente aos desafios microbianos, se dá inicialmente entre o microbioma e células do tecido periodontal, fibroblastos e outras células epiteliais da mucosa, levando a uma onda de secreção de citocinas, principalmente da família da Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e TNF-alpha, que promovem a receptação de linfócitos (MOUTSOPOULOS & KONKEL, 2018).

As citocinas pró-inflamatórias da família da IL β , IL-6 e TNF-alpha aparentam ter efeitos diversos na patogênese da doença periodontal, além da receptação de linfócitos e favorecer a destruição tecidual (LAVU et al., 2015; BEN-SASSON et al., 2009). Dentre elas, possui papel de destaque a IL-6, demonstrada por estudos que possui papel de amplificador inflamatório (BETTELLI et al., 2006; DUHEN et al., 2009). Em modelos experimentais em macacos, foi encontrado níveis mais altos de IL-6 na fase aguda da doença, enquanto nas fases de progressão e resolução da doença permaneceu-se níveis mais baixos (EBERSOLE et al., 2014), além de regular positivamente a expressão do ativador do receptor RANKL em osteoblastos, levando a diferenciação óssea, dessa forma, demonstrando um papel significativo na patogênese da doença periodontal (PAN et al., 2019; PAN et al., 2019; SANTOS-LIMA et al., 2019; ZHOU et al., 2019; ZEKERIDOU et al., 2019).

A TNF-alpha tem papel crucial na indução da morte celular, além na resposta pró-inflamatória e comunicação celular (BRENNER et al., 2015). Estudos também demonstraram que TNF-alfa pode regular a expressão de RANKL em células epiteliais gengivais (FUJIHARA et al., 2014; KAWAI et al., 2006). Além de também ser hipotetizado que o TNF pode inibir a produção da matriz extracelular em fibroblastos gengivais (ARANCIBIA et al., 2013; BASSO et al., 2016).

Evidências sugerem que os fibroblastos participam da resposta imunológica às bactérias e atuam como células imunorreguladoras (KINANE et al., 2011; JANG et al., 2017; HERRERO et al., 2018; ARIRACHAKARAN et al., 2012; CHIQUET et al., 2015). Estudos *in*

in vitro já avaliaram diferentes mecanismos da resposta dos fibroblastos a diferentes desafios microbianos: espécies únicas, biofilmes homeostáticos e biofilmes disbióticos (JANG et al., 2017; HERRERO et al., 2018; ARIRACHAKARAN et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das evidências sobre a participação dos fibroblastos na resposta imunológica e sobre sua ação como células imunorreguladoras, a resposta celular dos FG frente ao biofilme dental disbiótico e como isso interfere na patogênese da periodontite ainda não estão completamente elucidados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão sistemática da literatura visando responder à pergunta "Qual a resposta dos fibroblastos gengivais frente ao desafio microbiano do biofilme dental?"

3.2 Objetivos específicos

Analisar a expressão de citocinas *in vitro* dos fibroblastos gengivais frente a um desafio microbiano causado por biofilmes com múltiplas espécies bacterianas periodontais.

4 CAPÍTULO: artigo científico

Qual a resposta dos fibroblastos gengivais frente ao desafio com biofilme dental? Uma revisão sistemática* **

Autores:

Camila Akemi Izumi^a

Reila Taina Mendes^a

Geisla Mary Silva Soares^a

^a Programa de pós-graduação em Odontologia, Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

Autor correspondente:

Geisla Mary Silva Soares

Programa de Pós-graduação em Odontologia,

Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná

Av. Lothário Meissner 632 Jardim Botânico Curitiba – Paraná - Brazil CEP: 80210-170

Telefone: +55 41 3360-4032

E-mail: geisla.soares@ufpr.br

Título resumido: Resposta dos fibroblastos gengivais ao desafio do biofilme dental

Área específica: Periodontia

Tipo de Artigo: Artigo de revisão

* Artigo formatado conforme as normas do periódico *Japanese Dental Science Review*

** Artigo submetido no periódico *Japanese Dental Science Review* em 17/01/2022

RESUMO

Esta revisão sistemática foi realizada para esclarecer a resposta inflamatória dos fibroblastos gengivais ao desafio do biofilme dental na patogênese da periodontite. As bases de dados PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), EMBASE e Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO) foram pesquisadas pela Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Não foram feitas restrições de ano ou idioma. Os descritores padronizados (Medical Subject Headings, MeSH) utilizados foram: "fibroblasts", "biofilm", "periodontitis" e "inflammatory response", com o uso dos operadores booleanos "AND" para uma combinação de fibroblastos e periodontite com biofilme ou resposta inflamatória. De um total de 1.074 títulos encontrados, 12 artigos foram incluídos. A avaliação do risco de viés foi realizada com a ferramenta adaptada ROBINS-I, 11 estudos foram considerados de baixo risco e 1, risco moderado de viés. Assim, seis estudos realizaram o desafio do biofilme a partir do modelo *in vitro*. Em todos os artigos incluídos a regulação de citocinas por fibroblastos foi constatada a influência da resposta inflamatória na doença periodontal, com um aumento de IL-6, COX-2, RANK/RANKL, fator 1 e IL-34, e uma redução nas expressões de IL-1 β quando desafiadas por biofilmes patogênicos. Conclusão: Além da heterogeneidade dos estudos avaliados, destacamos o papel fundamental desempenhado pelos fibroblastos durante o aparecimento e a progressão da doença periodontal.

Palavras-chave: Fibroblastos gengivais humanos; periodontite; biofilme; resposta inflamatória

1 INTRODUÇÃO

Periodontite é uma doença inflamatória crônica, multifatorial e infecciosa associada a um biofilme disbiótico, com mudanças na diversidade e proporção de espécies bacterianas subgingivais [1]. A resposta inflamatória crônica do hospedeiro ao desafio microbiano leva à destruição progressiva do aparelho de inserção dentária [2]. Suas características clínicas incluem alteração da cor gengival, textura e volume, perda de inserção em dois ou mais locais interproximais não adjacentes, ou perda de fixação de 3 mm ou mais nas regiões vestibular ou lingual/palatina, em pelo menos dois dentes, sem causas associadas a trauma, mal posicionamento, entre outras, e é classificada de acordo com seu estágio, grau e extensão [2].

A destruição periodontal do tecido é causada principalmente pela resposta exagerada e descontrolada do sistema imunológico do hospedeiro às bactérias e seus produtos [3]. O biofilme patogênico é caracterizado principalmente por bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [4; 5], *Fretibacterium* sp., *TM7* sp., e *Filifactor alocis* [6; 7; 8; 9]. A homeostase comum em humanos é caracterizada por inflamação subclínica de baixo grau, com modesta expressão de citocina e quimiocina [10].

Quando ocorre um processo de disbiose entre o hospedeiro e a microbiota, uma reação inflamatória aumentada é estimulada [11; 12; 13]. Evidências importantes sugerem que a disbiose induz a inflamação [14]. Por outro lado, há sugestão de que a inflamação precede e favorece a disbiose [3]. A inflamação descontrolada pode levar à destruição dos tecidos [15] e aumentar a expressão dos genes de virulência de várias espécies de bactérias periodontais [3; 10]. Quando uma infecção está em curso, a resposta inata é desencadeada e os mecanismos imunes são ativados rapidamente, o que induz a liberação de proteinase, quimiocinas e citocinas [16].

Os fibroblastos são o principal tipo celular do periodonto e são encontrados em todos os tecidos, predominantemente nos tecidos conjuntivos [17]. Eles apresentam origem mesenquimatosa e são fusiformes e/ou alongados, com várias funções, incluindo a secreção de mediadores inflamatórios [18], e estão fortemente ligados à manutenção, reparo e regeneração do tecido conjuntivo periodontal. Além disso, os fibroblastos gengivais e os fibroblastos dos ligamentos periodontais são responsáveis pela produção de várias citocinas, incluindo as interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), fator de necrose tumoral (TNF) - e ativador receptor do fator nuclear kappa- β (RANK) [19; 20], entre outros fatores mediadores inflamatórios, que lhe dão grande importância na patogênese da doença periodontal. Há também uma ação marcante

contra a microbiota periodontal através da produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) [18]. Entretanto, dependendo do grau de patogenicidade, as espécies bacterianas têm maior ou menor capacidade de regular algumas citocinas e AMPs. As espécies patogênicas, tais como as do complexo vermelho [21], controlam estes fatores em níveis baixos; enquanto na presença de cepas menos patogênicas, a expressão é mantida em altas taxas [18].

Evidências sugerem que os fibroblastos participam da resposta imunológica às bactérias e atuam como células imunorreguladoras [30]. Estudos *in vitro* já avaliaram diferentes mecanismos da resposta dos fibroblastos a diferentes desafios microbianos: espécies únicas, biofilmes homeostáticos e biofilmes disbióticos [18; 22; 23]. Entretanto, a resposta celular à disbiose ainda não está completamente elucidada. Assim, a presente revisão sistemática da literatura visa responder à pergunta "Qual é a resposta inflamatória dos fibroblastos diante do desafio dos biofilmes dentários?"

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 FORMATO E PROTOCOLO

Essa revisão foi realizada de acordo com os protocolos de Revisão Sistemática e Meta-análise do Joanna Briggs Institute (JBI).

2.2 POPULAÇÃO, INTERVENÇÃO, COMPARAÇÃO, OUTCOME/DESFECHE E TIPO DE ESTUDO (PICOT)

- População: Fibroblastos
- Intervenção: desafio bacteriano por biofilme dental periodontopatogênico multiespécies
- Comparação: Grupo controle com fibroblastos não desafiados
- Outcome/desfecho: Expressão de citocinas, viabilidade celular, invasão celular e morfologia
- Tipo de estudo: estudos *in vitro*

O rascunho do manuscrito também foi registado no *framework* Open Science (registro DOI [10.17605/OSF.IO/C9T5K](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/C9T5K))

2.3 FOCO DA QUESTÃO

- Qual a resposta dos fibroblastos ao desafio com biofilme dental?

2.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Esta revisão sistemática incluiu estudos *in vitro* realizados com fibroblastos gengivais humanos, seja de linhagem ou obtidos de biópsia de pacientes, desafiados com biofilme com bactérias periodontopatogênicas, seja em modelo *in vitro* ou desafiados *in vivo*. Além disso, foram incluídos apenas estudos que abordaram especificamente o papel dos fibroblastos gengivais humanos na resposta inflamatória periodontal ao desafio microbiano, a partir de estudos *in vitro*.

Foram excluídos os estudos que utilizavam biofilme de uma única espécie, Lipopolissacarídeo (LPS) de uma única espécie, ensaios clínicos, caso-controle, relatórios de caso, estudos de coorte, opiniões pessoais, cartas editoriais, e qualquer outro tipo de revisão.

2.5 ESTRATÉGIA DE BUSCA, SELEÇÃO DE ESTUDOS E EXTRAÇÃO DE DADOS

Para organizar a presente revisão sistemática, as bases de dados PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), EMBASE e Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO) foram pesquisadas através da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) (Figura 1). Não foram feitas restrições de ano ou idioma. Foram utilizados os descritores padronizados (Medical Subject Headings, MeSH): "fibroblasts", "biofilm", "periodontitis", e "inflammatory response", com o uso dos operadores booleanos "AND" para uma combinação de fibroblastos e periodontite com biofilme ou resposta inflamatória.

A primeira fase da pesquisa foi a identificação dos estudos. Para seleção e elegibilidade, dois pesquisadores independentes (CAI e GMS) participaram. Nesta fase, ambos leram os títulos e resumos em busca dos estudos que se referiam ao tema. Em seguida, os textos completos foram lidos e, caso houvesse alguma inconsistência entre os pesquisadores, um terceiro membro (RTM) foi consultado para arbitrar sobre o assunto.

A segunda fase foi a extração de dados, realizada pelos dois pesquisadores independentes. Os artigos incluídos foram lidos em sua totalidade, procurando coletar os seguintes dados: Objetivo do estudo, metodologia para manipulação de fibroblastos gengivais

humanos, tipo de desafio microbiano, metodologia de biofilme, grupos analisados, viabilidade celular, invasão celular, morfologia, citocinas avaliadas, resultados e conclusão.

2.6 ANÁLISE DE VIÉS

Nesta revisão, a ferramenta ROBINS-I foi utilizada de forma adaptada. Esta ferramenta foi desenvolvida para analisar os riscos de viés em estudos não randomizados que comparavam efeitos em duas ou mais intervenções, e é baseada na ferramenta RoB da Cochrane para ensaios randomizados e ferramentas relacionadas como o QUADRAS-2 para estudos de precisão diagnóstica. Suas opções de viés são aquelas de baixo risco de viés (o estudo é comparável a um ensaio clínico aleatório bem executado), risco moderado (o estudo é válido para um ensaio não aleatório, mas não pode ser comparado a um ensaio aleatório bem executado), risco sério de viés (o estudo tem grandes problemas), risco crítico de viés (o estudo é problemático para fornecer provas úteis), e nenhuma informação para basear um julgamento sobre o viés.

Os domínios de viés incluídos no viés de seleção da ferramenta, na classificação da intervenção, devido ao viés de intervenção, à falta de dados, medição do resultado, do resultado relatado, e podem ser respondidos com sim, possivelmente sim, não, possivelmente não, e, não aplicável (Figura 1).

3 RESULTADOS

A estratégia de busca eletrônica identificou 1.074 títulos. Após a exclusão de itens duplicados e títulos que não cabiam por título e resumos, 16 artigos ficaram para serem lidos na íntegra. Destes 16 artigos remanescentes, quatro foram excluídos por não se enquadrarem nos critérios de inclusão/exclusão. Assim, 12 artigos foram incluídos nesta revisão sistemática, como descrito na Figura 2.

FIGURA 1 – RESUMO DA ANÁLISE DE RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS DE ACORDO COM O FORMULÁRIO ADAPTADO DE ROBINS-1

Study	Risk of bias domains							Overall
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Belibasakis & Guggenheim, 2011 [25]	+	-	+	+	+	-	+	+
Belibasakis et al., 2011 [20]	+	-	+	-	-	-	+	-
Belibasakis et al., 2014 [26]	+	-	+	+	+	-	+	+
Bostanci et al., 2011 [27]	+	+	+	+	+	-	+	+
Clark et al., 2020 [49]	+	+	+	+	+	-	+	+
El-Awady et al., 2013 [28]	+	+	+	+	+	-	+	+
El-Awady et al., 2010 [29]	-	+	+	-	+	+	+	+
Herrero et al., 2018 [22]	+	+	-	+	+	-	+	+
Ozawa et al., 2003 [51]	+	+	+	+	+	-	+	+
Rikimaru et al., 2009 [45]	+	+	+	+	+	-	-	+
Sliepen et al., 2009 [24]	+	+	+	+	+	-	+	+
Wassenaar et al., 1997 [52]	+	-	+	+	+	-	+	+

Domains:

D1: Bias due to confounding.

D2: Bias due to selection of participants.

D3: Bias in classification of interventions.

D4: Bias due to deviations from intended interventions.

D5: Bias due to missing data.

D6: Bias in measurement of outcomes.

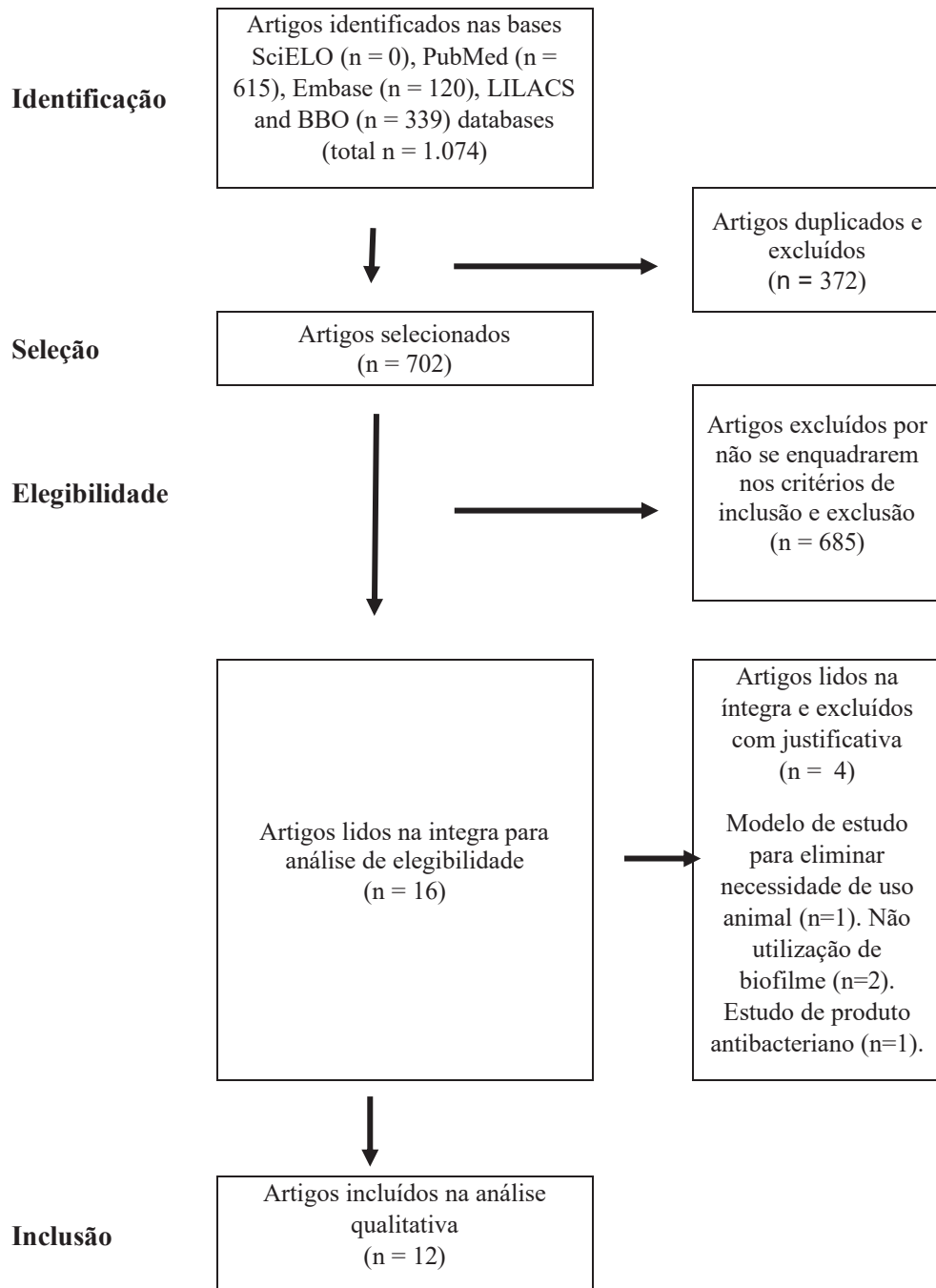
D7: Bias in selection of the reported result.

Judgement

- Moderate

+ Low

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA



O risco de viés dos estudos individuais foi avaliado de acordo com a ferramenta ROBINS-I excluindo o cegamento para operador/avaliador (Figura 1). Onze estudos foram considerados como tendo um risco geral baixo de viés, e um estudo, um risco moderado de viés. Os estudos considerados de baixo risco apresentaram de 0 a 3 domínios para risco moderado. E, o estudo que apresentava risco moderado de viés tinha quatro domínios para risco moderado [20].

A Tabela 1 descreve a metodologia dos estudos incluídos. Todos eles investigaram de alguma forma a resposta inflamatória dos fibroblastos gengivais humanos diante de um desafio microbiano periodontal patogênico. Dos 12 artigos avaliados, apenas um [24] usou fibroblastos gengivais humanos de linhagem, os outros estudos usaram fibroblastos gengivais humanos obtidos de biópsia de pacientes de cirurgias dentárias de rotina. Dos artigos selecionados, seis deles realizaram o desafio do modelo de biofilme *in vitro* [20; 22; 24; 25; 26; 27]. Quatro deles utilizaram o mesmo modelo de biofilme [20; 25; 26; 27] com espécies bacterianas patogênicas para se assemelham ao biofilme subgengival e outro, com espécies compatíveis com o hospedeiro para se assemelham ao biofilme supragengival. Os outros estudos usaram como desafio microbiológico o biofilme *in vivo*, a partir do desafio no próprio paciente, e a biópsia subsequente realizada de pacientes em grupo de controle (sem periodontite) e pacientes com periodontite (Tabela 1).

Os principais resultados e conclusões dos estudos incluídos são descritos na Tabela 2. Dentre as citocinas avaliadas, podemos destacar: Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 18 (IL-18), Interleucina 34 (IL-34), Interleucina 1 Beta (IL-1 β), Sistema de Osteoclastogênese (RANK/RANKL/OPG), transcrições individuais, NLR Family Pyrin Domain Containing 1 (NLRP1), NLR Família Pyrin Domaing contendo 2 (NLRP2), NLR Família Pyrin Domaing contendo 3 (NLRP3), Prostaflandina E2 (PGE2), Matrix metalloproteinase 8 (MMP-8), Tumor necrosis factor alfa (TNF-alfa), e Colony stimulating factor 1 (CSF-1). Nenhum estudo analisou viabilidade celular ou invasão celular e apenas um [28] avaliou a morfologia celular (Tabela 2).

4 DISCUSSÃO

Este estudo visou caracterizar a resposta dos fibroblastos - as células mais abundantes nos tecidos periodontais - ao desafio do biofilme dental. Durante o estado saudável do periodonto, existe um equilíbrio homeostático entre o hospedeiro e o microbioma, embora um processo inflamatório subclínico esteja em andamento. O acúmulo prolongado de biofilme nas superfícies dos dentes pode aumentar este estado inflamatório e levar à gengivite, que é, no entanto, um estado imuno-inflamatório controlado. Quando a simbiose do biofilme se transforma em disbiose, o equilíbrio entre o hospedeiro e o microbioma é interrompido e o processo inflamatório é exacerbado. Durante este processo, a interação entre o biofilme disbiótico e a resposta do hospedeiro ocorre de maneira retroalimentada. Tal estado inflamatório é uma característica principal da periodontite, clinicamente observada como a

presença de bolsas periodontais profundas e perda óssea alveolar. [3; 29]. Uma complexa cascata de eventos inflamatórios e imunológicos ocorre na tentativa de proteger o hospedeiro; no entanto, este processo ainda não está perfeitamente elucidado [30].

O biofilme dental patogênico, principalmente subgingival, apresenta contagens e proporções alteradas de algumas espécies bacterianas consideradas chave para o início e progressão da periodontite. Estas espécies são consideradas patógenos periodontais, entre elas estão *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* [5; 15] *A. actinomycetencomitans* e mais recentemente outras espécies foram incluídas no grupo dos periodontopatógenos como *Fretibacterium* sp, TM7 sp. e *Filifactor alocis* [6; 8; 9].

Esta revisão sistemática incluiu artigos com diferentes metodologias. Foram utilizados diferentes modelos de desafios microbiológicos, bem como diferentes formas de obtenção de fibroblastos. Os estudos selecionados utilizaram células de linhagem ou células extraídas *in vivo*, de pacientes doadores, com periodontite ou não. Embora esta diversidade metodológica não tenha permitido comparar todos os estudos, ela pode ser entendida como um benefício para a compreensão da reação dos fibroblastos gengivais (FG) a diferentes tipos de desafios microbianos, pois embora apenas doze artigos correspondessem a nossos critérios de inclusão e exclusão, modelos *in vitro* de biofilme supra e sub-gingival, e biofilmes *in vivo* foram comparados.

Os modelos de biofilme *in vitro* permitem avaliações específicas, com a possibilidade de controle de variáveis que podem influenciar o resultado [31]. Na avaliação proposta para esta revisão sistemática, o uso de modelos de biofilme *in vitro* controlou as variáveis individuais tanto em relação à microbiota quanto à composição da saliva ou líquido gengival, e assim permitiu uma homogeneização das reações dos FG. Além disso, os modelos de biofilme *in vitro* permitem a realização de experimentos com alto rendimento, sem a necessidade de envolver um grande grupo de indivíduos. Os modelos de biofilme descritos como supra e sub-gingival [20; 22; 24; 25; 26; 27] foram desenvolvidos com espécies predominantes em cada região; o modelo sub-gingival incluiu patógenos periodontais, que foram descritos anteriormente, enquanto o modelo supra-gingival continha microorganismos associados à saúde periodontal. Assim, para comparar estudos desenvolvidos *in vivo*, em que o desafio microbiano ocorreu em pacientes com periodontite, e aqueles realizados *in vitro*, focalizamos o modelo de biofilme subgingival.

A definição da intervenção desta revisão sistemática com biofilme multiespécie foi feita com o objetivo de garantir um desafio complexo para o FG mesmo quando foram usados biofilme *in vitro*. Este critério excluiu dezenas de artigos, que desafiam o FG com modelos de

biofilme de uma única espécie. Principalmente, os biofilmes com apenas *P. gingivalis* foram amplamente descritos na literatura [32], porém não se pode considerá-los semelhantes aos biofilmes *in vivo*, ou a resposta do GF diante do desafio pode ser comparada com uma condição clínica.

Os FG são as células mais abundantes em tecido gengival e são essenciais para os processos de cura e reparo [34]. A população residente de fibroblastos de vários tecidos responde aos primeiros sinais de lesão tecidual e infecção bacteriana [34]; os fibroblastos desempenham um papel importante na produção da matriz de colágeno do tecido, bem como na resposta ao desafio microbiano, através da produção de mediadores inflamatórios, migração de leucócitos, secreção de citocinas e quimiocinas [36; 37]. Os FGs podem secretar, mediante estimulação por citocinas ou bactérias, vários mediadores inflamatórios solúveis, incluindo interleucinas. A IL-6 desempenha um papel fundamental durante a periodontite. É comumente associada à perda de inserção clínica e está intimamente relacionada à gravidade clínica da doença periodontal [38; 39], além de ter sua expressão aumentada sistemicamente em estudos pré-clínicos e clínicos [40; 41]. Entretanto, há alguma divergência na literatura, alguns estudos não mostraram diferenças na expressão da IL-6 em comparação com pacientes com periodontite ou com pacientes saudáveis [42; 43; 44]. Entre os 12 artigos selecionados, três avaliaram as expressões de IL-6 por fibroblastos gengivais humanos em resposta ao desafio microbiano [25; 28; 45]. Belibasakis e colaboradores (2011) encontraram um aumento de 2,9 vezes na expressão desta interleucina com o modelo de biofilme subgengival. Um aumento semelhante foi observado em relação à expressão da ciclooxigenase-e (COX-2). A COX-2 é uma enzima expressa constitutivamente em baixas concentrações, mas tem um caráter marcadamente inflamatório e é um importante pilar na produção de PGE₂, uma prostaglandina altamente relacionada à reabsorção óssea alveolar que ocorre na periodontite. A análise por qPCR mostrou um aumento de 8,6 vezes na expressão da COX-2 em fibroblastos desafiados pelo biofilme subgengival [25]. Tais descobertas reforçam o papel do biofilme subgengival disbiótico na perturbação da homeostase. Na análise imunohistoquímica, foi observado um aumento da expressão de IL-6 em locais com periodontite crônica em comparação com locais saudáveis [28; 45]. Tais descobertas confirmam o maior potencial de virulência dos biofilmes subgengivais, bem como o papel da IL-6 na patogênese da periodontite.

Dois estudos incluídos nesta revisão [27; 45] avaliaram a expressão da IL-1 β . A IL-1 β desempenha um papel central na resposta do hospedeiro como mediador da destruição do tecido e da reabsorção óssea [46]. Seu papel durante a periodontite tem sido descrito extensivamente [44]. A IL-1 β tem uma infinidade de funções, como a ativação de neutrófilos e células B e T

durante a infecção, assim como atuar na regulação da liberação de proteínas de fase aguda [44; 47]. Bostanci e colaboradores (2011) mostraram que o biofilme subgingival desempenha um papel antagonico na expressão da IL-1 β . Eles encontraram um aumento na expressão da IL-1 β associada a baixas concentrações de biofilme e, por outro lado, uma redução na expressão da IL-1 β foi associada a maiores concentrações de biofilme. Os níveis de IL-1 β mRNA foram aumentados pela estimulação por ET-1 (receptor específico) de maneira dose-dependente, mas o aumento foi inibido pelos antagonistas dos receptores ETA ou ETB [45].

A perda óssea alveolar é uma característica clínica importante da periodontite e é modulada pelo sistema de citocinas Ativador Receptor NF-kB (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG). Ambas as citocinas podem ativar o RANK, que é encontrado nos precursores osteoclastos. A ativação de RANK/RANKL pode levar à reabsorção óssea enquanto a de RANKL/OPG pode levar à formação óssea [20]. O equilíbrio na relação RANKL/OPG é essencial para a homeostase óssea. Tal via tem uma importante interação no sistema imunológico [48], e este equilíbrio pode ser rompido pelo biofilme patogênico. Belibasakis et al. (2011) mostraram que o biofilme subgingival apresentando um forte efeito relacionado à perda óssea, o que enfatiza o papel do biofilme patogênico durante a doença periodontal.

O estado pró-inflamatório do FG durante a periodontite também foi confirmado pelo aumento da expressão do fator de estímulo de colônia 1 (CSF-1) e Interleucina 34 (IL-34) em pacientes com periodontite [49]. Estes dados enfatizam o papel das funções das células mielóides na patogênese da periodontite - como estabelecido por Page & Schroeder em 1976 - e guiam a pesquisa para direções futuras para uma melhor compreensão da patogênese da periodontite.

É importante ressaltar que as bactérias visam alcançar uma simbiose com o hospedeiro na superfície gengival [50]. Como descrito anteriormente, a interação biofilme-hospedeiro é um processo complexo. Recentemente, novos caminhos, genes e associação de um único nucleotídeo à periodontite estão surgindo [50]. Curiosamente, Belibasakis et al. (2014) avaliaram as mudanças transcricionais que ocorrem nos fibroblastos devido ao desafio do biofilme, com ou sem o complexo vermelho, e várias vias de sinalização dos FG foram observadas, incluindo mudanças na resposta imunológica primária, receptores de pedágio, IL-1 β e IL-17. A presença ou a ausência do complexo vermelho não provocou mudanças significativas, o que mostrou uma resposta celular transcricional uniforme e não específica devido ao desafio bacteriológico.

Algumas limitações podem ser apontadas nesta revisão sistemática. A mais importante é a falta de protocolos projetados para revisões sistemáticas de estudos *in vitro*. Não há uma

padronização da análise de viés. Embora existam várias ferramentas para avaliar o risco de viés descrito na literatura, algumas características específicas das ferramentas disponíveis as tornam inconsistentes e com alta variabilidade e não aplicáveis a estudos *in vitro*; já que nenhuma delas contempla todas as etapas necessárias para revisões sistemáticas e meta-análises de estudos *in vitro* [51]. Portanto, adaptamos e utilizamos a ferramenta ROBINS-I. Essa ferramenta ROBINS-I foi desenvolvida para analisar o risco de viés de estudos não randomizados que comparam efeitos em duas ou mais medições de dados. Em seu modelo, o desbloqueio do operador/avaliador levaria a um alto risco de enviesamento. Entretanto, para estudos *in vitro*, tais domínios não prejudicam o resultado. Assim, o cegamento para a seleção de participantes e medição de dados foi considerada "não aplicável".

5 CONCLUSÃO

Além da heterogeneidade dos estudos avaliados, que não permitiram uma avaliação mais aprofundada, destacamos o papel fundamental desempenhado pelos fibroblastos durante o aparecimento e progressão da doença periodontal, com um aumento da IL-6, COX-2, RANK/RANKL, CSF-1 e IL-34, e uma redução das expressões de IL-1 β quando desafiadas por biofilmes patogênicos. Além disso, a falta de protocolos para revisões sistemáticas *in vitro* e a incapacidade de revisão do banco de dados de protocolos foram grandes limitações observadas.

Assim, algumas recomendações são listadas para pesquisas futuras:

1. Inclusão de um maior número de citocinas que podem influenciar a produção da matriz de colágeno do tecido ou a resposta inflamatória.
2. Para estudos com modelos de biofilme *in vitro*, focar em modelos que imitem o biofilme subgengival multiespécie, com o maior número possível de espécies bacterianas.
3. Inclusão de análises celulares como viabilidade celular, invasão celular e morfologia.

REFERÊNCIAS

- [1] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. PMID: 30301974; PMCID: PMC6278837.
- [2] 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. doi: 10.1111/jcpe.12935. PMID: 29926489.
- [3] Van Dyke TE. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2020 Oct;91 Suppl 1(Suppl 1):S19-S25. doi: 10.1002/JPER.20-0088. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32441774; PMCID: PMC8142079.[45] [45]
- [4] Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x. PMID: 15853940.
- [5] Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012 Dec;27(6):409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x. Epub 2012 Sep 3. PMID: 23134607; PMCID: PMC3653317.
- [6] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010 Oct;192(19):5002-17. doi: 10.1128/JB.00542-10. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20656903; PMCID: PMC2944498.
- [7] Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 9;113(6):E791-800. doi: 10.1073/pnas.1522149113. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26811460; PMCID: PMC4760785.
- [8] Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, Difranco JM, Hardman JH, Vriesendorp B, Faust RA, Janies DA, Leys EJ. CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One*. 2011 Apr 22;6(4):e19051. doi: 10.1371/journal.pone.0019051. PMID: 21544197; PMCID: PMC3081323.
- [9] Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012 Jun;6(6):1176-85. doi: 10.1038/ismej.2011.191. Epub 2011 Dec
- [10] Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Front Immunol*. 2020 Mar 31;11:511. doi: 10.3389/fimmu.2020.00511. PMID: 32296429; PMCID: PMC7136396.
- [11] Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):321-35. doi: 10.1038/nri3430. PMID: 23618829.
- [12] Plotnikoff GA, Riley D. The human microbiome. *Glob Adv Health Med*. 2014 May;3(3):4-5. doi: 10.7453/gahmj.2014.023. PMID: 24891987; PMCID: PMC4030613.
- [13] Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan;10(1):18-26. doi: 10.1038/mi.2016.75. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27554295; PMCID: PMC5788567.
- [14] Dutzan N, Kajikawa T, Abusleme L, Greenwell-Wild T, Zuazo CE, Ikeuchi T, Brenchley L, Abe T, Hurabielle C, Martin D, Morell RJ, Freeman AF, Lazarevic V, Trinchieri G, Diaz PI, Holland SM, Belkaid Y, Hajishengallis G, Moutsopoulos NM. A dysbiotic microbiome triggers T_H17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2018 Oct 17;10(463):eaat0797. doi: 10.1126/scitranslmed.aat0797. PMID: 30333238; PMCID: PMC6330016.

- [15] Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol* 2000. 2017 Oct;75(1):116-151. doi: 10.1111/prd.12181. PMID: 28758305; PMCID: PMC5539911.
- [16] Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*. 2007 Jun;261(6):511-28. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01821.x. PMID: 17547708.
- [17] Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001 Jul;51(Pt 4):1405-17. doi: 10.1099/00207713-51-4-1405. PMID: 11491340.
- [18] Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*. 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28383815.
- [19] Yamamoto A, Cremona ML, Rothman JE. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol*. 2006 Feb 27;172(5):719-31. doi: 10.1083/jcb.200510065. PMID: 16505167; PMCID: PMC2063704.
- [20] Belibasakis GN, Meier A, Guggenheim B, Bostanci N. The RANKL-OPG system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants. *Cytokine*. 2011 Jul;55(1):98-103. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.009. Epub 2011b Apr 6. PMID: 21474331.
- [21] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x. PMID: 9495612.
- [22] Herrero ER, Fernandes S, Verspecht T, Ugarte-Berzal E, Boon N, Proost P, Bernaerts K, Quirynen M, Teughels W. Dysbiotic Biofilms Deregulate the Periodontal Inflammatory Response. *J Dent Res*. 2018 May;97(5):547-555. doi: 10.1177/0022034517752675. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29394879.
- [23] Arirachakaran P, Apinhasmit W, Paungmalit P, Jeramethakul P, Rerkyen P, Mahanonda R. Infection of human gingival fibroblasts with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2012 Jul;57(7):964-72. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.01.014. Epub 2012 Feb 19. PMID: 22348592.
- [24] Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):1026-30. doi: 10.1177/0022034509347296. PMID: 19828891.
- [25] Belibasakis GN, Guggenheim B. Induction of prostaglandin E(2) and interleukin-6 in gingival fibroblasts by oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Dec;63(3):381-6. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00863.x. Epub 2011a Oct 4. PMID: 22092565.
- [26] Belibasakis GN, Bao K, Bostanci N. Transcriptional profiling of human gingival fibroblasts in response to multi-species in vitro subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Aug;29(4):174-83. doi: 10.1111/omi.12053. Epub 2014 May 13. PMID: 24758474.
- [27] Bostanci N, Meier A, Guggenheim B, Belibasakis GN. Regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasome gene expression levels in gingival fibroblasts by oral biofilms. *Cell Immunol*. 2011;270(1):88-93. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.04.002. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21550598.
- [28] El-Awady AR, Lapp CA, Gamal AY, Sharawy MM, Wenger KH, Cutler CW, Messer RL. Human periodontal ligament fibroblast responses to compression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013 Jul;40(7):661-71. doi: 10.1111/jcpe.12100. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23560813.
- [29] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. PMID: 30301974; PMCID: PMC6278837.

- [30] Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:44-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01682.x. PMID: 21323703.
- [31] Bao K, Papadimitropoulos A, Akgül B, Belibasakis GN, Bostanci N. Establishment of an oral infection model resembling the periodontal pocket in a perfusion bioreactor system. *Virulence*. 2015;6(3):265-73. doi: 10.4161/21505594.2014.978721. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25587671; PMCID: PMC4601317.
- [32] Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6393-6400. doi: 10.1002/jcp.26521. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29574949.
- [34] Chiquet M, Katsaros C, Kletsas D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):21-40. doi: 10.1111/prd.12076. PMID: 25867977.
- [35] Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:28-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240103.x. PMID: 11276872.
- [36] Fitzsimmons TR, Ge S, Bartold PM. Compromised inflammatory cytokine response to *P. gingivalis* LPS by fibroblasts from inflamed human gingiva. *Clin Oral Investig*. 2018 Mar;22(2):919-927. doi: 10.1007/s00784-017-2171-6. Epub 2017 Jul 8. PMID: 28689365.
- [37] Boström EA, Kindstedt E, Sulniute R, Palmqvist P, Majster M, Holm CK, Zwicker S, Clark R, Önell S, Johansson I, Lerner UH, Lundberg P. Increased Eotaxin and MCP-1 Levels in Serum from Individuals with Periodontitis and in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS One*. 2015 Aug 4;10(8):e0134608. doi: 10.1371/journal.pone.0134608. PMID: 26241961; PMCID: PMC4524692.
- [38] Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, Gollob KJ, Dutra WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr;148(1):119-26. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03327.x. PMID: 17286759; PMCID: PMC1868861.
- [39] McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*. 2002 Nov;73(11):1377-91. doi: 10.1902/jop.2002.73.11.1377. PMID: 12479643.
- [40] Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Soga J, Chayama K, Yoshizumi M, Taguchi A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):446-53. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101535. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18039979.
- [41] Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, Hata T, Idei N, Fujimura N, Chayama K, Kihara Y, Taguchi A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):604-10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.037. Epub 2009 Apr 5. PMID: 19410250.
- [42] Aleksandra Nielsen A, Nederby Nielsen J, Schmedes A, Brandslund I, Hey H. Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Dec;40(12):1444-8. doi: 10.1080/00365520510023774. PMID: 16316893.
- [43] Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on

- probability of success. *Int Endod J.* 2007 Dec;40(12):921-39. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01322.x. Epub 2007 Oct 10. PMID: 17931389.
- [44] Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016 Feb;70(1):164-83. doi: 10.1111/prd.12117. PMID: 26662489.
- [45] Rikimaru T, Awano S, Mineoka T, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. Relationship between endothelin-1 and interleukin-1beta in inflamed periodontal tissues. *Biomed Res.* 2009 Dec;30(6):349-55. doi: 10.2220/biomedres.30.349. PMID: 20051644.
- [46] Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996 Nov;1(1):821-78. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.821. PMID: 9118282.
- [47] Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772. PMID: 17972343; PMCID: PMC3140102.
- [48] Terheyden H, Stadlinger B, Sanz M, Garbe AI, Meyle J. Inflammatory reaction - communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Apr;25(4):399-407. doi: 10.1111/clr.12176. Epub 2013 Apr 21. PMID: 23600659.
- [49] Clark R, Zwicker S, Bureik D, Johannsen G, Boström EA. Expression of colony-stimulating factor 1 and interleukin-34 in gingival tissue and gingival fibroblasts from periodontitis patients and controls. *J Periodontol.* 2020 Jun;91(6):828-835. doi: 10.1002/JPER.19-0296. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31682007.
- [50] Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000.* 2020 Feb;82(1):129-142. doi: 10.1111/prd.12267. PMID: 31850627; PMCID: PMC6924568.
- [51] Tran L, Tam DNH, Elshafay A, Dang T, Hirayama K, Huy NT. Quality assessment tools used in systematic reviews of in vitro studies: A systematic review. *BMC Med Res Methodol.* 2021 May 8;21(1):101. doi: 10.1186/s12874-021-01295-w. PMID: 33964880; PMCID: PMC8106836.
- [51] Ozawa A, Tada H, Tamai R, Uehara A, Watanabe K, Yamaguchi T, Shimauchi H, Takada H, Sugawara S. Expression of IL-2 receptor beta and gamma chains by human gingival fibroblasts and up-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2. *J Leukoc Biol.* 2003 Sep;74(3):352-9. doi: 10.1189/jlb.0103044. PMID: 12949238.
- [52] Wassenaar A, Snijders A, Abraham-Inpijn L, Kapsenberg ML, Kievits F. Antigen-presenting properties of gingival fibroblasts in chronic adult periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 1997 Nov;110(2):277-84. doi: 10.1111/j.1365-2249.1997.tb08328.x. PMID: 9367413; PMCID: PMC2265508.
- [53] Aleksandra Nielsen A, Nederby Nielsen J, Schmedes A, Brandslund I, Hey H. Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2005 Dec;40(12):1444-8. doi: 10.1080/00365520510023774. PMID: 16316893.
- [54] Belibasakis GN, Bostanci N, Reddi D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Biol Int.* 2010 Feb 5;34(3):287-92. doi: 10.1042/CBI20090290. PMID: 19947912.
- [54] Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J Dent Res.* 1994 Oct;73(10):1588-92. doi: 10.1177/00220345940730100201. PMID: 7929972.
- [55] Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2013 May;13(5):321-35. doi: 10.1038/nri3430. PMID: 23618829.
- [56] Plotnikoff GA, Riley D. The human microbiome. *Glob Adv Health Med.* 2014 May;3(3):4-5. doi: 10.7453/gahmj.2014.023. PMID: 24891987; PMCID: PMC4030613.

[57] Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2017 Jan;10(1):18-26. doi: 10.1038/mi.2016.75. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27554295; PMCID: PMC5788567.

[58] Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000.* 2020 Feb;82(1):129-142. doi: 10.1111/prd.12267. PMID: 31850627; PMCID: PMC6924568.

TABELA 1: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Estudo	Variável	Desafio microbiano	Tipo de biofilme	Fibroblastos
Belibasakis & Guggenheim, 2011 [25]	COX-2, IL-6, PG-E	<i>In vitro</i>	Supragingival (Shapiro <i>et al.</i> , 2002): <i>Veillonella dispar</i> ATCC 17748 (OMZ 493), <i>Fusobacterium nucleatum</i> KP-F8 (OMZ 598), <i>Streptococcus oralis</i> SK248 (OMZ 607), <i>Actinomyces oris</i> , formerly <i>naeslundii</i> (Henssge <i>et al.</i> , 2009) (OMZ 745), <i>Streptococcus mutans</i> UAB159 (OMZ 918) e <i>Candida albicans</i> (OMZ 110) Subgingival: <i>Campylobacter rectus</i> (OMZ 697), <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> KP-F2 (OMZ 596), <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277T (OMZ 925), <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611T (OMZ 278), <i>Tanarella forsythia</i> OMZ 1047, <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405T (OMZ 661), <i>V. dispar</i> ATCC 17748T (OMZ 493), <i>A. oralis</i> (OMZ 745), <i>S. intermedius</i> ATCC 27335 (OMZ 512) e <i>S. oralis</i> SK 248 (OMZ 607)	De paciente
Belibasakis <i>et al.</i> , 2011 [20]	RANKL/OPG	<i>In vitro</i>	<i>Os mesmos modelos de biofilme supra e subgingivais descritos acima, em Belibasakis GN, 2011^a</i>	De pacientes
Belibasakis <i>et al.</i> , 2014 [26]	Transcriptional	<i>In vitro</i>	<i>Os mesmos modelos de biofilme supra e subgingival descritos acima, em Belibasakis GN, 2011a</i>	De pacientes
Bostanci <i>et al.</i> , 2011 [27]	mRNA NLRP1, NLRP2, NLRP3, IL-1beta and IL-18	<i>In vitro</i>	Subgingival: <i>Campylobacter rectus</i> (OMZ 697), <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> KP-F2 (OMZ 596), <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277T (OMZ 925), <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611T (OMZ 278), <i>Tanarella forsythia</i> OMZ 1047, <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405T (OMZ 661), <i>V. dispar</i> ATCC 17748T (OMZ 493), <i>A. oralis</i> (OMZ 745), <i>S. intermedius</i> ATCC 27335 (OMZ 512) e <i>S. oralis</i> SK 248 (OMZ 607)	De pacientes
Clark <i>et al.</i> , 2020 [49]	CSF-1 and IL-34	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes
El-Awady <i>et al.</i> , 2010 [29]	IL-6	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes
El-Awady <i>et al.</i> , 2013 [29]	IL-6 and MMPs	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes

Herrero et al., 2018 [22]	IL-8, IL-6, IL-1beta, TNF-alfa and MMP- 8	<i>In vitro</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i> LM14657, <i>Streptococcus cristatus</i> ATCC 49999, <i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 49818, <i>Streptococcus parasanguinis</i> DSM 6778, <i>Streptococcus salivarius</i> TOVE-R, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 20523, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 20742, <i>Actinomyces viscosus</i> DSM 43327, <i>Actinomyces naestlundii</i> ATCC 51655, <i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611, <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277, <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 43718, <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 e <i>Veillonella parvula</i> DSM 2008	De pacientes
Ozawa et al., 2003 [51]	IL-2 Receptor (IL-2R alfa e beta), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Janus tyrosine kinase (Jak)3 phosphorylation ET-1 and IL-1beta	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes
Rikimaru et al., 2009 [45]	IL-8	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes
Sliepen et al., 2009 [24]		<i>In vitro</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718, <i>Streptococcus sanguinis</i> KTH-4, <i>Streptococcus salivarius</i> TOVE, <i>Streptococcus mitis</i> BMS, <i>S. gordonii</i> ATCC 10558 e <i>F. nucleatum</i> .	De linhagem
Wassenaar et al., 1997 [52]	IFN-gama	<i>In vivo</i>	Biópsia de pacientes	De pacientes

TABELA 2: PRINCIPAIS RESULTADOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Estudo	Objetivo	Resultados	Conclusão
Belibasakis & Guggenheim , 2011 [25]	Investigar os efeitos dos biofilmes na regulação de PGE(2) e IL-6 nos fibroblastos gengivais humanos.	FG expressou níveis mais baixos de COX-2. O biofilme supragingival não causou aumento significativo na expressão de COX-2, mas o subgengival causou uma regulação 8.6 maior comparado ao controle. A expressão RANKL foi induzida com maiores concentrações de biofilme, tanto por sobrenadantes supragengivais quanto subgengivais. Em concentrações mais elevadas, a expressão de OPG foi regulada para cima pelo biofilme subgengival e para baixo pelo biofilme supragengival, em comparação com o controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de LDH extracelularmente realiaidos em BF ou BF-RC, em comparação com o controle.	Coletivamente, os biofilmes subgengivais podem ser mais potentes para induzir os mediadores inflamatórios da reabsorção óssea.
Belibasakis et al., 2011 [26]	Investigar os efeitos dos modelos de biofilme supra e subgengival, sobre a expressão dos genes RANKL e OPG nas culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos (FG).		Os biofilmes supragengivais e subgengivais podem aumentar a relação RANKL/OPG nas células do tecido conjuntivo gengival, denotando uma maior capacidade das células para estimular a reabsorção óssea.
Belibasakis et al., 2014 [26]	Caracterizar as mudanças transcricionais gerais dos fibroblastos gengivais humanos cultivados em resposta a um modelo de biofilme subgengival in vitro de 10 espécies (BF), sobre um desafio.		Um grande número de mudanças transcricionais são ativadas em FG em resposta aos biofilmes subgengivais. Estas estão principalmente associadas com a resposta imune inata. A presença das três espécies do "complexo vermelho" como parte do biofilme multiespecífico não produziu respostas diferenciais significativas, pelo menos não no nível transcricional.
Bostanci et al., 2011 [27]	Investigar a expressão gênica de componentes complexos inflamatórios.	A expressão NLRP2 não foi detectada em nenhum grupo sob as atuais condições experimentais. Nem o biofilme supragengival nem o biofilme subgengival afetaram a expressão do NLRP1.	Os biofilmes supra e subgengival causam efeitos diferenciais na expressão gênica destes componentes inflamatórios e seus alvos IL-1..
Clark et al., 2020 [49]	Avaliar a expressão de CSF-1 e IL-34 em tecidos gengivais e fibroblastos gengivais humanos de pacientes com periodontite e controle.	Análise de Western blot mostraram níveis mais altos de CSF-1 em periodontite e níveis similares de IL-34.	Os fibroblastos gengivais secretam constitutivamente tanto o CSF-1 quanto a IL-34 com níveis aumentados após estímulo pró-inflamatório. Juntos, sugerem que o CSF-1 e a IL-34 na gengiva desempenham um papel na regulação da função macrofágica na periodontite.

- El-Awady et al., 2010 [28]
- Investigar PDLFs humanos isolados de locais periodontalmente saudáveis e doentes (D-PDLFs) em relação à morfologia celular, atividade ALP, proteína IL6 e expressão gênica, e expressão gênica inflamatória mediadora
- Os D-PDLFs retêm fenótipos inflamatórios únicos que poderiam manter sinais destrutivos localizados na periodontite.
- El-Awady et al., 2013 [29]
- Testar se os fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDLFs) retêm respostas homeostáticas a uma força compressiva fisiológica durante a periodontite crônica.
- Os fibroblastos periodontais cultivados a partir de locais doentes (D-PDLFs) sustentam maior expressão de várias metaloproteinases de matriz na ausência de estimuladores inflamatórios. Isto sugere que os PDLFs, em locais de periodontite crônica, poderiam estar envolvidos na amplificação e sustentação das respostas inatas no periodonto.
- Herrero et al., 2018 [22]
- Determinar diferenças na expressão do gene da virulência por patogênicos e a resposta inflamatória do hospedeiro em biofilmes homeostáticos e disbióticos originários da mesma ecologia.
- Os biofilmes disbióticos aumentaram significativamente a resposta inflamatória em comparação com os HBs e BBs.
- Ozawa et al., 2003 [51]
- Para invadir o papel dos fibroblastos de gengiva humana (HGF) de reexpressão da interleucina-2 (IL-2R) α , β , e γ chans foi examinado.
- O HGF expressa IL-2R $\beta\gamma$ funcional, responde à IL-2 a partir de células T infiltradas, e participa ativamente do processo inflamatório na região periodontal e que a IL-15 produzida pelo HGF sustenta a IL-2-mediated siganlin no HGF.
- Rikimaru et al., 2009 [45]
- Para investigar a relação entre ET-1 e IL-1 β e procurar verificar se o ET-1 expresso em tecido gengival inflamado poderia regular a produção de IL-1 β em células epiteliais e fibroblastos a partir de tecido gengival.
- O ET-1 está envolvido na regulação da expressão da IL-1 β nos tecidos gengivais.
- Sliepen et al., 2009 [24]
- Investigar os efeitos de espécies benéficas, comensal e patogênicas na produção de Aggregatibacter actinomycetemcomitans - induzida
- As espécies bacterianas podem influenciar as respostas inflamatórias das células hospedeiras desencadeadas pela infecção com A. actinomycetemcomitans.

Wassenaar et al., 1997 [52]	interleukin-8 (IL-8) por células humanas. Investigar se fibroblastos gengivais adquirem a capacidade de realizar funções restritas MHC classe II, tais como apresentação de antígenos às células T locais.	quantidades de produção de IL-8 nos fibroblastos HGF-1 do que nas células epiteliais HOK-18 ^a , o oposto foi verdadeiro para as bactérias comensal e benéficas. Os fibroblastos gengivais tratados com IFN foram capazes de funcionar como células de apresentação de antígenos (APC) para a proliferação de células T superantigênicas. Entretanto, esses fibroblastos não apresentaram antígenos de células inteiras de bactérias associadas à periodontite.	Os fibroblastos gengivais desempenham um papel importante na resposta imunológica específica local em lesões periodontais inflamatórias crônicas, regulando a resposta das células T infiltrantes.
--------------------------------	---	--	--

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos avaliados mostraram que os FG aumentaram a expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, COX-2, RANKL, CSF-1 e IL-34 ao serem desafiados por biofilmes periodontopatogênicos.

Como uma síntese da atuação desses mediadores destacamos que a IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória e é associada ao aumento da gravidade da doença periodontal por sua associação com a perda de inserção clínica. A COX-2 é um mediador inflamatório associado a síntese de PGE-2, que é altamente relacionada a reabsorção óssea. Já o sistema de osteonecrose RANK/RANKL/OPG tem extrema importância para a homeostase óssea. Quando a proteína RANK se liga ao receptor RANKL ocorre a estimulação da osteoclastogênese e promoção da reabsorção óssea, já quando ocorre a interação entre RANK e o receptor OPG ocorre o estímulo à formação óssea. O equilíbrio desse sistema foi alterado na presença de biofilme subgengival. O aumento da expressão do RANKL pelos FG quando expostos ao desafio microbiano periodontopatogênico demonstra o estímulo à reabsorção óssea que os FG podem causar. Já o CSF-1 e a IL-34 em níveis aumentados estimularam a função macrofágica na periodontite.

Além disso, demonstrou-se que os biofilmes de modelo *in vitro* considerados subgengivais e os presentes em pacientes com doença periodontal apresentaram maior potencial de virulência já que estimularam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, que levou a maior perda óssea, do que os grupos controles e os biofilmes compatíveis com saúde periodontal.

Os modelos de biofilme *in vitro* utilizados incluíram entre seis e 14 espécies bacterianas, que são números muito inferiores à diversidade bacteriana encontrada em sítios periodontais *in vivo*, porém foram utilizadas espécies bacterianas compatíveis com saúde e com doença periodontal, buscando-se uma coagregação e, conseqüentemente, uma resposta imunológica semelhante ao que ocorre *in vivo*. As vantagens de se usar modelos de biofilme *in vitro* incluíram maior controle de variáveis associadas ao biofilme dental, melhor homogeneização dos estudos, além da possibilidade de repetição com biofilmes idênticos.

A busca bibliográfica foi realizada em 05 de agosto de 2021. Artigos duplicados entre as bases de dados foram identificados e removidos por meio da utilização da ferramenta EndNote Web (Clarivate Analytics, USA). Não foi realizada busca na literatura cinzenta, pois optou pela inclusão somente de artigos indexados nas bases de dados com critérios reconhecidos.

A falta de protocolos definidos para realização de revisões sistemáticas de estudos *in vitro* levou à busca por ferramentas que pudessem com a menor quantidade de adaptações possível ser empregadas neste tipo de estudo. Após extensiva análise de protocolos direcionados em sua maioria para estudos clínicos o protocolo do Joanna Briggs Institute para Estudos de Métodos Mistos (JBI Global) foi o escolhido para a realização da revisão sistemática, com a intenção principal de combinar dados de estudos primários, para se criar uma evidência com maior amplitude e profundidade. Já para análise do risco de viés a ferramenta ROBINS-I da Cochrane (STERNE et al., 2016) foi escolhido pela possibilidade de com poucas adaptações garantir que os estudos não tivessem um risco de viés superestimado. Dessa forma o uso adaptado das duas ferramentas pode ser um novo protocolo para realização de revisões sistemáticas de estudo *in vitro*.

6 REFERÊNCIAS

ALBIGER B, DAHLBERG S, HENRIQUES-NORMARK B, NORMARK S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Intern Med.** 2007 Jun;261(6):511-28. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01821.x. PMID: 17547708.

ALEKSANDRA NIELSEN A, NEDERBY NIELSEN J, SCHMEDES A, BRANDSLUND I, HEY H. Saliva Interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol.** 2005 Dec;40(12):1444-8. doi: 10.1080/00365520510023774. PMID: 16316893.

ARANCIBIA, R. et al. Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. **J. Periodontol.** 2013, 84, 683–693

ARIRACHAKARAN P, APINHASMIT W, PAUNGMALIT P, JERAMETHAKUL P, RERKYEN P, MAHANONDA R. Infection of human gingival fibroblasts with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. **Arch Oral Biol.** 2012 Jul;57(7):964-72. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.01.014. Epub 2012 Feb 19. PMID: 22348592.

BAO K, PAPADIMITROPOULOS A, AKGÜL B, BELIBASAKIS GN, BOSTANCI N. Establishment of an oral infection model resembling the periodontal pocket in a perfusion bioreactor system. **Virulence.** 2015;6(3):265-73. doi: 10.4161/21505594.2014.978721. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25587671; PMCID: PMC4601317.

BARTOLD PM, WALSH LJ, NARAYANAN AS. Molecular and cell biology of the gingiva. **Periodontol 2000.** 2000 Oct;24:28-55. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240103.x. PMID: 11276872.

BASSO, F. G. et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing. **J. Periodontol.** 2016, 87, 990–996

BELIBASAKIS GN, BOSTANCI N, REDDI D. Regulation of protease-activated receptor-2 expression in gingival fibroblasts and Jurkat T cells by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell Biol Int.** 2010 Feb 5;34(3):287-92. doi: 10.1042/CBI20090290. PMID: 19947912.

BELIBASAKIS GN, GUGGENHEIM B. Induction of prostaglandin E(2) and interleukin-6 in gingival fibroblasts by oral biofilms. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2011 Dec;63(3):381-6. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00863.x. Epub 2011 Oct 4. PMID: 22092565.

BELIBASAKIS GN, MEIER A, GUGGENHEIM B, BOSTANCI N. The RANKL-OPG system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants. **Cytokine.** 2011 Jul;55(1):98-103. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.009. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21474331.

BELIBASAKIS GN, BAO K, BOSTANCI N. Transcriptional profiling of human gingival fibroblasts in response to multi-species in vitro subgingival biofilms. **Mol Oral Microbiol.** 2014 Aug;29(4):174-83. doi: 10.1111/omi.12053. Epub 2014 May 13. PMID: 24758474.

BEN-SASSON, S. Z. et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 2009 106, 7119–7124

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. **Nature.** 2006 441, 235–238

BIRKEDAL-HANSEN H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol** 1993; 64: 474–484.

BORDIN S, PAGE RC, NARAYANAN AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: Isolation and characterization of one phenotype. **Science** 1984; 223: 171–173.

BOSTANCI N, MEIER A, GUGGENHEIM B, BELIBASAKIS GN. Regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasome gene expression levels in gingival fibroblasts by oral biofilms. **Cell Immunol.** 2011;270(1):88-93. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.04.002. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21550598.

BOSTRÖM EA, KINDSTEDT E, SULNIUTE R, PALMQVIST P, MAJSTER M, HOLM CK, ZWICKER S, CLARK R, ÖNELL S, JOHANSSON I, LERNER UH, LUNDBERG P. Increased Eotaxin and MCP-1 Levels in Serum from Individuals with Periodontitis and in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Pro-Inflammatory Cytokines. **PLoS One.** 2015 Aug 4;10(8):e0134608. doi: 10.1371/journal.pone.0134608. PMID: 26241961; PMCID: PMC4524692.

BRENNER, D., BLASER, H. & MAK, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nat. Rev. Immunol.** 2015 15, 362–374

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. doi: 10.1111/jcpe.12935. PMID: 29926489.

CEKICI, A., KANTARCI, A., HASTURK, H., & VAN DYKE, T. E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000.** 2014 64(1), 57–80.

CLARK R, ZWICKER S, BUREIK D, JOHANNSSEN G, BOSTRÖM EA. Expression of colony-stimulating factor 1 and interleukin-34 in gingival tissue and gingival fibroblasts from periodontitis patients and controls. **J Periodontol.** 2020 Jun;91(6):828-835. doi: 10.1002/JPER.19-0296. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31682007.

CHIQUET M, KATSAROS C, KLETSAS D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. **Periodontol 2000.** 2015 Jun;68(1):21-40. doi: 10.1111/prd.12076. PMID: 25867977.

COLOMBO G, CLERICI M, GIUSTARINI D, et al. Pathophysiology of tobacco smoke exposure: recent insights from comparative and redox proteomics. **Mass Spectrom Rev** 2014; 33:183-218

DEWHIRST FE, CHEN T, IZARD J, PASTER BJ, TANNER AC, YU WH, LAKSHMANAN A, WADE WG. The human oral microbiome. **J Bacteriol.** 2010 Oct;192(19):5002-17. doi: 10.1128/JB.00542-10. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20656903; PMCID: PMC2944498.

DINARELLO CA. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol.** 2007 Nov;37 Suppl 1(Suppl 1):S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772. PMID: 17972343; PMCID: PMC3140102.

DUHEN, T., GEIGER, R., JARROSSAY, D., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. **Nat. Immunol.** 2009 10, 857–863

DUTZAN N, KAJIKAWA T, ABUSLEME L, GREENWELL-WILD T, ZUAZO CE, IKEUCHI T, BRENCHLEY L, ABE T, HURABIELLE C, MARTIN D, MORELL RJ, FREEMAN AF, LAZAREVIC V, TRINCHIERI G, DIAZ PI, HOLLAND SM, BELKAID Y, HAJISHENGALLIS G, MOUTSOPOULOS NM. A dysbiotic microbiome triggers T_H17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. **Sci Transl Med.** 2018 Oct 17;10(463):eaat0797. doi: 10.1126/scitranslmed.aat0797. PMID: 30333238; PMCID: PMC6330016.

EBERSOLE, J. L. et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** 2014. 41, 853–861

EL-AWADY AR, LAPP CA, GAMAL AY, SHARAWY MM, WENGER KH, CUTLER CW, MESSER RL. Human periodontal ligament fibroblast responses to compression in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2013 Jul;40(7):661-71. doi: 10.1111/jcpe.12100. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23560813.

EL-AWADY AR, MESSER RL, GAMAL AY, SHARAWY MM, WENGER KH, LAPP CA. Periodontal ligament fibroblasts sustain destructive immune modulators of chronic periodontitis. **J Periodontol.** 2010 Sep;81(9):1324-35. doi: 10.1902/jop.2010.100054. PMID: 20450375.

FITZSIMMONS TR, GE S, BARTOLD PM. Compromised inflammatory cytokine response to *P. gingivalis* LPS by fibroblasts from inflamed human gingiva. **Clin Oral Investig.** 2018 Mar;22(2):919-927. doi: 10.1007/s00784-017-2171-6. Epub 2017 Jul 8. PMID: 28689365.

FUJIHARA, R. et al. Tumor necrosis factor- α enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. **J. Periodontal Res.** 2014, 49, 508–517

GANDINI S, BOTTERI E, IODICE S, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. **Int J Cancer** 2008; 122:155-64

GIULIETTI F, FILIPPONI A, ROSETTANI G, et al. Pharmacological approach to smoking cessation: an updated review for daily clinical practice. **High Blood Press Cardiovasc Prev** 2020;23:1–14.

GLASTONBURY CM. Head and Neck Squamous Cell Cancer: Approach to Staging and Surveillance. 2020 Feb 15. In: Hodler J, Kubik-Huch RA, von Schulthess GK, editors. *Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023: Diagnostic Imaging* [Internet]. **Cham (CH): Springer**; 2020. Chapter 17. PMID: 32119254.

GRIFFEN AL, BEALL CJ, FIRESTONE ND, GROSS EL, DIFRANCO JM, HARDMAN JH, VRIESENDORP B, FAUST RA, JANIES DA, LEYS EJ. CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. **PLoS One**. 2011 Apr 22;6(4):e19051. doi: 10.1371/journal.pone.0019051. PMID: 21544197; PMCID: PMC3081323.

GRIFFEN AL, BEALL CJ, CAMPBELL JH, FIRESTONE ND, KUMAR PS, YANG ZK, PODAR M, LEYS EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. **ISME J**. 2012 Jun;6(6):1176-85. doi: 10.1038/ismej.2011.191. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22170420; PMCID: PMC3358035.

GROENEVELD MC, EVERTS V, BEERTSEN W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. **J Dent Res**. 1994 Oct;73(10):1588-92. doi: 10.1177/00220345940730100201. PMID: 7929972.

HAJISHENGALLIS G, LAMONT RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol Oral Microbiol**. 2012 Dec;27(6):409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x. Epub 2012 Sep 3. PMID: 23134607; PMCID: PMC3653317.

HAJISHENGALLIS G, KOROSTOFF JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontol 2000**. 2017 Oct;75(1):116-151. doi: 10.1111/prd.12181. PMID: 28758305; PMCID: PMC5539911.

HÄKKINEN L, UITTO VJ, LARJAVA H. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontol 2000**. 2000; 24: 127–52.

HASSELL TM, STANEK EJ. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. **Arch Oral Biol** 1983; 28: 617–625.

HELAL O, GËOSTEMEYER G, KROIS J, FAWZY EL SAYED K, GRAETZ C, SCHWENDICKE F. Predictors for tooth loss in periodontitis patients: Systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol** 2019;46:699–712.

HERRERO ER, FERNANDES S, VERSPECHT T, UGARTE-BERZAL E, BOON N, PROOST P, BERNAERTS K, QUIRYNEN M, TEUGHEL W. Dysbiotic Biofilms Deregulate the Periodontal Inflammatory Response. **J Dent Res**. 2018 May;97(5):547-555. doi: 10.1177/0022034517752675. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29394879.

HIGASHI Y, GOTO C, JITSUIKI D, UMEMURA T, NISHIOKA K, HIDAKA T, TAKEMOTO H, NAKAMURA S, SOGA J, CHAYAMA K, YOSHIZUMI M, TAGUCHI A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**. 2008 Feb;51(2):446-53. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101535. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18039979.

HIGASHI Y, GOTO C, HIDAKA T, SOGA J, NAKAMURA S, FUJII Y, HATA T, IDEI N, FUJIMURA N, CHAYAMA K, KIHARA Y, TAGUCHI A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**. 2009 Oct;206(2):604-10. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.037. Epub 2009 Apr 5. PMID: 19410250.

INOUE G, ROSA EF, GOMES EF, et al. Predictors of smoking cessation in smokers with chronic periodontitis: a 24-month study. **Braz Oral Res** 2016;30:e98.

JAEDICKE KM, PRESHAW PM, TAYLOR JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. **Periodontol** 2000. 2016 Feb;70(1):164-83. doi: 10.1111/prd.12117. PMID: 26662489.

JANG J, HUR HG, SADOWSKY MJ, BYAPPANAHALLI MN, YAN T, ISHII S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. **J Appl Microbiol**. 2017 Sep;123(3):570-581. doi: 10.1111/jam.13468. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28383815.

JBI-GLOBAL-WIKI.REFINED.SITE, 2022, <https://jbi-global-wiki.refined.site/space/MANUAL/3318284340/8.1+Introduction+to+mixed+methods+systematic+reviews>.

JEPSEN S, CATON JG, ALBANDAR JM, BISSADA NF, BOUCHARD P, CORTELLINI P, DEMIREL K, DE SANCTIS M, ERCOLI C, FAN J, GEURS NC, HUGHES FJ, JIN L, KANTARCI A, LALLA E, MADIANOS PN, MATTHEWS D, MCGUIRE MK, MILLS MP, PRESHAW PM, REYNOLDS MA, SCULEAN A, SUSIN C, WEST NX, YAMAZAKI K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**. 2018 Jun;89 Suppl 1:S237-S248. doi: 10.1002/JPER.17-0733. PMID: 29926943.

KAMADA N, SEO SU, CHEN GY, NÚÑEZ G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**. 2013 May;13(5):321-35. doi: 10.1038/nri3430. PMID: 23618829.

KARAA A, GOLDSTEIN A. The spectrum of clinical presentation, diagnosis, and management of mitochondrial forms of diabetes. **Pediatr Diabetes**. 2015 Feb;16(1):1-9. doi: 10.1111/pedi.12223. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25330715.

KAWAI, T. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am. J. Pathol**. 2006, 169, 987–998

KINANE DF, PETERSON M, STATHOPOULOU PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. **Periodontol** 2000. 2006;40:107-19. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00136.x. PMID: 16398688.

KINANE DF, PRESHAW PM, LOOS BG; Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology.

J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:44-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01682.x. PMID: 21323703.

KOLENBRANDER, P.E. AND LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol.** 1993, 175: 3247–3252

LAMONT RJ, KOO H, HAJISHENGALLIS G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nat Rev Microbiol.** 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. PMID: 30301974; PMCID: PMC6278837.

LAVU, V. et al. Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis: a genetic association study. **Genet. Test. Mol. Biomark.** 2015 19, 175–181

LEITE FRM, NASCIMENTO GG, SCHEUTZ F, et al. Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. **Am J Prev Med** 2018;54:831–41.

MARK WELCH JL, ROSSETTI BJ, RIEKEN CW, DEWHIRST FE, BORISY GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2016 Feb 9;113(6):E791-800. doi: 10.1073/pnas.1522149113. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26811460; PMCID: PMC4760785.

MARSH, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health.** 2006 6(Suppl 1): S14.

MARSH, P.D. AND DEVINE, D.A. How is the development of dental biofilms influenced by the host? **J Clin Periodontol.** 2011 38(Suppl 11): 28–35.

MCCAULEY LK, NOHUTCU RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol.** 2002 Nov;73(11):1377-91. doi: 10.1902/jop.2002.73.11.1377. PMID: 12479643.

MCCULLOCH CAG, BORDIN S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. **J Periodontal Res** 1991; 26: 144–154.

MEALEY B L, OCAMPO G L. Diabetes mellitus and periodontal disease. **Periodontol 2000** 2007; 44: 127–153

MOREIRA PR, LIMA PM, SATHLER KO, IMANISHI SA, COSTA JE, GOMES RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Clin Exp Immunol.** 2007 Apr;148(1):119-26. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03327.x. PMID: 17286759; PMCID: PMC1868861.

MOUSOPOULOS, N. M. & KONKEL, J. E. Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier. **Trends Immunol.** 2018, 39, 276–287

NARUISHI K, NAGATA T. Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. **J Cell Physiol.** 2018 Sep;233(9):6393-6400. doi: 10.1002/jcp.26521. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29574949.

NG YL, MANN V, RAHBARAN S, LEWSEY J, GULABIVALA K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. **Int Endod J.** 2007 Dec;40(12):921-39. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01322.x. Epub 2007 Oct 10. PMID: 17931389.

NOCITI JR FH, CASATI MZ, DUARTE PM. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. **Periodontol 2000** 2015;67:187–210.

OFFENBACHER S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann Periodontol.** 1996 Nov;1(1):821-78. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.821. PMID: 9118282.

OVERALL CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. **Ann N Y Acad Sci** 1994;732: 51–64.

OZAWA A, TADA H, TAMAI R, UEHARA A, WATANABE K, YAMAGUCHI T, SHIMAUCHI H, TAKADA H, SUGAWARA S. Expression of IL-2 receptor beta and gamma chains by human gingival fibroblasts and up-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2. **J Leukoc Biol.** 2003 Sep;74(3):352-9. doi: 10.1189/jlb.0103044. PMID: 12949238.

PAN, W. et al. Traumatic occlusion aggravates bone loss during periodontitis and activates Hippo-YAP pathway. **J. Clin. Periodontol.** 2019 46, 438–447

PAN, W. et al. Inhibition of Ctsk alleviates periodontitis and comorbid rheumatoid arthritis via downregulation of the TLR9 signalling pathway. **J. Clin. Periodontol.** 2019 46, 286–296

PAPAPANOU PN, SANZ M, BUDUNELI N. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Clin Periodontol** 2018;45:S162–70.

PLOTNIKOFF GA, RILEY D. The human microbiome. **Glob Adv Health Med.** 2014 May;3(3):4-5. doi: 10.7453/gahmj.2014.023. PMID: 24891987; PMCID: PMC4030613.

PRESHAW PM, BISSETT SM. Periodontitis and diabetes. **Br Dent J.** 2019 Oct;227(7):577-584. doi: 10.1038/s41415-019-0794-5. PMID: 31605062.

RAVIDÄA A, TROIANO G, QAZI M, et al. Dose-dependent effect of smoking and smoking cessation on periodontitis-related tooth loss during 10-47 years periodontal maintenance – A retrospective study in compliant cohort. **J Clin Periodontol** 2020; 47:1132-43

RIKIMARU T, AWANO S, MINEOKA T, YOSHIDA A, ANSAI T, TAKEHARA T. Relationship between endothelin-1 and interleukin-1beta in inflamed periodontal tissues. **Biomed Res.** 2009 Dec;30(6):349-55. doi: 10.2220/biomedres.30.349. PMID: 20051644.

SANTOS-LIMA, E. K. N. et al. Production of interferon gamma, interleukin 6 and interleukin 1 β by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with novel Lys-gingipain synthetic peptides. **J. Periodontol.** 2019. 1, 1–12

SCHOR SL, ELLIS I, IRWIN CR, BANYARD J, SENEVIRATNE K, DOLMAN C, GILBERT AD, CHISHOLM DM. Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts:

characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. **Oral Dis** 1996; 2: 155–166.

SLIEPEN I, VAN DAMME J, VAN ESSCHE M, LOOZEN G, QUIRYNEN M, TEUGHEL W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. **J Dent Res.** 2009 Nov;88(11):1026-30. doi: 10.1177/0022034509347296. PMID: 19828891.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.** 1998 Feb;25(2):134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x. PMID: 9495612.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD (2002). Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**; 2002. 28:12-55

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000.** 2005;38:135-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x. PMID: 15853940.

STERNE JAC, HERNÁN MA, REEVES BC, SAVOVIĆ J, BERKMAN ND, VISWANATHAN M, HENRY D, ALTMAN DG, ANSARI MT, BOUTRON I, CARPENTER JR, CHAN AW, CHURCHILL R, DEEKS JJ, HRÓBJARTSSON A, KIRKHAM J, JÜNI P, LOKE YK, PIGOTT TD, RAMSAY CR, REGIDOR D, ROTHSTEIN HR, SANDHU L, SANTAGUIDA PL, SCHÜNEMANN HJ, SHEA B, SHRIER I, TUGWELL P, TURNER L, VALENTINE JC, WADDINGTON H, WATERS E, WELLS GA, WHITING PF, HIGGINS JPT. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomized studies of interventions. **BMJ** 2016; 355; i4919; doi: 10.1136/bmj.i4919.

TAKEUCHI M, HAMANA K, HIRAISHI A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2001 Jul;51(Pt 4):1405-17. doi: 10.1099/00207713-51-4-1405. PMID: 11491340.

TEN CATE AR, DEPORTER DA. The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. **Anat** 1975; 182: 1–13.

TERHEYDEN H, STADLINGER B, SANZ M, GARBE AI, MEYLE J. Inflammatory reaction - communication of cells. **Clin Oral Implants Res.** 2014 Apr;25(4):399-407. doi: 10.1111/clr.12176. Epub 2013 Apr 21. PMID: 23600659.

TELES, R., SAKELLARI, D., TELES, F., KONSTANTINIDIS, A., KENT, R., SOCRANSKY, S., et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. **Journal of Periodontology.** 2010, 81(1), 89–98.

TELES, R., MOSS, K., PREISSER, J. S., GENCO, R., GIANNOBILE, W. V., CORBY, P., et al. Patterns of periodontal disease progression based on linear mixed models of clinical attachment loss. **Journal of Clinical Periodontology.** 2018, 45(1), 15–25.

THOMSON, W. M., BROADBENT, J. M., POULTON, R., & BECK, J. D. Changes in periodontal disease experience from 26 to 32 years of age in a birth cohort. **Journal of Periodontology.** 2006, 77(6), 947–954.

TRAN L, TAM DNH, ELSHAFAY A, DANG T, HIRAYAMA K, HUY NT. Quality assessment tools used in systematic reviews of in vitro studies: A systematic review. **BMC Med Res Methodol**. 2021 May 8;21(1):101. doi: 10.1186/s12874-021-01295-w. PMID: 33964880; PMCID: PMC8106836.

VAN DYKE TE. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. **J Periodontol**. 2020 Oct;91 Suppl 1(Suppl 1):S19-S25. doi: 10.1002/JPER.20-0088. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32441774; PMCID: PMC8142079.

VAN DYKE TE, BARTOLD PM, REYNOLDS EC. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. **Front Immunol**. 2020 Mar 31;11:511. doi: 10.3389/fimmu.2020.00511. PMID: 32296429; PMCID: PMC7136396.

WASSENAAR A, SNIJDERS A, ABRAHAM-INPIJN L, KAPSENBERG ML, KIEVITS F. Antigen-presenting properties of gingival fibroblasts in chronic adult periodontitis. **Clin Exp Immunol**. 1997 Nov;110(2):277-84. doi: 10.1111/j.1365-2249.1997.tb08328.x. PMID: 9367413; PMCID: PMC2265508.

YAMAMOTO A, CREMONA ML, ROTHMAN JE. Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. **J Cell Biol**. 2006 Feb 27;172(5):719-31. doi: 10.1083/jcb.200510065. PMID: 16505167; PMCID: PMC2063704.

ZEKERIDOU, A., MOMBELLI, A., CANCELA, J., COURVOISIER, D. & GIANNOPOULOU, C. Systemic inflammatory burden and local inflammation in periodontitis: what is the link between inflammatory biomarkers in serum and gingival crevicular fluid? **Clin. Exp. Dent. Res**. 2019 24, 128–135

ZENG MY, INOHARA N, NUÑEZ G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunol**. 2017 Jan;10(1):18-26. doi: 10.1038/mi.2016.75. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27554295; PMCID: PMC5788567.

ZHANG S, YU N, ARCE RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. **Periodontol 2000**. 2020 Feb;82(1):129-142. doi: 10.1111/prd.12267. PMID: 31850627; PMCID: PMC6924568.

ZHOU, L. N. et al. Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease. **Oral. Dis**. 2019 25, 265–273

APÉNDICE 1 – TEMPLATE ROBINS-I

5.1 RISK OF BIAS ASSESSMENT

Responses underlined in green are potential markers for low risk of bias, and responses in **red** are potential markers for a risk of bias. Where questions relate only to sign posts to other questions, no formatting is used.

Signalling questions	Description	Response options
<p>Bias due to confounding</p> <p>1.1 Is there potential for confounding of the effect of intervention in this study? If <u>N/PN</u> to 1.1: the study can be considered to be at low risk of bias due to confounding and no further signalling questions need be considered If <u>Y/PY</u> to 1.1: determine whether there is a need to assess time-varying confounding:</p> <p>1.2. Was the analysis based on splitting participants' follow up time according to intervention received? If <u>N/PN</u>, answer questions relating to baseline confounding (1.4 to 1.6) If <u>Y/PY</u>, go to question 1.3.</p> <p>1.3. Were intervention discontinuations or switches likely to be related to factors that are prognostic for the outcome? If <u>N/PN</u>, answer questions relating to baseline confounding (1.4 to 1.6) If <u>Y/PY</u>, answer questions relating to both baseline and time-varying confounding (1.7 and 1.8)</p>		<p>Y / PY / <u>PN / N</u></p> <p>NA / Y / PY / PN / N / NI</p> <p>NA / Y / PY / PN / N / NI</p>

Questions relating to baseline confounding only

1.4. Did the authors use an appropriate analysis method that controlled for all the important confounding domains?	NA / <u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI
1.5. If <u>Y/PY</u> to 1.4: Were confounding domains that were controlled for measured validly and reliably by the variables available in this study?	NA / <u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI
1.6. Did the authors control for any post-intervention variables that could have been affected by the intervention?	NA / <u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI
Questions relating to baseline and time-varying confounding	
1.7. Did the authors use an appropriate analysis method that controlled for all the important confounding domains and for time-varying confounding?	NA / <u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI
1.8. If <u>Y/PY</u> to 1.7: Were confounding domains that were controlled for measured validly and reliably by the variables available in this study?	NA / <u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI
Risk of bias judgement	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
Optional: What is the predicted direction of bias due to confounding?	Favours experimental / Favours comparator / Unpredictable
Bias in selection of participants into the study	
2.1. Was selection of participants into the study (or into the analysis) based on participant characteristics observed after the start of intervention? If <u>N/PN</u> to 2.1: go to 2.4	<u>Y / PY</u> / <u>PN / N</u> / NI

<p>2.2. If Y/PY to 2.1: Were the post-intervention variables that influenced selection likely to be associated with intervention? 2.3 If Y/PY to 2.2: Were the post-intervention variables that influenced selection likely to be influenced by the outcome or a cause of the outcome?</p>	<p>NA / Y / PY / <u>PN / N</u> / NI NA / Y / PY / <u>PN / N</u> / NI</p>
<p>2.4. Do start of follow-up and start of intervention coincide for most participants?</p>	<p><u>Y / PY</u> / PN / N / NI</p>
<p>2.5. If Y/PY to 2.2 and 2.3, or N/PN to 2.4: Were adjustment techniques used that are likely to correct for the presence of selection biases? Risk of bias judgement</p>	<p>NA / <u>Y / PY</u> / PN / N / NI</p>
<p>Optional: What is the predicted direction of bias due to selection of participants into the study?</p>	<p>Low / Moderate / Serious / Critical / NI Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable</p>
<p>Bias in classification of interventions</p>	
<p>3.1 Were intervention groups clearly defined?</p>	<p><u>Y / PY</u> / PN / N / NI</p>
<p>3.2 Was the information used to define intervention groups recorded at the start of the intervention?</p>	<p><u>Y / PY</u> / PN / N / NI</p>
<p>3.3 Could classification of intervention status have been affected by knowledge of the outcome or risk of the outcome? Risk of bias judgement</p>	<p>Y / PY / <u>PN / N</u> / NI</p>
<p>Optional: What is the predicted direction of bias due to classification of interventions?</p>	<p>Low / Moderate / Serious / Critical / NI Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable</p>

Bias due to deviations from intended interventions		
If your aim for this study is to assess the effect of assignment to intervention, answer questions 4.1 and 4.2		
4.1. Were there deviations from the intended intervention beyond what would be expected in usual practice?		Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
4.2. If Y/PY to 4.1: Were these deviations from intended intervention unbalanced between groups <i>and</i> likely to have affected the outcome?		NA / Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
If your aim for this study is to assess the effect of starting and adhering to intervention, answer questions 4.3 to 4.6		
4.3. Were important co-interventions balanced across intervention groups?		<u>Y / PY</u> / PN / N / NI
4.4. Was the intervention implemented successfully for most participants?		<u>Y / PY</u> / PN / N / NI
4.5. Did study participants adhere to the assigned intervention regimen?		<u>Y / PY</u> / PN / N / NI
4.6. If N/PN to 4.3, 4.4 or 4.5: Was an appropriate analysis used to estimate the effect of starting and adhering to the intervention?		NA / <u>Y / PY</u> / PN / N / NI
Risk of bias judgement		Low / Moderate / Serious / Critical / NI
Optional: What is the predicted direction of bias due to deviations from the intended interventions?		Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable
Bias due to missing data		
5.1 Were outcome data available for all, or nearly all, participants?		<u>Y / PY</u> / PN / N / NI
5.2 Were participants excluded due to missing data on intervention status?		Y / PY / <u>PN / N</u> / NI

5.3 Were participants excluded due to missing data on other variables needed for the analysis?	Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
5.4 If PN/N to 5.1, or Y/PY to 5.2 or 5.3: Are the proportion of participants and reasons for missing data similar across interventions?	NA / <u>Y / PY</u> / PN / N / NI
5.5 If PN/N to 5.1, or Y/PY to 5.2 or 5.3: Is there evidence that results were robust to the presence of missing data?	NA / <u>Y / PY</u> / PN / N / NI
Risk of bias judgement	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
Optional: What is the predicted direction of bias due to missing data?	Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable

Bias in measurement of outcomes	
6.1 Could the outcome measure have been influenced by knowledge of the intervention received?	Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
6.2 Were outcome assessors aware of the intervention received by study participants?	Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
6.3 Were the methods of outcome assessment comparable across intervention groups?	<u>Y / PY</u> / PN / N / NI
6.4 Were any systematic errors in measurement of the outcome related to intervention received?	Y / PY / <u>PN / N</u> / NI
Risk of bias judgement	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
Optional: What is the predicted direction of bias due to measurement of outcomes?	Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable

Bias in selection of the reported result

<p>Is the reported effect estimate likely to be selected, on the basis of the results, from...</p> <p>7.1 ... multiple outcome <i>measurements</i> within the outcome domain?</p> <p>7.2 ... multiple <i>analyses</i> of the intervention-outcome relationship?</p> <p>7.3 ... different <i>subgroups</i>?</p> <p>Risk of bias judgement</p> <p>Optional: What is the predicted direction of bias due to selection of the reported result?</p>		<p>Y / PY / <u>PN</u> / N / NI</p> <p>Y / PY / <u>PN</u> / N / NI</p> <p>Y / PY / <u>PN</u> / N / NI</p> <p>Low / Moderate / Serious / Critical / NI</p> <p>Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable</p>
Overall bias		
<p>Risk of bias judgement</p> <p>Optional: What is the overall predicted direction of bias for this outcome?</p>		<p>Low / Moderate / Serious / Critical / NI</p> <p>Favours experimental / Favours comparator / Towards null / Away from null / Unpredictable</p>

APÊNDICE 2 – GUIDE FOR AUTHORS: JAPANESE DENTAL SCIENCE REVIEW

MANUSCRIPT FORMAT

Title page: Please provide the following data on the title page (in the order given).

1) *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid abbreviations and formulae where possible.

2) *Author names and affiliations.* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

3) *Corresponding author.* Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

4) *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a “*Present address* (or “*Permanent address*”) may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

5) *Running title.* An abbreviated title (within 10 words) for use as a running title.

6) *Scientific field of dental Science:* Indicate specialized field of dental science which your paper is involving.

7) *Article type:* Indicate article type such as “Review Article”, “Letter to Editors”.

MAIN TEXT

Review Article: Reviews may concern either clinical or laboratory scientific topics. Standard length of review article is between 3,000 and 6,500 words excluding references.

Letters to the Editor. These should be up to 600 words in length, and should be submitted in response to material published in the journal to make small clinical points or to introduce a point of view. They can be accompanied by up to 5 references but no illustrations. Letters do not carry an abstract.

Abbreviations: Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Subdivision of the article: Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, etc.), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Conflict of interest: All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing ↗ .

Role of the funding source: All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Acknowledgements: All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Figures: Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Figure legends should be listed on separate page. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

Tables: Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

REFERENCES:

References to literature must be indicated by Arabic numerals in square parentheses which run consecutively through the paper. Where a reference is cited more than once in the text the same number should be used each time. Reference style should follow the "Vancouver" style described in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals." Update October 2007. Further information can be found at www.icmje.org. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus.