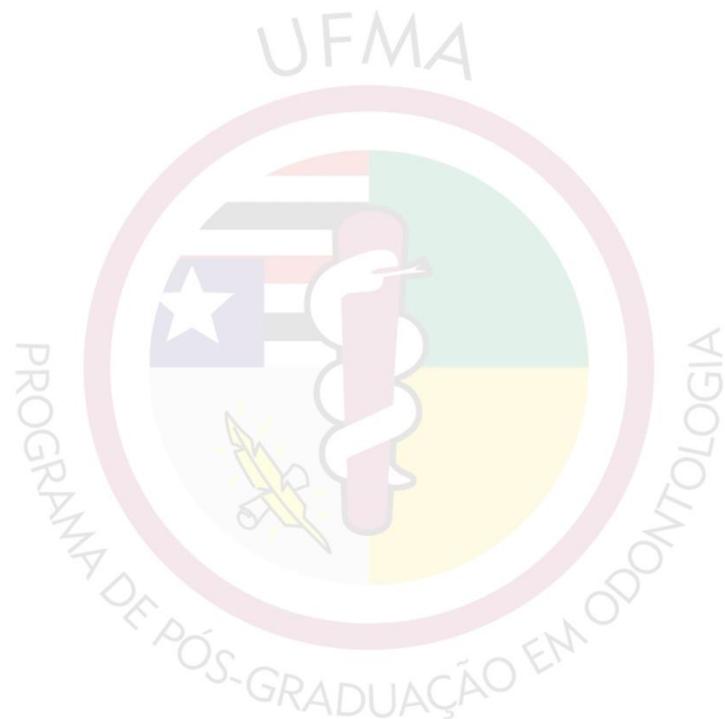




UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO



**ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES
SALIVARES EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA OU
TRAÇO FALCIFORME ESTÃO ASSOCIADAS ÀS
DOENÇAS PERIODONTAIS?**



SÃO LUÍS - MA

2018

HALINNA LARISSA CRUZ CORREIA DE CARVALHO BUONOCORE

**ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES SALIVARES EM INDIVÍDUOS COM
ANEMIA OU TRAÇO FALCIFORME ESTÃO ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS
PERIODONTAIS?**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Soraia de Fátima Carvalho Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Salles Branco de Almeida

SÃO LUÍS -MA

2018

Carvalho-Buonocore, Halinna Larissa Cruz Correia de

Alterações em biomarcadores salivares em indivíduos com Anemia ou Traço Falciforme estão associadas às doenças periodontais?/ Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho Buonocore. – São Luís, 2018.

79f.

Orientadora: Soraia de Fátima Carvalho Souza

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2018.

1. Anemia Falciforme 2. Traço falciforme 3. Doença periodontais 4. Citocinas 5. Inflamação 6. Saliva I. Título

CDU

HALINNA LARISSA CRUZ CORREIA DE CARVALHO BUONOCORE

ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES SALIVARES EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA OU TRAÇO FALCIFORME ESTÃO ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS PERIODONTAIS?

A Comissão julgadora da defesa de Doutorado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia 27/02/2018, considerou a candidata:

() APROVADA

() REPROVADA

- 1) Examinadora: Prof^a. Dr^a. Ana Regina Oliveira Moreira
- 2) Examinadora: Prof^a. Dr^a. Adriana de Fátima Vasconcelos Pereira
- 3) Examinadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
- 4) Examinadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Cláudia Costa Ribeiro
- 5) Presidente (Orientadora): Prof^a Dr^a. Soraia de Fátima Carvalho Souza

*A Marlene,
minha mãe,
pela doçura e garra
que inspiram*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMA, pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio e financiamento deste estudo.

À Supervisão de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR), por abrir gentilmente suas portas para a realização deste estudo.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-UFMA), pela concessão de bolsas.

Ao Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão (LIF-UFMA), pelo processamento e análise das amostras de saliva.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por guiar meus caminhos e permitir que eu sonhasse de forma tão grandiosa para realizar esse estudo.

À minha orientadora, Profª Drª Soraia de Fátima Carvalho Souza, pela dedicação, coragem, sabedoria, generosidade e confiança em mim depositada. Muito obrigada pela oportunidade de crescer sob seu olhar atencioso.

À Prof Érika Thomaz, pela solicitude, paciência e carinho de sempre. Professora, estar com a senhora e tê-la em nossa equipe é sempre um prazer e uma grande oportunidade de aprendizagem.

À Profª Drª Luciana Salles Branco de Almeida, pela generosidade, sabedoria, paciência e sensibilidade.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-UFMA), em especial à Profª. Drª. Cecília Cláudia Costa Ribeiro e ao Prof Dr. Darlon Martins Lima, pelo empenho e dedicação em construir um programa de pós-graduação de qualidade. Sinto-me muito orgulhosa de fazer parte dessa história!

Aos professores que compuseram a banca examinadora: Profª. Drª. Ana Regina Oliveira Moreira, Profª Drª Adriana de Fátima Vasconcelos Pereira, Profª. Drª. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Profª. Drª. Cecília Cláudia Costa Ribeiro, Profª. Drª. Adriana Cutrim de Mendonça Vaz, Profª. Drª. Érika Martins Pereira e Profª. Drª. Cláudia Maria Coelho Alves pela disponibilidade em participar das avaliações e atenção e cuidado na leitura deste trabalho. Agradeço ainda pelas considerações que, com toda certeza, levarão ao engrandecimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão (LIF-UFMA) pelo carinho e acolhimento em todos os momentos. Agradeço em especial a Mayara Cristina Pinto da Silva e Johnny Ramos, amigos queridos que, com paciência e dedicação, me ajudaram no processamento das amostras de saliva, tornando este estudo possível. Obrigada de coração, queridos!

A toda equipe da HEMOMAR, em especial Senhor Hagamenon, Dra. Elizabeth Lima, Dra Noeme, Dra. Mary Anne, Fernanda, Dona Conceição e Senhor Paulo. Obrigada pela generosidade e pelo acolhimento.

A José Yagoh Saraiva Rolim, Camilla de Lima Nascimento e Melina Sá Vieira Costa, alunos de iniciação científica que se tornaram meus irmãos. Meninos, sem a cumplicidade, alto astral e dedicação de vocês, nada disso seria possível. Levo desta caminhada, feita de pequenas batalhas diárias, um carinho enorme por vocês e a certeza de que esta equipe não é feita só de professores e alunos, mas sim de grandes amigos.

À minha mãe, Marlene, por acreditar em meus sonhos e ser meu porto seguro em todos os momentos. Por vibrar com minhas conquistas, me acalantar em meus fracassos e entender, serenamente, meus silêncios e ausências. Por ser a pessoa mais incrível e inspiradora que já conheci. Por ser minha mãe.

À minha família, pelo amor que transborda e me motiva a seguir em frente. Em especial a Dani, minha prima-irmã, pela cumplicidade de sempre e pela oportunidade de amar incondicionalmente Valentina, minha afilhada e uma das partes mais doces de minha vida.

À família Buonocore, pelo apoio e carinho imensuráveis. Em especial a Tia Suely, pela pessoa maravilhosa que é e pelo carinho e cuidado de mãe, e a Bruno, meu marido, pelo companheirismo, cumplicidade, paciência e injeções diárias de motivação. Obrigada por dividir comigo todas as emoções e desafios que esta jornada proporcionou. E, no meio de tudo isso, nossa Larinha veio para consolidar nossa união. Dedico essa vitória a vocês. Juntos, nós três seremos imbatíveis! Amo-os sem medida!

Aos amigos de doutorado, Luana Cantanhede, Mariana Proença e Michael Garcia. Foi muito bom dividir com vocês grandes dificuldades e, melhor ainda, superá-las juntos. Desta experiência só ficarão os momentos de alegria, descontração e muito companheirismo. Sinto-me privilegiada por ter vocês em minha vida e tenho certeza que este ciclo teve, além de tudo, o papel de consolidar nossa amizade. Que seja assim!

Aos amigos, em especial Flávia Paixão, Nayra Vasconcelos, Camila Cavalcante e Vinícius Moreira, pela torcida, pelas vibrações positivas e, sobretudo, pelo amor e amizade. Alguns acompanharam de perto minhas angústias e incertezas. Outros, mesmo que distantes geograficamente, se faziam presentes pelas orações e boas energias que acalentaram meu coração ansioso. A vocês, queridos amigos de longe e de perto, minha gratidão e amizade eternas.

A todos que, junto comigo, sonharam e acreditaram que este “grande sonho” viraria realidade. Como diria Walt Disney, “se você pode sonhar, você pode fazer”. Então, que sejamos capazes de sonhar sempre!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Introdução) - Esquema ilustrativo dos eventos fisiopatológicos cíclicos característicos das doenças falciformes e consequentes repercussões vasculares, levando ao aumento da inflamação.

Figura 2 (Introdução) - Esquema ilustrativo da patogênese da periodontite.

Figura 3 (Introdução) - Esquema ilustrativo da influência do RANK-L e da OPG nas reabsorções ósseas.

Figura 1 (Artigo 1) - Modelo teórico da associação entre Anemia Falciforme (AF) ou Traço Falciforme (TF) e Pe (periodontite), mediada pela ação de biomarcadores salivares agrupados em componentes principais (CP).

Figura 2 (Artigo 1) - Coeficientes padronizados (cargas fatoriais) dos modelos de equações estruturais considerando Anemia Falciforme (AF) e Traço Falciforme (TF) como variáveis independentes principais, tendo Pe (periodontite) como desfecho e mediação do componente principal (CP1).

Figura 3 (Artigo 1) - Coeficientes padronizados (cargas fatoriais) dos modelos de equações estruturais considerando Anemia Falciforme (AF) e Traço Falciforme como variáveis independentes principais, tendo Pe (periodontite) como desfecho e mediação do componente principal (CP2).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1). Biomarcadores salivares nos indivíduos dos grupos AF e controle.

Tabela 2 (Artigo 1). Biomarcadores salivares nos indivíduos dos grupos AF e controle com periodontite.

Tabela 3 (Artigo 1). Indicadores de ajuste dos modelos de equações estruturais considerando AF com variável independente principal e periodontite como variável dependente (desfecho).

Tabela 4 (Artigo 1). Efeitos totais, diretos e indiretos padronizados das variáveis explicativas na periodontite considerando cada modelo.

Tabela S1 (Artigo 1). Coeficientes padronizados dos modelos de análise fatorial e análise de caminhos considerando AF como variável independente principal – Componentes principais 1 e 2 (Modelos 1 e 2).

Tabela 1 (Artigo 2). Análise descritiva da amostra incluída no estudo (n=123), São Luís-MA, Brasil.

Tabela 2 (Artigo 2). Associação entre biomarcadores de reabsorção óssea, periodontite, extensão e progressão da periodontite em indivíduos com traço falciforme (n=123), São Luís-MA, Brasil.

ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES SALIVARES EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA OU TRAÇO FALCIFORME ESTÃO ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS PERIODONTAIS?

CHANGES IN SALIVARY BIOMARKERS IN INDIVIDUALS WITH SICKLE CELL ANEMIA OR TRAIT ARE ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASES?

RESUMO

Introdução: A Anemia Falciforme (AF) e o Traço Falciforme (TF) são condições genéticas ligadas à herança homozigótica e heterozigótica, respectivamente, de um gene anormal pela mutação da globina beta da hemoglobina, originando uma hemoglobina alterada (HbS). Em condições de hipóxia, indivíduos com maiores concentrações de HbS podem sofrer eventos vasoclusivos, ocasionando uma susceptibilidade às inflamações e infecções bacterianas. As doenças periodontais (DPs) são condições crônicas desencadeadas em resposta à colonização bacteriana, e suas manifestações clínicas são fortemente influenciadas pela resposta imune do hospedeiro, além de serem moduladas por outros fatores associados. Indivíduos com AF e TF parecem apresentar um perfil imunológico alterado e ser mais susceptíveis a infecções bacterianas, podendo apresentar maior propensão às DPs. Assim, esta tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo I teve como objetivo determinar as concentrações de biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L) em indivíduos com AF com periodontite, e investigar a influência desses biomarcadores na relação entre exposição e desfecho. O capítulo II teve como objetivo investigar a associação entre biomarcadores de metabolismo ósseo (OPG e RANK-L) e parâmetros periodontais em indivíduos com TF.

Métodos: Trata-se de dois estudos transversais aninhados a uma coorte retrospectiva. Para o Artigo 1, os sujeitos foram selecionados da Supervisão de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR) em São Luís, Brasil e foram divididos em 2 grupos: grupo exposto 1 (com AF) e grupo não exposto (sem AF e TF), com 123 indivíduos por grupo (n = 246). Para o Artigo 2, foram considerados apenas sujeitos com TF e o grupo não exposto. Para o artigo 1, a periodontite foi diagnosticada pela avaliação da boca inteira do nível de inserção clínica em 6 locais de acordo com a definição de caso de 2018. Profundidade clínica de sondagem (PCS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS) foram avaliados. As

concentrações dos biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, RANK-L e OPG) foram determinadas por CBA e ELISA. Biomarcadores foram agrupados por afinidade em componentes principais (CPs) para estimar associações de interesse na modelagem de equações estruturais ($\alpha=0,05$). Já no artigo 2, O desfecho primário foi a taxa de progressão da doença periodontal definida pela razão entre a porcentagem de perda óssea do pior dente afetado/idade e dicotomizada em: (1) progressão lenta a moderada (razão ≤ 1) e (2) progressão rápida (razão >1). A extensão da periodontite foi avaliada pelo (1) número de dentes com nível de inserção clínica (NIC) ≥ 4 mm e (2) número de dentes com profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 4 mm. Razões de Média (RM) e Razões de Prevalência (RP) bruta e ajustada para sexo, classe socioeconômica, tabagismo, álcool, última visita ao dentista e comorbidades foram estimadas por meio de análises de regressão de Poisson e Logística.

Resultados: No capítulo 1, as concentrações salivares medianas de IL-6, TIMP-1, OPG e RANK-L apresentaram valores superiores no grupo AF quando comparadas ao grupo controle ($p<0,001$). Em indivíduos diagnosticados com periodontite, as concentrações medianas de TIMP-1, OPG e RANK-L foram superiores no grupo AF ($p<0,001$; $p=0,006$ e $p<0,004$, respectivamente). CP1 (IL-1 β , IL-6 e MMP-8) e CP2 (TIMP-1, RANK-L e OPG) estão correlacionados à presença de AF (SC=0,187; $p=0,048$ e SC=0,824; $p<0,001$, respectivamente). Contudo, as concentrações de biomarcadores salivares não atuam como mediadores da associação com a periodontite. Já no capítulo 2, verificou-se que maior nível de OPG foi associado à rápida progressão da doença periodontal (RP 2.55, IC95% 1.11-5.84, $p=0,026$), ao maior número de dentes com NIC ≥ 4 mm (RM 1.48, IC95% 1.18-1.85, $p=0,001$) e com PCS ≥ 4 mm (RM 2,01, IC95% 1,53-2,63, $P<0,001$). A razão RANK-L/OPG foi inversamente associada ao número de dentes com PCS ≥ 4 mm (RM 0,76, IC95% 0,59-0,97, $p=0,03$).

Conclusão: Indivíduos com AF e TF apresentam alterações significativas nas concentrações dos biomarcadores salivares, o que não explicou a ocorrência de periodontite no grupo AF, entretanto indivíduos com TF apresentaram alterações dos biomarcadores salivares de destruição tecidual (redução de RANK-L e aumento de OPG), o que pode refletir alterações no metabolismo ósseo que resultam em maior taxa de progressão e maior extensão da periodontite nestes indivíduos.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Traço falciforme. Doenças periodontais. Citocinas. Inflamação. Saliva.

ABSTRACT

Introduction: Sickle Cell Anemia (SCA) and Sickle Cell Trait (SCT) are genetic conditions transmitted to homozygous and heterozygous inheritance, respectively, of an abnormal gene by mutation of hemoglobin beta globin, originating an altered hemoglobin (HbS). Under hypoxic conditions, individuals with higher concentrations of HbS may experience vasoocclusive events, leading to susceptibility to inflammation and bacterial infections. Periodontal diseases (PDs) are chronic conditions triggered in response to bacterial colonization, and their clinical manifestations are strongly influenced by the host's immune response, in addition to being modulated by other associated factors. Individuals with FA and TF seem to have an altered immunological profile and be more susceptible to resistant bacteria, and may be more prone to PD. Thus, this thesis was divided into two chapters. Chapter I aimed to determine the concentrations of salivary biomarkers (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG and RANK-L) in subjects with SCA with periodontitis. and to investigate the influence of these biomarkers on the relationship between exposure and outcome. Chapter II aimed to investigate the association between bone metabolism biomarkers (OPG and RANK-L) and periodontal parameters in individuals with TF.

Methods: These are two cross-sectional studies nested within a retrospective cohort. For Article 1, subjects were selected from the Hematology and Hemotherapy Supervision of Maranhão (HEMOMAR) in São Luís, Brazil and were divided into 2 groups: exposed group 1 (with SCA) and unexposed group (without SCA and SCT), with 123 subjects per group (n = 246). For Article 2, only subjects with TF and the unexposed group were considered. For article 1, periodontitis was diagnosed by assessing the entire mouth at the clinical attachment level at 6 sites as per the 2018 case definition. Probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), and bleeding on probing (BOP) were evaluated. The concentrations of salivary biomarkers (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, RANK-L and OPG) were determined by CBA and ELISA. Biomarkers were grouped by affinity into principal components (PCs) to estimate associations of interest in structural equation modeling ($\alpha=0.05$). In article 2, the primary outcome was the rate of progression of periodontal disease defined by the ratio between the percentage of bone loss of the worst affected tooth/age and dichotomized into: (1) slow to moderate progression (ratio \leq 1) and (2) rapid progression (ratio $>$ 1). The extent of periodontitis was assessed by (1) number of teeth with clinical attachment level (CIN) \geq 4mm and (2) number of teeth with clinical

probing depth (PCS) \geq 4mm. Crude and adjusted Mean Ratios (MR) and Prevalence Ratios (PR) for sex, socioeconomic class, smoking, alcohol, last visit to the dentist and comorbidities were estimated using Poisson and Logistic regression analyses.

Results: In chapter 1, median salivary concentrations of IL-6, TIMP-1, OPG and RANK-L showed higher values in SCA group when detected than in the control group ($p < 0.001$). In individuals with periodontitis, median concentrations of TIMP-1, OPG and RANK-L were higher in SCA group ($p < 0.001$; $p = 0.006$ and $p < 0.004$, respectively). CP1 (IL-1 β , IL-6 and MMP-8) and CP2 (TIMP-1, RANK-L and OPG) are correlated with the presence of SCA (SC=0.187; $p = 0.048$ and SC=0.824; $p < 0.001$, respectively). However, the concentrations of salivary biomarkers do not operate as mediators of the association with periodontitis. In Chapter 2, it was discussed that a higher level of OPG was associated with rapid progression of periodontal disease (PR 2.55, 95%CI 1.11-5.84, $p = 0.026$), with a greater number of teeth with CIN \geq 4mm (RM 1.48, 95%CI % 1.18-1.85, $p = 0.001$) and with PCS \geq 4mm (RM 2.01, 95%CI 1.53-2.63, $P < 0.001$). RANK-L/OPG ratio was inversely associated with the number of teeth with PCS \geq 4mm (RM 0.76, 95%CI 0.59-0.97, $p = 0.03$).

Conclusions: Subjects with SCA and SCT exhibit significant alterations in the concentrations of salivary biomarkers, which did not explain the occurrence of periodontitis in SCA group, however, individuals with SCT showed alterations in salivary biomarkers of tissue destruction (reduction of RANK-L and increase of OPG), which may reflect changes in bone metabolism that result in a higher rate of progression and greater extent of periodontitis in these individuals.

Keywords: Sick cell anemia. Sick cell trait. Periodontal diseases. Cytokines. Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. CAPÍTULO I	28
3. CAPÍTULO II	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70
APÊNDICE B - Questionário socioeconômico	72
APÊNDICE C – Tabelas suplementares	75
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA	76
ANEXO B – Produção científica no período de 2014-2017	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia, prevalência e diagnóstico da Anemia e Traço Falciforme

A Anemia Falciforme (AF) é a hemoglobinopatia hereditária mais comum em todo o mundo (CREARY; WILLIAMSON; KULKARNI, 2007; YAWN, 2015). É caracterizada por uma mutação pontual na cadeia beta da hemoglobina na qual a valina é substituída pelo ácido glutâmico. Esta mutação resulta em uma hemoglobina alterada chamada hemoglobina S (HbS) no lugar da hemoglobina normal (HbA) (STEINBERG, 1998). A AF ocorre na homozigose recessiva, isto é, é o resultado da herança de dois genes para HbS de ambos os pais (DA FONSECA; OUEIS; CASAMASSIMO, 2007).

Quando expostas a baixas tensões de oxigênio, as alterações bioquímicas na molécula de Hb desencadeiam a formação de polímeros que levam a uma mudança na configuração bicôncava discoide dos glóbulos vermelhos, tornando-os semelhantes a uma foice (STEINBERG, 1998; STUART; NAGEL, 2004). Conseqüentemente, as células falciformes tornam-se menos flexíveis e mais aderentes ao endotélio vascular, bloqueando os capilares e restringindo o fluxo sanguíneo para múltiplos órgãos e sistemas (KELLEHER; BISHOP; BRIGGS, 1996; STEINBERG, 1998). Estes eventos vasoclusivos resultam em isquemia, infarto e danos nos tecidos que podem levar a complicações sistêmicas significativas, como crises de dor, acidente vascular cerebral, necrose avascular do osso, osteopenia, osteoporose e alta susceptibilidade às infecções (KATO et al., 2009; YAWN, 2015).

Outra condição, considerada assintomática e associada à presença de HbS, é o Traço Falciforme (TF), que é causado por herança heterozigótica em que um indivíduo recebe o gene recessivo de HbS de um dos pais e um gene dominante para Hb A do outro (TSARAS et al., 2009; GOLDSMITH et al., 2012). Tradicionalmente, o TF tem sido visto como uma condição benigna, não apresentando as complicações características da AF (KEY; DEREBAIL, 2010). Contudo, em situações de hipóxia tecidual severa, indivíduos com TF podem sofrer vasoclusão e potencialmente apresentar complicações clínicas semelhantes à AF (TSARAS et al., 2009; KEY; DEREBAIL, 2010).

As estimativas sugerem que 250 mil crianças nascem anualmente com AF em todo o mundo e, portanto, é uma das principais doenças genéticas epidemiológicas no mundo (LERVOLINO et al., 2011). Estima-se ainda que 300 milhões de pessoas em todo mundo possuem o TF (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). No Brasil, nascem anualmente 2.500 crianças com AF (LERVOLINO et al., 2011). A maior frequência desta população é

observada nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo a Bahia o estado brasileiro com maior incidência de doenças falciformes (BRASIL, 2014). Neste estado, entre os nascidos vivos, a incidência de TF é de 1:17. Já o Maranhão é o quarto estado brasileiro com maior índice desta condição, onde a cada 23 crianças nascidas vivas, uma possui TF (SILVA; RAMALHO; CASSORLA, 1993).

Devido ao seu caráter endêmico e sua alta taxa de morbidade e mortalidade (SEARS, 1978), a identificação tanto da AF quanto do TF são considerados requisitos fundamentais à qualidade e expectativa de vida de pessoas acometidas por essas condições genéticas. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) instituiu o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), também conhecido como "Teste do Pezinho". O PNTN propõe a triagem universal de recém-nascidos para doenças congênitas, como o hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria e hemoglobinopatias. O diagnóstico laboratorial da AF e do TF é realizado pela detecção da HbS por meio da eletroforese de hemoglobina (FRY, 2005).

Diante das frequentes crises vasclusivas e consequente infarto tecidual, indivíduos com AF podem apresentar comprometimento de diversos órgãos e sistemas. Esses eventos levam às manifestações sistêmicas da doença, como crises álgicas, seqüestro esplênico, acidente vascular cerebral e alta susceptibilidade às infecções (HEBBEL; VERCELLOTTI; NATH, 2009; YAWN, 2015). Na cavidade bucal, os achados mais frequentemente descritos são palidez da mucosa (KELLEHER; BISHOP; BRIGGS, 1996; ACHARYA, 2015), alteração da superfície da língua (ACHARYA, 2015), alterações dentárias e ósseas (DE CARVALHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017), bem como necrose pulpar assintomática (COSTA; THOMAZ; SOUZA, 2013).

Apesar de incomuns, muitos efeitos adversos relacionados à presença do TF têm sido relatados em condições de baixas concentrações de oxigênio (SEARS, 1978; HELLER et al., 1979; TSARAS et al., 2009). Complicações como necrose papilar renal, hematúria, infarto esplênico, complicações vasculares e morte súbita relacionada à prática esportiva mostram-se associadas ao TF (GOLDSMITH et al., 2012; THORESON et al., 2015; LIEM et al., 2017). Outra complicação possivelmente associada ao TF é a bacteriúria assintomática em grávidas (THURMAN et al., 2006; GOLDSMITH et al., 2012), o que pode sugerir sua propensão às infecções bacterianas. Indivíduos com TF apresentam relativa proteção à malária, pelo processamento inicial de antígenos por macrófagos e uma resposta imune acelerada (WILLIAMS et al., 2005; TSARAS et al., 2009; GOLDSMITH et al., 2012). Eventos tromboembólicos venosos possivelmente associados ao TF podem ocasionar aumento da atividade de coagulação e maiores concentrações de monócitos no sangue, que desempenham

papel importante no dano tecidual (TSARAS et al., 2009; GOLDSMITH et al., 2012; AMIN et al., 2015).

Na cavidade bucal, manifestações como alterações ósseas trabeculares têm sido relatadas em indivíduos com TF (DE CARVALHO et al., 2017; SOUZA et al., 2017). As alterações ósseas trabeculares estão relacionadas à hiperplasia e expansão compensatória da medula óssea desencadeada pela destruição precoce das hemácias, modificando as estruturas ósseas alveolares, o que pode levar à formação de um padrão ósseo diferenciado e mais friável, descrito como em *forma de escada* (DE CARVALHO et al., 2017). Considerando as manifestações orais anteriormente descritas, as mudanças na resposta imunológica e essas alterações no metabolismo ósseo, em conjunto com o desafio bacteriano, indivíduos com AF e TF podem estar mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções bucais associadas a esses fatores, como as doenças periodontais (DPs).

1.3 Resposta imunológica na Anemia e Traço Falciforme

A AF tem sido definida como um estado inflamatório crônico com componentes imunológicos significativos, incluindo contagens leucocitárias elevadas, ativação anormal de granulócitos, monócitos e células endoteliais e concentrações aumentadas de múltiplos mediadores inflamatórios (KEIKHAEI et al., 2013). Um dos possíveis mecanismos desencadeadores dos eventos vasoclusivos na AF e no TF está relacionado ao aumento de neutrófilos que, juntamente à presença de hemácias falciformes e plaquetas, promovem adesividade ao endotélio vascular e subsequente vasoclusão (QUINN et al., 2008; SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011; VEIGA et al., 2013). Monócitos de indivíduos com doenças falciformes graves são ativados, possivelmente em decorrência da fagocitose de células falciformes e outras micropartículas celulares.

Estes monócitos, por sua vez, ativam células endoteliais por meio da produção de IL-1 β e TNF- α (BELCHER et al., 2000; SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011). Estas células endoteliais ativadas produzem IL-1 β , IL-6 e TNF- α , enquanto plaquetas ativadas e monócitos ou macrófagos segregam IL-1 β e TNF- α (MAKIS; HATZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; ASSIS et al., 2005). Além da ativação crônica de monócitos, alterações nas células dendríticas também são características da AF e podem contribuir para deficiências na resposta imune e susceptibilidade às infecções (Figura 1). Sabe-se que a influência destes biomarcadores no plasma desempenha um papel na gênese da ativação vascular e celular e nas crises vasoclusivas em indivíduos com AF e TF (SEGEL; HALTERMAN; LICHTMAN, 2011; KAUSHANSKY; LEVI, 2016). Estes mediadores podem atuar ainda no

desenvolvimento e progressão das DPs, contudo esta relação ainda é desconhecida para estas hemoglobinopatias.

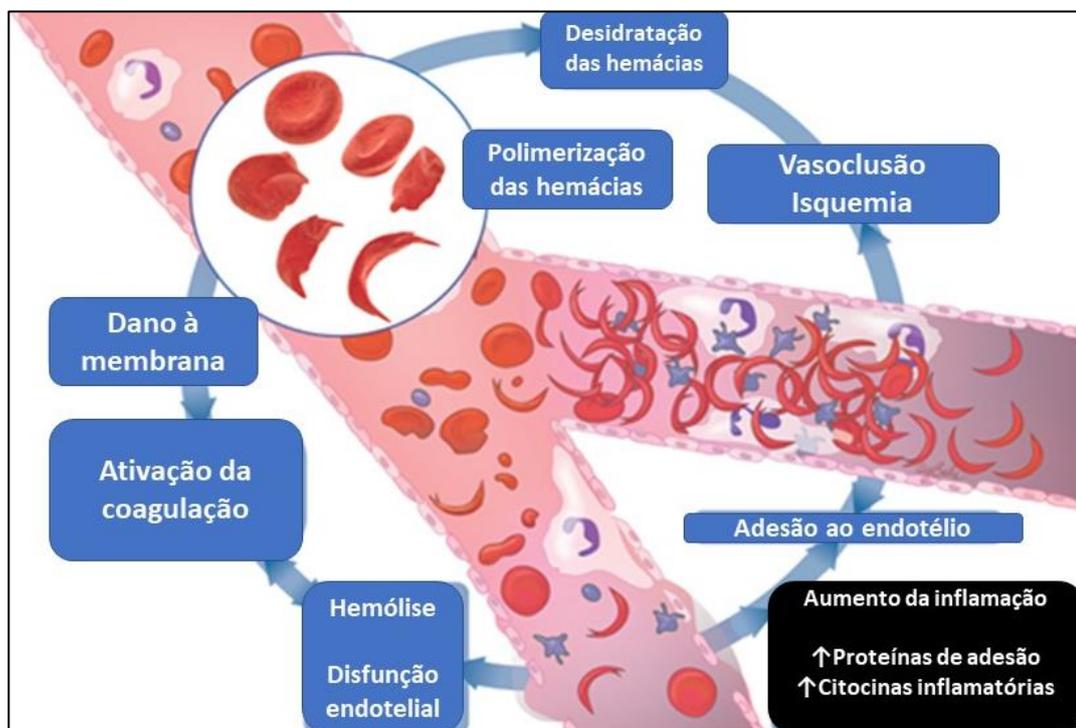


Figura 1. Esquema ilustrativo dos eventos fisiopatológicos cíclicos característicos das doenças falciformes e consequentes repercussões vasculares, levando ao aumento da inflamação. **Fonte:** Adaptado de Kaushansky et al., 2016.

1.4 Classificação e diagnóstico das doenças periodontais

As DPs são condições crônicas inflamatória e podem ser classificadas em gengivites e periodontites (ARMITAGE, 1995; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2003). As gengivites podem ser causadas pela presença ou não do biofilme bacteriano e são caracterizadas pela hiperemia gengival, edema, sangramento, mudanças no contorno gengival e aumento do fluido gengival crevicular (ARMITAGE, 1996). As periodontites são diferenciadas das gengivites pela presença clínica de perda de inserção do tecido conjuntivo somada à concomitante inflamação gengival (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999, 2003). Seu estabelecimento determina o aprofundamento patológico do sulco gengival por meio da migração apical do epitélio juncional, destruição do ligamento periodontal, do cemento e do osso alveolar (ARMITAGE, 2003).

O diagnóstico das periodontites leva em consideração a avaliação de parâmetros clínicos como as medidas de profundidade clínica de sondagem, nível de inserção clínica e a

presença de sangramento à sondagem (ARMITAGE, 2003). Avaliações radiográficas também têm sido utilizadas para verificar e quantificar a POA decorrente da progressão das doenças (BRAGGER, 2005). Além disso, ferramentas suplementares de avaliação diagnóstica qualitativa e quantitativa por meio da saliva têm sido utilizadas para reconhecimento e predição de doenças (KINNEY et al., 2011).

O interesse em testes diagnósticos rápidos e menos invasivos tem crescido exponencialmente na última década, levando a pesquisas extensas sobre a saliva como um fluido biológico para o diagnóstico clínico e predição de doenças (SOARES NUNES; MUSSAVIRA; SUKUMARAN BINDHU, 2015). A saliva possui algumas vantagens em relação ao sangue e à urina, dois dos fluidos de diagnóstico mais utilizados em laboratório. A coleta de saliva é fácil e não invasiva, exigindo instruções relativamente simples para a coleta e possui menor teor de proteína, menor complexidade e composição variável do que o soro (NUNES; BREZIKOFER; MACEDO, 2011; LIU; DUAN, 2012). Assim, os testes com base em fluidos orais são capazes de detectar a presença de periodontopatógenos e suas enzimas derivadas do hospedeiro associadas a mediadores inflamatórios, além de produtos de degradação tecidual (BASSIM et al., 2008; TAYLOR, 2014; BRANCO-DE-ALMEIDA et al., 2017).

1.5 Etiopatogenia das doenças periodontais e resposta imunológica do hospedeiro

As DPs são desencadeadas pela presença de periodontopatógenos e se mostram fortemente influenciadas pela resposta imune celular e humoral do hospedeiro (KORNMAN et al., 1997; DARVEAU, 2010). O desafio bacteriano consiste na produção de antígenos, lipopolissacarídeos e outros fatores de virulência que sinalizam as células do tecido local e células imunes (DARVEAU, 2010). Outros mecanismos efetores inatos, como alterações vasculares e na função dos neutrófilos, bem como a secreção de peptídeos antimicrobianos por neutrófilos e células epiteliais, são iniciados pela evolução da resposta das citocinas (TAYLOR, 2014). Estas citocinas também ativam respostas imunes adaptativas estimulando as células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, células de Langerhans e macrófagos, e regulam o desenvolvimento de subconjuntos de células T antigenspecíficas funcionalmente (PRESHAW; TAYLOR, 2011; TAYLOR, 2014). Assim, o periodonto saudável é mantido por uma resposta inata efetiva a uma microflora comensal (não patogênica), que é restrita à margem gengival e em que os neutrófilos desempenham um

papel fundamental regulado por baixos níveis de citocinas, como as Interleucinas (IL)-1 β e IL-8 (TAYLOR, 2014).

A persistência de microbiota patogênica no biofilme, no entanto, leva a uma resposta de citocinas pró-inflamatórias cada vez mais ativa no periodonto e progressão da lesão periodontal (PRESHAW; TAYLOR, 2011). A proliferação de células epiteliais no periodonto é uma característica histológica proeminente da progressão da periodontite e serve para aumentar a função de barreira dos tecidos epiteliais do periodonto (BARTOLD; NARAYANAN, 2006). Contudo, fibroblastos gengivais são perdidos à medida que o infiltrado de leucócitos aumenta e as metaloproteinases de matriz (MMPs) aumentam a degradação do colágeno causando a destruição do tecido conjuntivo, incluindo a perda do ligamento periodontal. Em lesões avançadas, os osteoclastos são recrutados e ativados, levando à perda óssea alveolar. A perda dos tecidos de proteção e sustentação leva à perda de inserção do elemento dentário e, eventualmente, à perda do dente, características da periodontite (BARTOLD; CANTLEY; HAYNES, 2010; TAYLOR, 2014) (Figura 2).

Há evidências consistentes de um papel fundamental de numerosas citocinas na iniciação e regulação das respostas imunes na periodontite e, especialmente, na mediação da destruição tecidual (DARVEAU, 2010; TAYLOR, 2014). A IL-1 β é produzida por uma ampla gama de tecidos periodontais e células imunes e, apresenta múltiplos papéis nas respostas imunes inatas e adaptativas às bactérias da placa relacionadas à patogênese da periodontite (BARKSBY et al., 2007). A atuação da IL-1 β [muitas vezes em sinergia com o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)] induz muitas das alterações vasculares associadas à inflamação e, em particular, a regulação da migração de neutrófilos da circulação para o periodonto. Na imunidade adaptativa, a IL-1 β estimula a apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, e influencia o desenvolvimento de células T. Estudos da expressão de IL-1 β e TNF- α em fluidos orais e tecidos periodontais nas DPs ressaltam o papel importante desses mediadores na patogênese da doença (ASSUMA et al., 1998; BARKSBY et al., 2007). IL-1 β e TNF- α ativam ainda a atividade dos osteoclastos, a secreção de MMPs e a reabsorção óssea alveolar na periodontite crônica (TAYLOR, 2014).

A IL-6 também é secretada por uma ampla gama de células no periodonto, provavelmente como uma resposta secundária à atividade de IL-1 β e TNF- α . Esta citocina é importante na regulação, desenvolvimento, proliferação e atividade de células imunes chave (células B, células T e monócitos), bem como osteoclastos (que se desenvolvem a partir da linhagem de monócitos) (BARTOLD; NARAYANAN, 2006; PRESHAW; TAYLOR, 2011). A IL-6 atua como um poderoso estimulador da secreção de MMPs e é provavelmente um

mediador chave na propagação da resposta inflamatória a bactérias do biofilme em vários níveis (IRWIN; MYRILLAS, 1998; COSTA et al., 2010; TAYLOR, 2014).

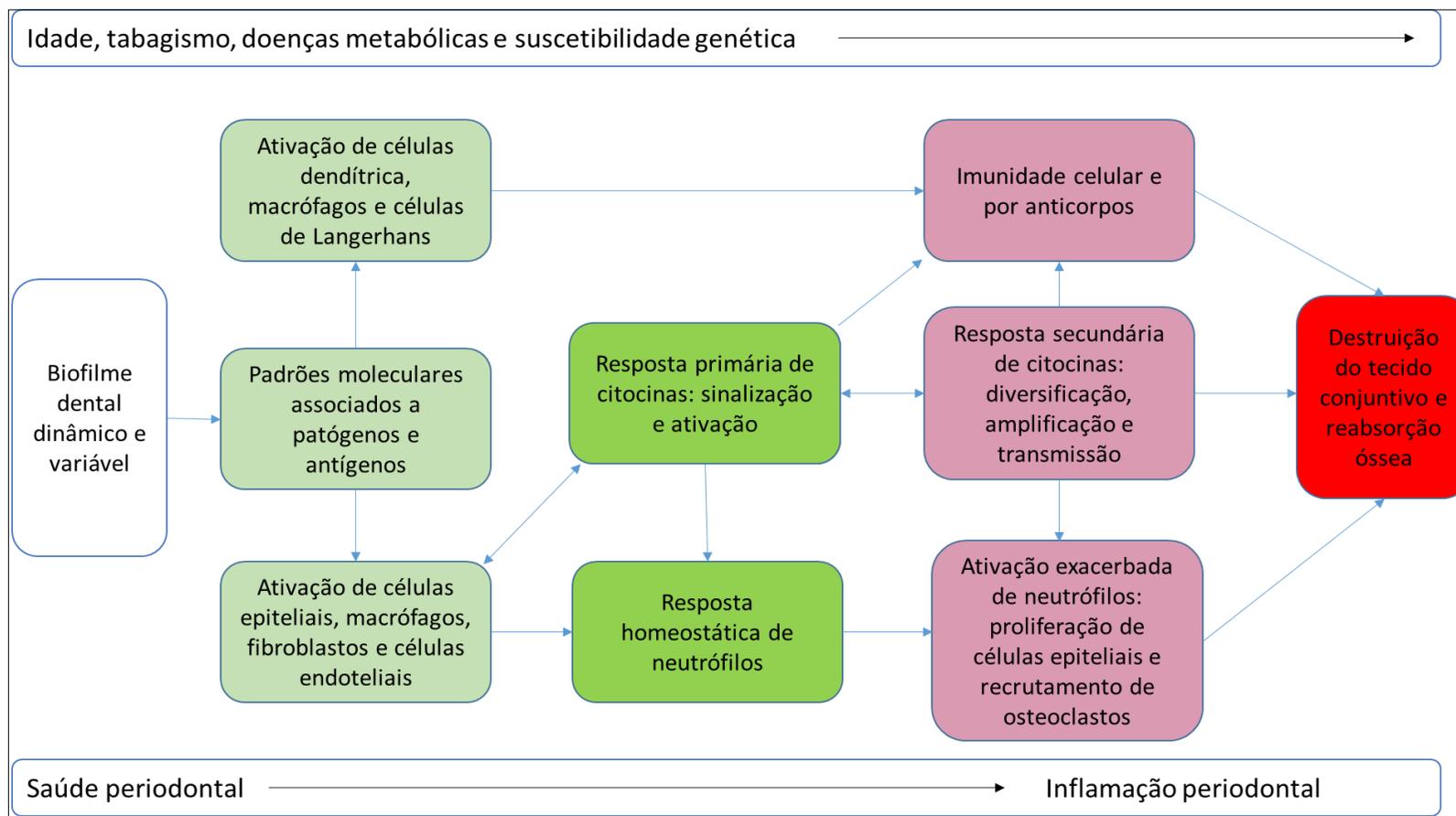


Figura 2. Esquema ilustrativo da patogênese da periodontite. O biofilme dental é complexo e está sujeito a mudanças ecológicas em resposta a mudanças no ambiente local, na alteração da resposta imunológica e fatores extrínsecos, as bactérias do biofilme sinalizam as células do tecido local e as células imunes por meio de células intrínsecas e padrões moleculares associados a patógenos, tais como lipopolissacarídeos e antígenos específicos. O periodonto saudável é mantido por uma resposta inata efetiva a uma microbiota não patogênica, em que os neutrófilos desempenham um papel fundamental regulado por níveis baixos de citocinas, como a IL-1 β . Uma mudança ecológica no biofilme para uma microbiota mais patogênica conduz a uma resposta imune exacerbada por meio de estimulação de citocinas por uma ampla gama de células residentes periodontais e imunes. O desenvolvimento da periodontite é conduzido por uma ativação exagerada de células periodontais intrínsecas, uma resposta primária de citocinas primária e secundária que leva à ativação de respostas efetoras inatas e em particular recrutamento e ativação de neutrófilos (em resposta a IL-1 β e IL-8 elevados) e osteoclastos (em resposta a RANK-L). O aumento da atividade de neutrófilos no periodonto é refletida por maiores concentrações de MMP-8 e outros biomarcadores. Macrófagos ativados e os linfócitos T e B também podem secretar citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , além de RANK-L. A persistência desta resposta pró-inflamatória leva à destruição tecidual característica da periodontite, que envolve a perda dos tecidos conjuntivos e ossos alveolares. O estabelecimento e a progressão da periodontite são influenciados por uma série de fatores como idade, tabagismo, distúrbios metabólicos e suscetibilidade genética. **Fonte:** Adaptado de Taylor, 2014.

As MMPs são sintetizadas pela maioria dos tipos de células no periodonto, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoclastos, além de neutrófilos e macrófagos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; MALEMUD, 2006). Estes mediadores exercem uma ampla gama de funções fisiológicas fundamentais, que incluem a homeostase e o reparo tecidual, bem como atuam nas respostas imunes, incluindo processamento e apresentação de antígenos, além da migração celular (HANNAS et al., 2007). A MMP-8, em especial, é derivada principalmente de leucócitos polimorfonucleares e é particularmente liberada durante a fase aguda de doenças inflamatórias (CHAMBRONE et al., 2013), sendo ainda relacionada à patogênese de doenças sistêmicas, como as doenças cardiovasculares, e à evolução do infarto e isquemia tecidual (RATHNAYAKE et al., 2013a). Um dos mecanismos de inibição da atividade de MMPs é regulado pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), como a TIMP-1 (principal inibidor exógeno da MMP-8), e o desequilíbrio entre suas concentrações é considerado um determinante importante para o início da degradação do colágeno do tecido conjuntivo e do osso alveolar, característicos da periodontite (CHAMBRONE et al., 2013; TAYLOR, 2014). Assim, uma correlação estreita entre maiores concentrações de MMP-8 e gravidade da DP tem sido descrita (KINANE et al., 2003; KINNEY; RAMSEIER; GIANNOBILE, 2007).

A perda óssea alveolar é uma característica crítica da progressão da doença na periodontite e há um crescente reconhecimento das importantes interações regulatórias entre metabolismo ósseo e inflamação (BUDUNELI; KINANE, 2011; GRAVES; LI; COCHRAN, 2011). A RANK-L é um membro da superfamília do TNF (também conhecido como fator de diferenciação de osteoclastos). É expresso como uma proteína ligada à membrana (mRANKL) ou em forma solúvel (sRANKL) por osteoblastos ou células do estroma (BOYCE; XING, 2008). Quando se liga ao seu receptor nas superfícies celulares, denominado ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK-L), promove a formação de osteoclastos e estimula sua proliferação e diferenciação (BOYCE; XING, 2008). Além de estimular a reabsorção óssea, a RANK-L é regulada positivamente por IL-1 β e IL-6, entre outras citocinas. A osteoprotegerina (OPG), seu antagonista natural, é uma proteína circulante, produzida por uma variedade de tipos celulares (incluindo osteoblastos), que inibem a formação de osteoclastos por meio da ligação com mRANKL (HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; BOYCE; XING, 2008). Portanto, a razão RANK-L/OPG é um fator particularmente importante na determinação da reabsorção e do volume de células ósseas (NAGASAWA et al., 2007; KOIDE et al., 2010) e esta proporção tem sido descrita como elevada na periodontite (BUDUNELI; KINANE, 2011; PRESHAW; TAYLOR, 2011) (Figura 3).

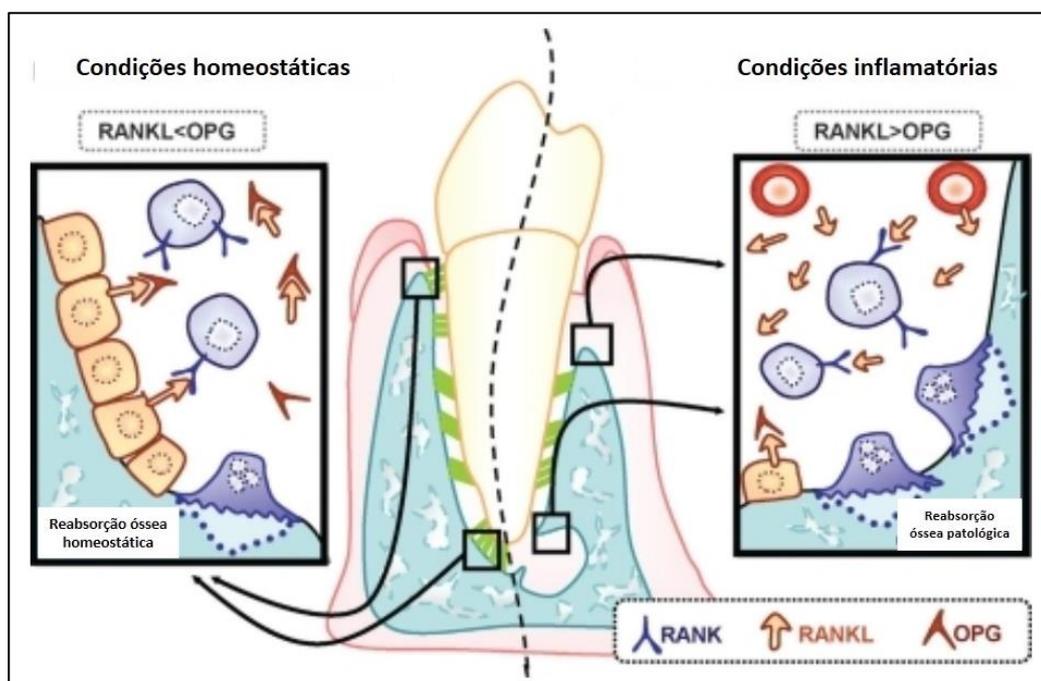


Figura 3. Esquema ilustrativo da influência do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK-L) e da osteoprotegerina (OPG) nas reabsorções ósseas. O equilíbrio RANK-L/OPG é um fator importante na regulação da reabsorção óssea em ambientes periodontais e periapicais. Nas condições homeostáticas (lado esquerdo), pensa-se que os níveis de RANKL e OPG estão em equilíbrio de modo que haja osteoclastogênese e reabsorção óssea limitadas. Com um estímulo inflamatório, a razão RANKL/OPG aumenta nos tecidos periodontais e periapicais e leva à estimulação da atividade dos osteoclastos e reabsorção óssea patológica (à direita). **Fonte:** Adaptado de Graves et al., 2011.

Esses mediadores constituem, coletivamente, um sistema complexo que possui propriedades funcionais de uma rede que pode estar relacionada à extensão e gravidade das DP (BUDUNELI; KINANE, 2011; KINNEY et al., 2011; TAYLOR, 2014), que podem ser avaliados por meio da saliva. Os biomarcadores são reconhecidos pela capacidade de monitorar o estado de saúde, susceptibilidade a doenças, progressão e tratamento de uma série de condições sistêmicas (WONG, 2006). Estes foram definidos como "alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou genéticas pelas quais um processo normal, anormal ou simplesmente biológico pode ser reconhecido ou monitorado" (BAUM et al., 2011). Os biomarcadores devem ser indicativos de saúde fisiológica, processos patológicos e/ou resposta a tratamentos. Além disso, os biomarcadores devem ser discriminatórios, robustos e validados em estudos clínicos (TAYLOR, 2014). Mediadores como IL-1 β , MMP-8 e TIMP-1 têm sido apontados como biomarcadores salivares "robustos" por discriminar periodontite de saúde periodontal. A atuação da IL-6 enquanto biomacador salivar tem sido apontada como "potencial" ou "incerta", sendo esta última ainda a classificação do RANK-L. TNF- α , IL-10 e OPG têm sido descritos com biomarcadores salivares "improváveis" (TAYLOR, 2014)

(Figura 4). Ainda assim, estudos envolvendo saliva sugerem que as citocinas e outros mediadores provavelmente formam um elemento substancial e mensurável de fluidos orais (LIU; DUAN, 2012; RATHNAYAKE et al., 2013b; SOARES NUNES; MUSSAVIRA; SUKUMARAN BINDHU, 2015).

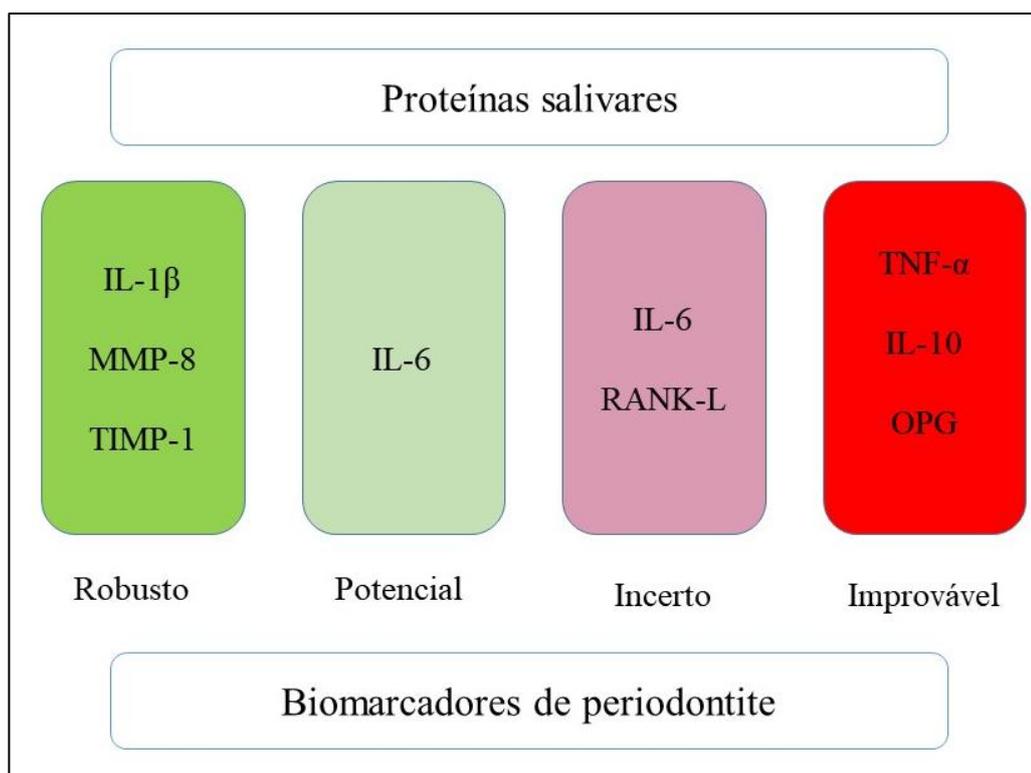


Figura 4. O possível papel das proteínas salivares como biomarcadores da periodontite. Biomarcadores "robustos" são definidos como proteínas salivares que demonstraram discriminar periodontite de saúde periodontal em pelo menos 3 estudos transversais e para os quais pode haver provas de suporte de estudos longitudinais que investigam o curso natural da periodontite e/ou os efeitos do tratamento nos níveis de biomarcadores. Biomarcadores "potenciais" são identificados utilizando critérios idênticos aos "robustos", com a exceção de que existem 2 estudos transversais replicados que mostram discriminação de doenças, além de possíveis evidências por estudos longitudinais, mas para os quais pode haver estudos contraditórios limitados. É aceito que os mediadores nas categorias "robusta" e "potencial" podem ser intercambiáveis. Os biomarcadores "incertos" são proteínas para as quais existem apenas estudos individuais que mostram discriminação da periodontite ou para os quais existem vários estudos dos quais a evidência é contraditória. Os biomarcadores "improváveis" são as proteínas para as quais há 3 ou mais estudos que não fornecem evidência de associação com periodontite. **Fonte:** Adaptado de Taylor, 2014.

1.6 Doenças periodontais e Anemia e Traço Falciforme

Em decorrência de sua alta susceptibilidade às infecções, acreditava-se que indivíduos com AF fossem mais propensos às DPs (ONWUBALILI, 1983; BENOIST et al., 2006).

Alguns estudos epidemiológicos foram realizados com o objetivo de investigar associação entre AF e DPs (CRAWFORD, 1988; AROWOJOLU, 1999; GUZELDEMIR et al., 2011; PASSOS et al., 2012; VEIGA et al., 2013; DE CARVALHO et al., 2015), e todos eles refutaram essa hipótese.

Mesmo diante de sua clara propensão às infecções locais, foi identificado um único estudo que avaliou o perfil de biomarcadores salivares de indivíduos com AF. Dentro de suas limitações (como pequeno tamanho amostral e inclusão de indivíduos jovens na amostra), o estudo de Tonguç et al. (2022) aponta que, apesar dos achados periodontais terem sido semelhantes entre os grupos AF e controle, os níveis de citocinas salivares foram aumentados em crianças com AF (TONGUÇ et al., 2022). Recentemente, uma revisão sistemática investigou se indivíduos com AF apresentam maior riscos de DPs do que aqueles sem a doença (DA SILVA et al., 2023). Este mesmo estudo aponta a necessidade de realização de estudos bem delineados, reconhecendo que indivíduos com AF podem ter altos níveis de células progenitoras endoteliais circulantes, que contribuem para uma resposta inflamatória exacerbada (DA SILVA et al., 2023).

No que diz respeito à relação entre TF e as DPs, um estudo de nosso grupo de pesquisa verificou associação entre o TF e a periodontite e subsequente perda óssea alveolar em avaliações clínicas e radiográficas por meio de regressões múltiplas (DE CARVALHO, *et al.*, 2015). Contudo, mesmo diante da susceptibilidade às infecções bacterianas (GOLDSMITH et al., 2012) e da resposta imune diferenciada (WILLIAMS et al., 2005; TSARAS et al., 2009), não foram identificados estudos que apontem o papel de biomarcadores salivares na associação entre a TF e DPs.

Assim, o presente estudo teve como objetivos: 1) determinar as concentrações de biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L) em indivíduos com AF com periodontite e investigar a influência desses biomarcadores na relação entre exposição e desfecho e 2) investigar a associação entre biomarcadores de metabolismo ósseo (OPG e RANK-L) e parâmetros periodontais em indivíduos com TF.

2. CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES EM BIOMARCADORES SALIVARES DE INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME ESTÃO ASSOCIADAS ÀS DOENÇAS PERIODONTAIS?

(a ser submetido ao periódico *Archives of Oral Biology*)

Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho-Buonocore, Susilena Arouche Costa, Luciana Salles Branco de Almeida, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Mayara Cristina Pinto da Silva, Johnny Ramos do Nascimento, Erika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz, Soraia de Fátima Carvalho Souza

RESUMO

Objetivo: Determinar as concentrações de biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L) em indivíduos com Anemia Falciforme (AF) com periodontite e investigar a influência desses biomarcadores na relação entre AF e periodontite.

Materiais e Métodos: A amostra foi dividida em dois grupos: AF e controle (n=123 por grupo). A periodontite foi diagnosticada pela avaliação da profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento em 6 locais de acordo com a definição de caso de 2018. As concentrações dos biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, RANK-L e OPG) foram determinadas por citometria de fluxo e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Biomarcadores foram agrupados por afinidade em componentes principais (CPs) para estimar associações de interesse na modelagem de equações estruturais ($\alpha=0,05$). Foram construídos dois modelos explicativos: 1) AF – CP1 (IL-1 β , IL-6 e MMP-8) – periodontite e 2) AF – CP2 (TIMP-1, RANK-L e OPG) – periodontite.

Resultados: As concentrações salivares medianas de IL-6, TIMP-1, OPG e RANK-L apresentaram valores superiores no grupo AF quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$). Em indivíduos com periodontite, as concentrações medianas de TIMP-1, OPG e RANK-L foram superiores no grupo AF ($p<0,001$; $p=0,006$ e $p<0,004$, respectivamente). CP1 e CP2 estão correlacionados à presença de AF (SC=0,187; $p=0,048$ e SC=0,824; $p<0,001$, respectivamente). Contudo, nos dois modelos, as concentrações de biomarcadores salivares não operam como mediadores na relação entre AF e periodontite.

Conclusão: Há alterações nas concentrações dos biomarcadores salivares em indivíduos com AF, mas estas não são mediadoras da relação entre AF e periodontite.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Doenças Periodontais, Citocinas; Saliva.

1. Introdução

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença resultante de uma mutação no gene da globina- β da hemoglobina normal (HbA), dando origem a uma hemoglobina alterada (HbS). Diante do evento de falcização das hemácias, um infiltrado tecidual neutrofílico promove adesividade ao endotélio vascular e restringe o fluxo sanguíneo, ocasionando a vasoclusão (Segel et al., 2011). Estudos demonstraram que indivíduos com AF possuem um estado inflamatório sistêmico crônico, caracterizado por contagens leucocitárias elevadas, ativação anormal de granulócitos, monócitos e células endoteliais, bem como maiores concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios, incluindo a Interleucina (IL)-6 (Keikhaei et al., 2013; Sarray et al., 2015). Sugere-se que, em conjunto, essas alterações na resposta imune contribuam para as repercussões sistêmicas observadas em indivíduos com AF, incluindo uma maior susceptibilidade a infecções (Veiga et al., 2013; Yawn, 2015).

O perfil inflamatório crônico observado em pacientes com AF vem estimulando a busca por uma possível relação entre essas condições e a presença/suscetibilidade a infecções bucais, incluindo as doenças periodontais (DPs) (Passos et al., 2012; Veiga et al., 2013; de Carvalho et al., 2015). Frente às DPs, mais especificamente a periodontite, mediadores inflamatórios como as interleucinas IL-1 β e IL-6 podem estimular a reabsorção óssea alveolar (Martellacci et al., 2019; Matarese et al., 2015). Esses mediadores podem aumentar a síntese de colagenases como a metaloproteinase de matriz (MMP)-8, sendo sua atividade regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), em especial o TIMP-1 (Sorsa et al., 2004; Bartold et al., 2010). IL-1 β e IL-6 podem ainda estimular a produção do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK-L), que estimulam precursores de osteoclastos (Taylor, 2014). A osteoprotegerina (OPG) é um receptor de RANK-L que inibe sua atuação. Um relativo aumento nas concentrações de RANK-L ou diminuição nas concentrações de OPG nos tecidos periodontais pode resultar no estímulo da atividade osteoclástica e reabsorção óssea patológica (Buduneli & Kinane, 2011; Preshaw & Taylor, 2011).

Embora alguns estudos declarem que uma relação imunológica direta entre AF e DPs não foi estabelecida (Tonguç et al., 2022; Veiga et al., 2013), outros estudos verificaram relação entre as duas condições (Costa et al., 2020; Mahmoud et al., 2013). Em avaliações séricas anteriores, verificou-se que pacientes com AF apresentaram elevadas concentrações de marcadores inflamatórios, bem como razões elevadas de RANKL/OPG (em virtude de alterações no metabolismo ósseo observadas nesses pacientes) (Nouraie et al., 2011;

Schündeln et al., 2014). Contudo, não se havia, até então, avaliado se as concentrações de biomarcadores salivares de indivíduos com AF poderiam mediar a ocorrência de DPs.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar as concentrações de biomarcadores salivares (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L) em indivíduos com AF e periodontite, bem como investigar a influência desses biomarcadores na relação entre AF e periodontite.

2. Materiais e métodos

2.1 Desenho do estudo e participantes

Este estudo transversal aninhado em uma coorte (de Carvalho et al, 2016) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo nº 472.943/2013 – ANEXO A) e em conformidade com as normas do *Standards for Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology* (STROBE) (von Elm et al, 2007). Participaram do estudo aqueles indivíduos que voluntariamente aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Os indivíduos foram selecionados por seu status de exposição, resultando em um total de 123 indivíduos com AF e 123 sem AF. Informações sobre os critérios de seleção já foram descritas por de Carvalho et al. (2015). Os dados sociodemográficos foram obtidos por meio de um questionário estruturado solicitando informações sobre nome, sexo, cor autorreferida, idade em anos, classe socioeconômica de acordo com o Critério de Classificação Econômica Brasileira (Brazilian Market Research Association, 2015), estado geral de saúde e hábitos comportamentais relacionados à saúde bucal (APÊNDICE B).

2.2 Definição de caso de periodontite

Os exames clínicos periodontais (n = 246) foram realizados por um único examinador (Kappa=0,825), conforme descrito por de Carvalho et al. (2015). Os seguintes parâmetros clínicos periodontais foram registrados após inspeção circunferencial de seis locais (mésio-vestibular, médio-vestibular, distal-vestibular, mesiolingual, médio-lingual, distal-lingual) de todos os dentes, exceto terceiros molares: (1) profundidade de sondagem periodontal; (2) nível de inserção clínica e (3) recessão gengival. O diagnóstico clínico de periodontite foi estabelecido de acordo com a Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-

implantares da European Federation of Periodontology (EFP)/American Academy of Periodontology (AAP) (Caton et al., 2018).

2.3 Determinação dos níveis de biomarcadores salivares

Realizou-se coleta de saliva não estimulada, com o auxílio de recipientes individuais e esterilizados. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 15 minutos), aliqüotadas e armazenadas a -80°C até as análises. A quantificação das citocinas pró-inflamatórias foi realizada por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA) de acordo com protocolo sugerido pela BD Biosciences (BD Biosciences[®], San Jose, CA, EUA). Foi utilizado o kit “Human IL-1 β Enhanced Sensitivity Flex Set (Bead B4)” para quantificação da citocina IL-1 β e o produto “Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” para a citocina IL-6. As amostras não foram diluídas e as análises foram realizadas em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante. Os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

A quantificação das moléculas MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L foi realizada por meio do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Para tal, foram utilizados os kits “Human TIMP-1 ELISA” e “Human MMP-8 ELISA”, de acordo com protocolo sugerido pela BD Biosciences (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA). Foram ainda utilizados os kits “Human TRANCE/RANK L/TNFSF11 DuoSet ELISA” e “Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B DuoSet ELISA”, seguindo as orientações do fabricante (R&D Systems[®] - Minneapolis, MN, EUA). As análises foram realizadas em triplicata e as concentrações de dos analitos foram quantificadas em pg/ml.

2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados como originalmente registrados, sem manipulação de dados perdidos. Frequências absolutas e relativas foram estimadas para variáveis categóricas (idade, classe socioeconômica, tabagismo, visitas ao dentista, presenças de outras doenças e uso de fármacos). Médias e desvios padrão ou medianas e desvios interquartílicos foram estimados para variáveis quantitativas (IL-1 β , IL-6, MMP-8, TIMP-1, OPG e RANK-L). A comparação das frequências, médias entre os grupos foi realizada pelos testes Qui-quadrado, Exato de Fisher e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Análises de componentes principais (CPA) foram realizadas para agrupar os biomarcadores salivares por afinidade. A influência desses

biomarcadores na relação entre AF e periodontite. foi avaliada por modelagem em equações estruturais [structural equation modeling (SEM)].

2.5 Análise de componentes principais

Dado o número considerável de biomarcadores salivares mensurados e considerando que eles podem não funcionar de forma independente, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada como uma técnica de redução de dados, bem como para explorar suas relações (Branco-de-Almeida et al., 2017; Velsko et al., 2017). Nosso objetivo foi orientar a seleção dos biomarcadores salivares que representavam a maior variação explicativa dentro da amostra avaliada.

2.6 Modelo teórico proposto e modelagem de equações estruturais

Na Figura 1 é apresentado o modelo teórico explicativo das associações entre AF – DPs mediadas pela concentração de biomarcadores salivares, agrupados em CPs (determinados pela PCA). Considerando que as DPs, em especial a periodontite, são influenciadas pela ocorrência de doenças sistêmicas metabólicas (Kirkwood et al., 2007), circulatórias, (Kinane et al., 2006), tabagismo (Giuca et al., 2014), idade (Lee et al., 2015), uso de fármacos (Kinane et al., 2006), número de dentes (Lee et al., 2015), pelas condições socioeconômicas e pelo acesso aos serviços odontológicos (Chambrone et al., 2010), estas variáveis foram consideradas no ajuste do modelo.

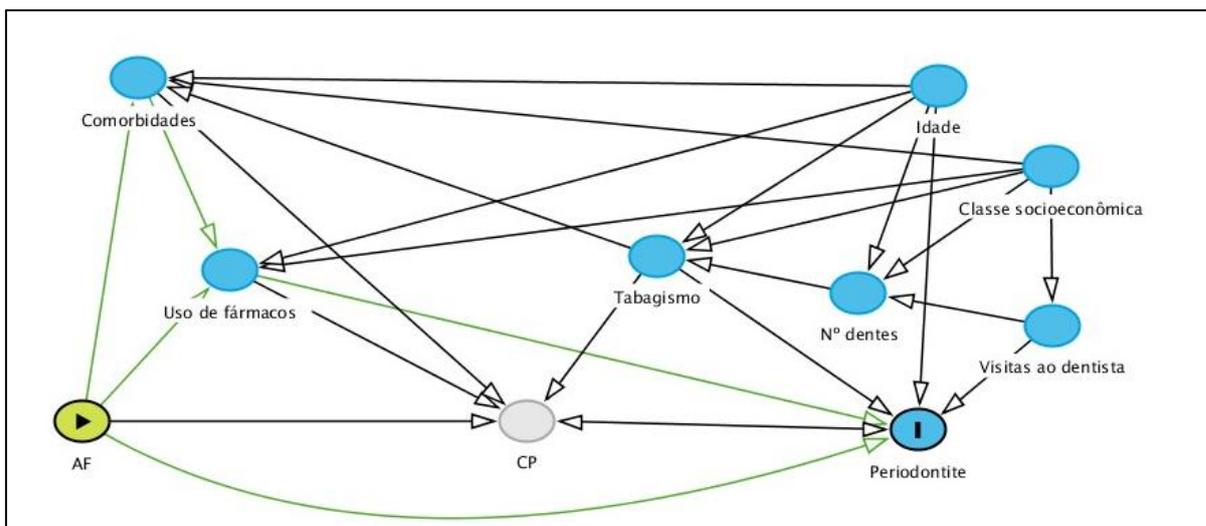


Figura 1. Modelo teórico da associação entre Anemia Falciforme (AF) e periodontite mediada pela ação de biomarcadores salivares agrupados em componentes principais (CP).

Utilizou-se a SEM para avaliar associações diretas entre AF e a presença de DPs (gingivite e periodontite); bem como associações indiretas influenciadas pelos CPs (grupos de biomarcadores que se relacionam entre si). A SEM consiste em dois submodelos: um modelo de mensuração (measurement model), para a construção das variáveis latentes; e um modelo estrutural (structural model), que analisa o modelo teórico, onde correlações entre as variáveis são testadas (Kline, 2011). As variáveis latentes, que definem os construtos, são representadas por círculos ou elipses e as observadas são representadas por quadrados ou retângulos (Kline, 2011). As variáveis latentes do estudo foram os CPs, construídos a partir da afinidade entre os biomarcadores salivares.

Uma variável latente adequada apresenta uma validade convergente, mostrando que seus indicadores medem o mesmo construto, que é verificado pelas cargas fatoriais com valores altos (maior que 0,50). Além disso, deve haver uma validade discriminante, isto é, as correlações entre os indicadores não devem ser muito altas ($<0,95$), demonstrando que cada indicador mede diferentes aspectos do construto. No modelo estrutural, cargas negativas indicam associação inversa e cargas positivas indicam associação direta (Kline, 2011). Para identificar associações diretas, indiretas (mediadas por outras variáveis) e totais entre as variáveis do modelo, foram realizadas análises de caminhos (pathway analysis). Os coeficientes padronizados do modelo estrutural foram interpretados, onde coeficientes com valores próximos de 0,10 indicam um efeito pequeno, 0,30 um efeito médio, $> 0,50$ um forte efeito e $> 0,70$ um efeito muito forte (Kline, 2011).

O modelo testado foi avaliado quanto a índices de ajuste, incluindo RMSEA (Root Mean Square Error of Aproximation), CFI (Comparative Fit Index), TLI (Tucker-Lewis Index) e WRMR (Weighted Root Mean Square Residual). Valores com RMSEA <0,05, CFI / TLI > 0,90 e WRMR <1,00 foram considerados aceitáveis. Teste Qui-Quadrado, graus de liberdade e valor de p foram avaliados, mas não foram adotados como parâmetros para o modelo de ajuste, dada a sua sensibilidade ao tamanho da amostra. O modelo também foi avaliado pelo método de estimação dos quadrados mínimos (WLSMV), indicado para a análise de dados categorizados (Cook et al., 2009; León et al., 2011; Kline, 2011). As análises estatísticas foram realizadas com os softwares Stata/SE versão 12.0 (Stata Corp., College Station, Texas, EUA) e Mplus versão 7.4 (Muthén & Muthén, Los Angeles, EUA). O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

Os dados obtidos mostraram uma distribuição assimétrica. A mediana ($\pm Q1-Q3$) das idades dos dois grupos foram as seguintes: AF (17 ± 13 anos) e controle (36 ± 19 anos). A amostra foi composta em sua maioria por mulheres (73,98%), não fumantes (93,90%) e não apresentavam comorbidades (82,93%). As concentrações salivares medianas de IL-6, TIMP-1, OPG e RANK-L apresentaram valores superiores no grupo AF quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva da amostra incluída no estudo (n=246), São Luís-MA, Brasil.

	Total (243)		AF (n=123)		Controle (n=123)		p-valor
	N	% ^a	N	% ^b	n	% ^b	
Sexo							
Masculino	64	26,02	44	35,77	20	16,26	<0,001 ^c
Feminino	182	73,98	79	64,23	103	83,74	
Tabagismo							
Não	231	93,90	120	51,95	111	48,05	0,030^d
Sim	15	6,10	3	20,00	12	80,00	
Uso de fármacos							
Não	104	42,28	5	4,81	99	95,19	<0,001 ^c
Sim	122	57,72	118	83,10	24	16,90	
Classe Socioeconômica							
A-B	51	20,82	19	37,25	32	62,75	0,120 ^d
C	140	57,14	73	52,14	67	47,86	
D - E	55	22,04	31	55,56	24	44,44	
Visitas ao dentista							
Nunca visitou	11	4,47	3	27,27	8	72,73	<0,001 ^c
1 ano	143	58,13	87	60,84	56	39,16	
Mais de 1 ano	92	37,40	33	35,87	59	64,13	
Comorbidades							
Não	204	82,93	95	46,57	109	53,43	0,018^c
Sim	42	17,07	28	66,67	14	33,33	
Periodontite							
Não	196	79,67	102	82,93	94	76,42	0,205 ^c
Sim	50	20,33	21	17,07	29	23,58	
	X	Med	X	Med	X	Med	p-valor^e
	(dp)	(DIq)	(dp)	(DIq)	(dp)	(DIq)	
Idade	28,5 (13,02)	25,0 (20,0)	21,39 (9,36)	17,0 (13,0)	35,60 (12,29)	36,0 (19,0)	<0,001
Número de dentes	23,27 (5,98)	26,0 (6,0)	24,77 (4,83)	26,0 (4,0)	21,77 (6,62)	24,0 (9,0)	<0,001

Biomarcadores salivares¹

IL-1 β	271,1 (264,1)	190,2 (89,1- 353,5)	233,4 (186,9)	194,9 (90,1- 332,4)	299,8 (331,8)	162,5 (53,0- 466,2)	0,277
IL-6	12,2 (58,3)	2,5 (0,4-7,5)	14,1 (36,4)	3,3 (0,7-10,5)	12,1 (92,6)	1,5 (0,2-3,8)	<0,001
MMP-8	20063,8 (24904,1)	14410,0 (3230,0- 30970,0)	19571,3 (23259,8)	14600,0 (2770- 29950)	18918,6 (28515,0)	12460,0 (830- 28230)	0,255
TIMP-1	15367,6 (4457,7)	15408,0 (12931- 17409)	16621,7 (3479,5)	16109,0 (14452- 17833)	12811,8 (4194,9)	12502 (10352- 14908)	<0,001
OPG	6265,1 (5096,1)	5198,0 (3013,3- 7816)	6128,6 (4992,3)	5414,0 (2895- 7564)	4819,8 (3447,1)	4288,6 (2632- 6180)	<0,001
RANK-L	1543,8 (796,2)	1439,7 (1107- 1937)	1673,1 (984,5)	1632,3 (1222,3- 2152)	1428,9 (654,7)	1290,3 (1026,8- 1593,5)	<0,001

AF: Anemia Falciforme. x: média. dp: desvio-padrão. Med: mediana. DIq: Desvio Interquartilico (Q1-Q3). ¹Biomarcadores em pg/mL. ^a100% na coluna. ^b100% em toda a linha. ^cTeste Qui-quadrado. ^dTeste Exato de Fisher. ^eTeste de Kruskal-Wallis. Os p-valores significantes estão em negrito.

Quando se considera somente os indivíduos diagnosticados com periodontite, as concentrações medianas de TIMP-1, OPG e RANK-L foram superiores no grupo AF em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$; $p = 0,006$ e $p < 0,004$, respectivamente) (Tabela 2). Apesar de não exibir diferença estatística entre os grupos, nota-se que as concentrações de IL-6 exibiram valores ligeiramente superiores no grupo AF.

Tabela 2. Biomarcadores salivares nos indivíduos com periodontite dos grupos AF e controle

Biomarcador salivar ¹	Controle com periodontite		AF com periodontite		P-valor ²
	x (dp)	Med (DIq)	x (dp)	Med (DIq)	
IL-1 β	413,9 (378,2)	326,6 (72,5-658,0)	213,7 (198,2)	164,3 (59,9-294,2)	0,086
IL-6	5,3 (8,6)	2,5 (0,4-5,7)	8,4 (15,1)	8,9 (4,0-13,3)	0,046
MMP-8	2268,8 (19670)	18620 (3940,0- 37880,0)	11496,2 (18347,3)	10540 (1170,0-18620,0)	0,079
TIMP-1	13145 (4599,5)	12688 (10222,0- 14668,0)	15676,2 (2315,4)	16102 (14089,0-17548,0)	<0,001
OPG	44471,9 (2875,3)	4515,7 (2634,0-6094,0)	7140,8 (5707,4)	6032,5 (3338,0-9930,0)	0,006
RANK-L	1202,6 (536,3)	1133,5 (823,5-1235,2)	1887,8 (1020,8)	1487,7 (1282,3-2437,0)	0,004

AF: Anemia Falciforme.. x: média. dp: desvio-padrão. Med: mediana. DIq: Desvio Interquartilico (Q1-Q3). ¹Biomarcadores em pg/mL. ²Teste de Kruskal-Wallis.

Considerando a afinidade entre os biomarcadores salivares avaliados, a análise de componentes principais, bem como suas cargas fatoriais, construiu duas variáveis latentes. Foram formados os seguintes componentes para os modelos que consideram AF com variável independente, com suas maiores variâncias: 1) CP1: IL-1 β (0,6227), IL-6 (0,3948) e MMP-8 (0,5738); e 2) CP2: TIMP-1 (0,5552), RANK-L (0,6568) e OPG (0,2697). Assim, observa-se que o CP1 foi composto por biomarcadores de destruição tecidual e o CP2 foi formado essencialmente por biomarcadores de metabolismo ósseo.

Os CPs 1 e 2, formados em função da exposição (AF) foram testados como mediadores da associação entre as exposições e o desfecho (periodontite) nos modelos explicativos. Assim, foram construídos dois modelos explicativos: 1) AF – CP1 – periodontite e 2) AF – CP2 – periodontite. Os indicadores de ajuste dos modelos de equações estruturais considerando AF como variável independente principal e periodontite como variável dependente são exibidos na Tabela 3. Os dois modelos testados apresentaram bons índices de ajuste. As variáveis latentes CPs formadas a partir dos biomarcadores salivares apresentaram boas cargas fatoriais, indicando boa validade convergente e discriminante (Tabela 3).

Tabela 3. Indicadores de ajuste dos modelos de equações estruturais considerando AF com variável independente principal e periodontite como variável dependente (desfecho).

Índices	Modelo 1	Modelo 2
Nº de parâmetros livres	44	40
χ^2 ^a	47,452	32,515
Graus de liberdade	35	25
p-valor	0,0780	0,1437
RMSEA ^b	0,038	0,035
90% IC ^c	0,000-0,064	0,000-0,066
P-valor	0,754	0,761
CFI ^d	0,940	0,955
TLI ^e	0,892	0,906
WRMR ^f	0,765	0,697

. ^aTeste Qui-Quadrado. ^bRaiz do erro quadrático médio de aproximação. ^cIntervalo de Confiança a 90%. ^dÍndice de ajustamento comparativo. ^eÍndice Tucker Lewis. ^fRaiz do resíduo quadrático médio ponderado.

Nos modelos propostos, verifica-se que o CP1 (SC=0,187; p= 0,048) e CP 2 (SC=0,824; p<0.001) estão correlacionados à presença de AF. Contudo, nos dois modelos, as concentrações de biomarcadores salivares não atuam como mediadores da associação com a periodontite (Figura 2; Tabela S1). A variável idade apresentou efeito total sobre a periodontite nos modelos,

enquanto que classe socioeconômica exibiu efeitos total e direto sobre o desfecho (Tabela 4).

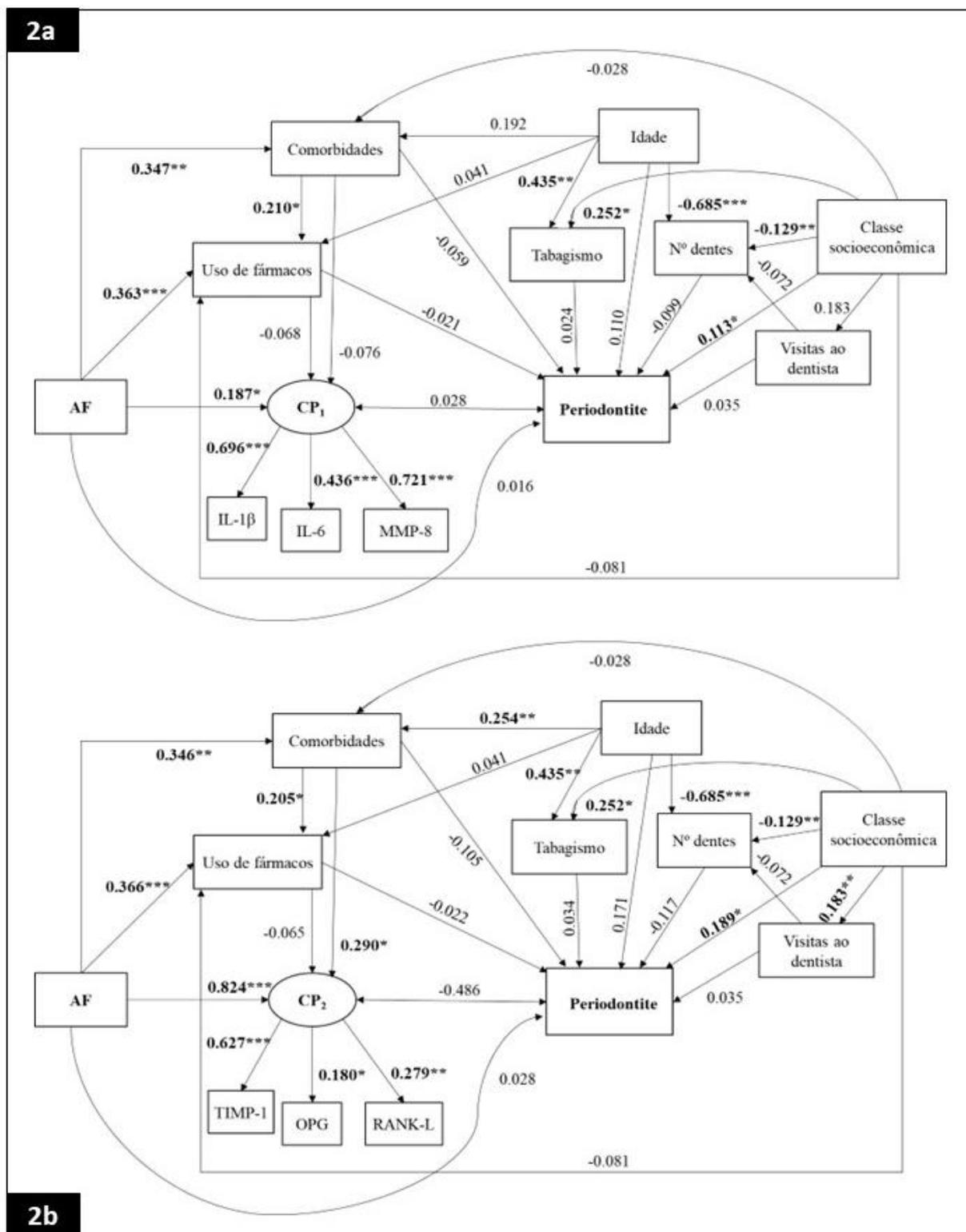


Figura 2. Coeficientes padronizados (cargas fatoriais) dos modelos de equações estruturais considerando Anemia Falciforme (AF) como variáveis independentes principais, tendo periodontite como desfecho e mediação dos componentes principais. **2a**, Modelo 1 (AF – CP₁ – Periodontite). **2b**, Modelo 2 (AF – CP₂ – Periodontite). *Em negrito valores estatisticamente significantes ($\alpha=5\%$). *Em negrito valores estatisticamente significantes ($p<0.05$). ** $p<0.01$. *** $p<0.001$.

Tabela 4. Efeitos totais, diretos e indiretos padronizados das variáveis explicativas na periodontite considerando cada modelo.

Efeitos	Modelo 1	Modelo 2
	CP ¹	CP ¹
Efeito da exposição sobre Pe		
Total	-0,014	-0,017
Total indireto	-0,030	-0,046
Exposição – Uso de fármacos – Pe	-0,008	-0,008
Exposição – Comorbidades – Pe	-0,020	-0,036
Exposição – Comorbidades - Uso de fármacos – Pe	-0,002	-0,002
Direto	0,016	0,028
Efeito do Uso de fármacos sobre Pe		
Total	-0,021	-0,022
Total indireto	0,000	0,000
Direto	-0,021	-0,022
Efeito de Comorbidades² sobre Pe		
Total	-0,063	-0,109
Total indireto	-0,004	-0,004
Comorbidades – Uso de fármacos - Pe	-0,004	-0,004
Direto	-0,059	-0,105
Efeito da Idade sobre Pe		
Total	0,175³	0,237³
Total indireto	0,065	0,067
Idade – Uso de fármacos – Pe	-0,001	-0,001
Idade – Número de dentes – Pe	0,068	0,080
Idade – Tabagismo – Pe	0,011	0,015
Idade – Comorbidades – Pe	-0,011	-0,027
Idade – Comorbidades – Uso de fármacos - Pe	-0,001	-0,001
Direto	0,110	0,171
Efeito da Classe socioeconômica sobre Pe		
Total	0,164⁴	0,227³
Total indireto	0,030	0,451
Classe socioeconômica – Uso de fármacos – Pe	0,002	0,002
Classe socioeconômica – Visitas ao dentista – Pe	0,006	0,006
Classe socioeconômica – Número de dentes – Pe	0,013	0,015
Classe socioeconômica – Tabagismo – Pe	0,006	0,009
Classe socioeconômica – Comorbidades – Pe	0,002	0,005
Classe socioeconômica – Visitas ao dentista – Número de dentes – Pe	0,001	0,000
Classe socioeconômica – Comorbidades – Uso de fármacos – Pe	0,000	0,002
Direto	0,133⁵	0,189³
Efeito das Visitas ao dentista sobre Pe		
Total	0,043	0,042
Total indireto	0,007	0,008
Visitas ao dentista – Número de dentes – Pe	0,007	0,008
Direto	0,035	0,033

Pe: Periodontite. ¹CP: coeficiente padronizado. ²Hipertensão arterial sistêmica, alergia, cardiopatia, doenças renais, ósseas, hepáticas, metabólicas ou Comorbidades. ³p<0,05. ⁴p<0,01. ⁵p<0,001. Os valores significantes estão em negrito.

4. Discussão

Nossos resultados demonstram que indivíduos com AF apresentam um perfil complexo de biomarcadores salivares, uma vez que as concentrações salivares medianas de IL-

6, TIMP-1, OPG e RANK-L apresentaram valores superiores no grupo exposto quando comparadas ao controle. Em conjunto, estes dados sugerem que indivíduos com AF apresentam um estado inflamatório local distinto de indivíduos sem essas hemoglobinopatias. Embora as concentrações de biomarcadores salivares não atuem como mediadores da associação com a periodontite, verificamos que alterações destes biomarcadores estão correlacionados à presença de AF. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar níveis de citocinas salivares e biomarcadores de metabolismo ósseo em indivíduos com AF.

Concentrações superiores de IL-6 foram verificadas no grupo AF em comparação ao controle. A IL-6, uma citocina multifuncional, é um importante mediador inflamatório, que atua na regulação, desenvolvimento, proliferação e atividade de células imunes chave (células B, células T e monócitos), bem como osteoclastos (Preshaw & Taylor, 2011; Taylor, 2014). No contexto das doenças falciformes, o aumento da expressão das moléculas de adesão no plasma, incluindo a IL -6, também estimula a aderência dos glóbulos vermelhos e dos neutrófilos ao endotélio (Assis et al., 2005). Assim, sugere-se que as complicações associadas à vasclusão e à inflamação sistêmica crônica observadas na AF podem contribuir para o aumento das citocinas salivares, especialmente os níveis de IL-6, por aumentar a inflamação nos tecidos periodontais (Assis et al., 2005; Fernandez-Solari et al., 2015). Vários estudos mostraram que as concentrações de IL-6 em pacientes com AF são elevadas no plasma, mesmo sem experiência de crise vasclusiva (Assis et al., 2005; Sarray et al., 2015). Veiga et al. (2013), ao avaliarem o status periodontal e os níveis de citocinas séricas em crianças com AF e sem a doença, verificaram que as concentrações de IL-6 apresentaram valores superiores no grupo AF, independente da inflamação periodontal, o que corrobora com os achados deste estudo. Em um estudo recente, embora os estados periodontais tenham sido semelhantes em crianças com AF e seus contrapartes saudáveis, verificou-se um aumento significativo de citocinas salivares, especialmente nos níveis de IL-6 (Tonguç et al., 2022).

Também foi observado um aumento das concentrações salivares de TIMP-1 nos indivíduos com AF quando comparadas ao grupo controle. Em estudo prévio, foram observados níveis séricos de TIMP-1 significativamente maiores em pacientes com AF em comparação com indivíduos controle (Franco-Penteado et al., 2006). A TIMP-1 é um biomarcador que atua como inibidor tecidual de MMP-8, uma enzima que desempenha um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos, participando do turnover da matriz extracelular, bem como a degradação dos tecidos, mecanismos de reparação e migração celular (Chambrone et al., 2013). O equilíbrio entre MMPs e TIMPs desempenha um papel importante na manutenção da integridade dos tecidos saudáveis. O desequilíbrio dessa razão está envolvido na ativação da

resposta inflamatória e patogênese de doenças osteolíticas (Taylor, 2014; Kaur et al., 2012). Apesar de serem observadas diferenças nas concentrações de MMP-8 na amostra avaliada, acredita-se que o aumento das concentrações de TIMP-1 decorra de uma reação compensatória, uma vez que a inflamação crônica generalizada é uma característica da AF (Yawn, 2015; Liem et al., 2017).

Ainda considerando o perfil de biomarcadores salivares em indivíduos com AF, observou-se que as concentrações de RANK-L exibiram valores superiores no grupo AF. Com a estimulação de uma reação inflamatória local e ativação do sistema imune inato a partir de fatores e antígenos derivados de bactérias, uma cascata de eventos pode levar a osteoclastogênese e subsequente perda óssea por meio de maiores concentrações de RANK-L, que é regulada pela OPG, uma vez que atua como antagonista a este biomarcador (Chen et al., 2014). Um estudo prévio demonstrou que as concentrações séricas de RANK-L foram maiores em pacientes com AF do que os controles e atribuem a esses achados uma maior frequência e severidade de alterações ósseas diversas nesses indivíduos, como osteopenia e osteoporose (Schündeln et al., 2014). Em publicação do nosso grupo de pesquisa, verificou-se, em exames imagiológicos, que alterações ósseas trabeculares que acometem o complexo bucomaxilofacial foram mais prevalentes em indivíduos com AF (Souza et al., 2017). Portanto, as alterações dos níveis salivares destes biomarcadores podem ser um reflexo do que acontece no sangue, repercutindo em inflamação crônica e, conseqüentemente, no prejuízo da saúde óssea desses indivíduos.

Os resultados deste estudo sugerem que os CPs 1 (IL-1 β , IL-6 e MMP-8) e 2 (TIMP-1, RANK-L e OPG) estão correlacionados à presença de AF, independente da inflamação periodontal. Estes achados sugerem que a ocorrência da exposição (AF) pode causar alterações no perfil de biomarcadores salivares, que podem refletir as alterações séricas desses mediadores, em decorrência da inflamação crônica generalizada característica da AF e do grau de destruição local. Contudo, os modelos testados por meio de análises de equações estruturais não demonstram caminhos em que as concentrações salivares de biomarcadores, agrupados por afinidade em CPs, mediam a associação entre essa hemoglobinopatia e DPs, especificamente a periodontite. Recentemente, uma revisão sistemática investigou se indivíduos com AF apresentam maior riscos de DPs do que aqueles sem a doença e verificou que não há um aumento nos parâmetros periodontais, exceto para o índice gengival (da Silva et al., 2023). Este mesmo estudo aponta a necessidade de realização de estudos bem delineados, reconhecendo que indivíduos com AF podem ter altos níveis de células progenitoras endoteliais circulantes, indicando ativação e inflamação endotelial, e de neutrófilos, que são fonte potencial de

mediadores derivados de leucócitos e que contribuem para uma resposta inflamatória (da Silva et al., 2023).

Os achados deste estudo apontam para um efeito total positivo da idade sobre os desfechos nos modelos propostos. Por apresentar um caráter crônico, a progressão e severidade das DPs têm sido classicamente associadas à idade (Chambrone et al., 2010). Grandes estudos epidemiológicos (Albandar et al., 1999; Albandar, 2002) demonstraram um aumento na prevalência, extensão e gravidade da perda de inserção periodontal com o aumento da idade. No presente estudo, a idade dos indivíduos avaliados é relativamente baixa, o que os classifica como relativamente jovens para efeitos deletérios substanciais decorrentes da periodontite. Tal fato justifica-se pela baixa estimativa de sobrevivência destes indivíduos com AF, com idade média de morte de 33,4 anos (IC 95% 33,0-33,7) para homens e 36,9 anos (IC 95% 36,5-37,4) para mulheres (Lanzkron et al., 2013), o que impossibilitou a inclusão de indivíduos mais velhos na amostra.

No que concerne à classe socioeconômica, verificou-se efeito total desta variável sobre a periodontite nos modelos testados. Sabe-se que as condições socioeconômicas têm influência importante na qualidade de vida, com impacto sobre o cuidado com a saúde bucal e consequente estabelecimento de complicações que podem levar até a perda do elemento dentário (Passos et al., 2012). Acredita-se que uma maior frequência de indivíduos pertencentes às classes socioeconômicas menos privilegiadas e que visitavam pouco o dentista tenha correlação positiva com a ocorrência de periodontite.

Um dos pontos fortes deste estudo é a originalidade, uma vez que não foram identificados estudos prévios que estimassem as concentrações de citocinas e biomarcadores de metabolismo ósseo na saliva em indivíduos com AF. A avaliação imunológica por meio da saliva é um método não-invasivo, de fácil coleta, que gera mínimo desconforto ao paciente (Kirkwood et al., 2007; Taylor, 2014) e que pode ainda refletir um perfil imunológico que se expressa a nível sérico, atuando como uma ferramenta interessante para o entendimento do comportamento de citocinas e quimiocinas nestes indivíduos (Loo et al., 2010; Liu & Duan, 2012).

Ressalta-se ainda a avaliação do efeito de mediação dos biomarcadores salivares, agrupados em CPs, na possível associação entre a hemoglobinopatia e periodontites, por meio da SEM. O método SEM foi aplicado para analisar os efeitos diretos e indiretos dos fatores associados ao desfecho de interesse (periodontite) e para revelar as relações entre esses fatores a partir de um modelo teórico sustentado pela literatura (Kline, 2011). Já a PCA foi realizada para o entendimento das relações entre os grupos de biomarcadores salivares e as

exposições/desfechos. Esta técnica, proposta por Hotelling, permite extrair a informação importante dos dados a partir de um padrão de similaridade das variáveis e representá-las como um conjunto de novas variáveis (Khader, 2006). As combinações lineares desses índices e medidas podem ser formadas usando análise de componentes e fatores principais para determinar resultados simultaneamente, ao invés de examinar um ou outro separadamente (Abdi & Williams, 2010).

Entre as limitações deste estudo estão a dificuldade da determinação de um fator causal associado unicamente à resposta imunológica exibida pelo padrão salivar, uma vez que as DPs são doenças infecciosas de caráter multifatorial. Portanto, avaliações da constituição da microbiota subgingival, do biofilme, dos achados histopatológicos nas lesões periodontais e da concentração de anticorpos locais presentes no fluido crevicular gengival podem apontar dados importantes para a compreensão da evolução das DPs (Buduneli & Kinane, 2011) em indivíduos com AF. Outra limitação diz respeito ao desenvolvimento da periodontite que tem caráter crônico e progressivo, o que impediria que os dados transversais deste estudo levantassem inferências sobre as direções causais e sucessivas entre a exposição e os desfechos de interesse. No entanto, como o registro da exposição foi feito ao nascimento, é possível afirmar a antecedência temporal da exposição.

Por fim, concluiu-se que há alterações nas concentrações dos biomarcadores salivares em indivíduos com AF, que podem refletir as alterações séricas desses mediadores. Entretanto, estas alterações não são mediadoras da associação entre AF e periodontite.

Referências

- Abdi, H. & Williams, L.J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, **2**, 433–459.
- Albandar, J.M. (2002) Periodontal diseases in North America. *Periodontology 2000*, **29**, 31–69.
- Albandar, J.M., Brunelle, J.A. & Kingman, A. (1999) Destructive Periodontal Disease in Adults 30 Years of Age and Older in the United States, 1988-1994. *Journal of Periodontology*, **70**, 13–29.
- Assis, A., Conran, N., Canalli, A.A., Lorand-Metze, I., Saad, S.T.O. & Costa, F.F. (2005) Effect of Cytokines and Chemokines on Sickle Neutrophil Adhesion to Fibronectin. *Acta Haematologica*, **113**, 130–136.
- Bartold, P.M., Cantley, M.D. & Haynes, D.R. (2010) Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, **53**, 55–69.
- Branco-de-Almeida, L.S., Cruz-Almeida, Y., Gonzalez-Marrero, Y., Huang, H., Aukhil, I., Harrison, P., Wallet, S.M. & Shaddox, L.M. (2017) Local and Plasma Biomarker Profiles in Localized Aggressive Periodontitis. *JDR Clinical & Translational Research*, **XX**, 258–268.
- Brazilian Market Research Association (2015) Changes in the application of the Brazilian

- Criteria in force as of January 1 st , Available at: <http://www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=11&p=en>.
- Buduneli, N. & Kinane, D.F. (2011) Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, **38**, 85–105.
- da Silva, B. B., Pontes, A. E. F., Lemos, C. A. A., & Ortega, R. M. (2023). Association between sickle cell disease and periodontal disease: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, **00**:1-8.
- de Carvalho, H.L.C.C., Thomaz, E.B.A.F., Alves, C.M.C. & Souza, S.F.C. (2015) Are sickle cell anaemia and sickle cell trait predictive factors for periodontal disease? A cohort study. *Journal of Periodontal Research*, **51**, 622–629.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, **45**, S1– S8 .
- Chambrone, L., Chambrone, D., Lima, L.A. & Chambrone, L.A. (2010) Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: a systematic review of observational studies. *Journal of Clinical Periodontology*, **37**, 675–684.
- Chambrone, L., Preshaw, P.M., Rosa, E.F., Heasman, P.A., Romito, G.A., Pannuti, C.M. & Tu, Y.-K. (2013) Effects of smoking cessation on the outcomes of non-surgical periodontal therapy: a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, **40**, 607–615.
- Chen, B., Wu, W., Sun, W., Zhang, Q., Yan, F. & Xiao, Y. (2014) RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *BioMed research international*, **2014**, 731039.
- Cook, K.F., Kallen, M.A. & Amtmann, D. (2009) Having a fit: impact of number of items and distribution of data on traditional criteria for assessing IRT's unidimensionality assumption. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*, **18**, 447–60.
- Costa, S. A., Moreira, A. R. O., Costa, C. P. S., & Carvalho Souza, S. D. F. (2020). Iron overload and periodontal status in patients with sickle cell anaemia: A case series. *Journal of Clinical Periodontology*, **47**(6), 668-675.
- Franco-Penteado, C.F., Hyslop, S., Conran, N., Saad, S.T.O. & Costa, F.F. (2006) Increased Levels and Activities of Matrix Metalloproteinases in Sickle Cell Disease. *Blood*, **108**, 1220.
- Giuca, M., Pasini, M., Tecco, S., Giuca, G., Marzo, G., Shilpashree, H., Sarapur, S., Sistig, S., Vucićević-Boras, V., Lukac, J., Kusić, Z., Edholm, E., Bengten, E., Wilson, M., Giuca, M., Giuggioli, E., Metelli, M., Pasini, M., Iezzi, G., Ercole, S.D., et al. (2014) Levels of salivary immunoglobulins and periodontal evaluation in smoking patients. *BMC Immunology*, **15**, 5.
- Kaur, S., White, S. & Bartold, M. (2012) Periodontal Disease as a Risk Factor for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *JBIC library of systematic reviews*, **10**, 1–12.
- Keikhaei, B., Mohseni, A.R., Norouzirad, R., Alinejadi, M., Ghanbari, S., Shiravi, F. & Solgi, G. (2013) Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *European cytokine network*, **24**, 45–52.
- Khader, Y.S. (2006) Factors associated with periodontal diseases in Jordan: principal component and factor analysis approach. *Journal of oral science*, **48**, 77–84.
- Kline, R.B. (2011) Principles and practice of structural equation modeling Guilford Press.

- Lanzkron, S., Carroll, C.P. & Haywood, C. (2013) Mortality Rates and Age at Death from Sickle Cell Disease: U.S., 1979–2005. *Public Health Reports*, **128**, 110–116.
- Lee, C.T., Huang, H.Y., Sun, T.C. & Karimbux, N. (2015) Impact of Patient Compliance on Tooth Loss during Supportive Periodontal Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of dental research*, **94**, 777–86.
- León, D.A.D., Maria, J. & Fachel, G. (2011) Análise Fatorial Confirmatória através dos Softwares R e Mplus. Available at: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/31630>.
- Liem, R.I., Chan, C., Vu, T.-H.T., Fornage, M., Thompson, A.A., Liu, K. & Carnethon, M.R. (2017) Association among sickle cell trait, fitness, and cardiovascular risk factors in CARDIA. *Blood*, **129**, 723–728.
- Liu, J. & Duan, Y. (2012) Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, **48**, 569–577.
- Loo, J.A., Yan, W., Ramachandran, P. & Wong, D.T. (2010) Comparative human salivary and plasma proteomes. *Journal of Dental Research*, **89**, 1016–23.
- Kinane, D.F., Peterson, M. & Stathopoulou, P.G. (2006) Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000*, **40**, 107–119
- Kirkwood, K.L., Cirelli, J.A., Rogers, J.E. & Giannobile, W. V. (2007) Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontology 2000*, **43**, 294–315.
- Mahmoud, M. O., Ghandour, I. A., & Attalla, B. (2013). Association between sickle cell anaemia and periodontal diseases among 12-to 16-year-old Sudanese children. *Oral health & preventive dentistry*, 11(4).
- Martellacci, L., Quaranta, G., Patini, R., Isola, G., Gallenzi, P., & Masucci, L. (2019). A literature review of metagenomics and culturomics of the peri-implant microbiome: current evidence and future perspectives. *Materials*, **12**(18), 3010.
- Matarese, G., Currò, M., Isola, G., Caccamo, D., Vecchio, M., Giunta, M. L., ... & Ientile, R. (2015). Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiated macrophages. *Amino Acids*, **47**, 2447-2455.
- Nourai, M., Cheng, K., Niu, X., Moore-King, E., Fadojutimi-Akinsi, M.F., Minniti, C.P., Sable, C., Rana, S., Dham, N., Campbell, A., Ensing, G., Kato, G.J., Gladwin, M.T., Castro, O.L. & Gordeuk, V.R. (2011) Predictors of osteoclast activity in patients with sickle cell disease. *Haematologica*, **96**, 1092–8.
- Passos, C.P., Santos, P.R.B., Aguiar, M.C., Cangussu, M.C.T., Toralles, M.B.P., da Silva, M.C.B.O., Nascimento, R.J.M. & Campos, M.I.G. (2012) Sickle cell disease does not predispose to caries or periodontal disease. *Special Care in Dentistry*, **32**, 55–60.
- Preshaw, P.M. & Taylor, J.J. (2011) How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology*, **38**, 60–84.
- Sarray, S., Saleh, L.R., Lisa Saldanha, F., Al-Habboubi, H.H., Mahdi, N. & Almawi, W.Y. (2015) Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*, **72**, 43–47.
- Schündeln, M.M., Goretzki, S.C., Hauffa, P.K., Wieland, R., Bauer, J., Baeder, L., Eggert, A., Hauffa, B.P. & Grasmann, C. (2014) Impairment of Bone Health in Pediatric Patients with Hemolytic Anemia. *PLoS ONE*, **9**, e108400.
- Segel, G.B., Halterman, M.W. & Lichtman, M.A. (2011) The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of Leukocyte Biology*, **89**, 359–372.
- Sorsa, T., Tjäderhane, L. & Salo, T. (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*, **10**, 311–318.
- Souza, S., de Carvalho, H., Costa, C. & Thomaz, E. (2017) Association of sickle cell haemoglobinopathies with dental and jaw bone abnormalities. *Oral Diseases* 24(3), 393-

- 403.
- Taylor, J.J. (2014) Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN inflammation*, **2014**, 593151.
- Tonguç, M. Ö., Öztürk, C., Polat, G., Bobuşoğlu, O., Tek, S. A., Taşdelen, B., & Ünal, S. (2022). Investigation of the relationship between periodontal and systemic inflammation in children with Sickle Cell Disease: A case-control study. *Cytokine*, **149**, 155724.
- Veiga, P.C., Schroth, R.J., Guedes, R., Freire, S.M. & Nogueira-Filho, G. (2013) Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Archives of Oral Biology*, **58**, 505–10.
- Velsko, I.M., Cruz-Almeida, Y., Huang, H., Wallet, S.M. & Shaddox, L.M. (2017) Cytokine response patterns to complex biofilms by mononuclear cells discriminate patient disease status and biofilm dysbiosis. *Journal of oral microbiology*, **9**, 1330645.
- Von Elm, E., Altman, D. G., Egger, M., Pocock, S. J., Gøtzsche, P. C., & Vandenbroucke, J. P. (2007). The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *The Lancet*, **370**(9596), 1453-1457.
- Yawn, B.P. (2015) Management of Sickle Cell Disease: Recommendations from the 2014 Expert Panel Report. *American Family Physician*, **92**, 1069-76.

3. CAPÍTULO II

O METABOLISMO ÓSSEO DE INDIVÍDUOS COM TRAÇO FALCIFORME INFLUENCIA A EXTENSÃO E A PROGRESSÃO DA PERIODONTITE? UMA SÉRIE DE CASOS

(submetido ao periódico Journal of Clinical Periodontology)

Halinna Larissa Cruz Correira de Carvalho Buonocore, Susilena Arouche Costa, Ana Regina Oliveira Moreira, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Mayara Cristina Pinto da Silva, Johnny Ramos do Nascimento, Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz, Soraia de Fátima Carvalho Souza

RESUMO

Objetivo: Estudos prévios mostraram que indivíduos com Traço Falciforme (TF) apresentam maior risco de periodontite. Investigamos a associação entre biomarcadores de metabolismo ósseo e parâmetros periodontais em indivíduos com TF.

Materiais e métodos: Esta série de casos incluiu 123 indivíduos com TF. Os níveis de Osteoprotegerina (OPG), RANK-L e a razão RANK-L/OPG foram avaliados em amostras de saliva não estimulada. A avaliação clínica periodontal foi realizada em seis sítios por dente e todos os participantes foram submetidos ao exame radiográfico periapical completo. O desfecho primário foi a taxa de progressão da doença periodontal definida pela razão entre a porcentagem de perda óssea do pior dente afetado/idade e dicotomizada em: (1) progressão lenta a moderada ($\text{razão} \leq 1$) e (2) progressão rápida ($\text{razão} > 1$). A extensão da periodontite foi avaliada pelo (1) número de dentes com nível de inserção clínica (NIC) ≥ 4 mm e (2) número de dentes com profundidade clínica de sondagem (PCS) ≥ 4 mm. Razões de Média (RM) e Razões de Prevalência (RP) bruta e ajustada para sexo, classe socioeconômica, tabagismo, álcool, última visita ao dentista e comorbidades foram estimadas por meio de análises de regressão de Poisson e Logística.

Resultados: Maior nível de OPG foi associado à rápida progressão da doença periodontal (RP 2.55, IC95% 1.11-5.84, $p=0.026$), ao maior número de dentes com NIC ≥ 4 mm (RM 1.48, IC95% 1.18-1.85, $p=0.001$) e com PCS ≥ 4 mm (RM 2.01, IC95% 1.53-2.63, $P<0.001$). A razão RANK-L/OPG foi inversamente associada ao número de dentes com PCS ≥ 4 mm (RM 0.76, IC95% 0.59-0.97, $p=0.03$).

Conclusão: Aumento de OPG e redução de RANK-L podem refletir alterações no metabolismo ósseo que resultam em maior taxa de progressão e maior extensão da periodontite em pacientes com traço falciforme.

Palavras-chave: traço falciforme; periodontite; reabsorção óssea; perda óssea alveolar.

INTRODUÇÃO

Traço falciforme (TF) é o termo utilizado para descrever a presença de uma substituição heterozigótica de ácido glutâmico pela valina no gene da β -globina no cromossomo 11 (HbS); assim, um indivíduo TF (HbAS) recebe o gene recessivo HbS de apenas um dos pais (Naik et al., 2018). Embora a maioria dos indivíduos com traço falciforme sejam assintomáticos, o traço HbAS é um fator de risco para diversas complicações clínicas tais como embolismo pulmonar, doença renal crônica e rabdomiólise (Naik et al., 2018).

Estudos referentes às condições bucais de indivíduos com traço falciforme ainda são escassos. Nosso grupo de pesquisa mostrou anteriormente que indivíduos com traço falciforme apresentaram mais chances de ter doenças periodontais, tanto gengivite quanto periodontite, além de apresentarem maior perda óssea alveolar quando comparados ao grupo controle (de Carvalho et al., 2016). Entretanto, mecanismos biológicos envolvidos na associação entre traço falciforme e doenças periodontais ainda não estão esclarecidos.

É possível que alterações no metabolismo ósseo possam justificar a associação entre traço falciforme e doenças periodontais. Essa hipótese foi levantada considerando pesquisas conduzidas em modelos animais que demonstraram massa óssea significativamente reduzida e déficits na integridade da matriz cortical e/ou conteúdo mineral em camundongos com traço falciforme (Xiao et al., 2016). Além disso, níveis mais baixos de marcadores de metabolismo ósseo como osteocalcina, diminuição compensatória de sRANKL com aumento compensatório de osteoprotegerina (OPG) foram identificados nessa população (Tombak et al., 2020). Nessa perspectiva, cabe destacar que a osteoprotegerina (OPG), ativador do receptor do fator nuclear κ B (RANK) e ativador do receptor do ligante do fator nuclear κ B (RANK-L) são membros da família do fator de necrose tumoral (TNF), servindo como reguladores cruciais da osteoclastogênese e reabsorção óssea, com um papel fundamental na periodontite (Bostanci et al., 2007; Mogi et al., 2004). Um aumento na concentração de RANK-L e uma diminuição na concentração de OPG têm sido detectados no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite (Bostanci et al., 2007; Mogi et al., 2004).

Assim, considerando que alterações do metabolismo ósseo em indivíduos traço falciforme podem implicar em maior susceptibilidade à periodontite e maior perda óssea alveolar, podendo resultar em maior taxa de progressão da periodontite, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre biomarcadores salivares de reabsorção óssea (RANKL e OPG), taxa da progressão de perda óssea alveolar e extensão da periodontite em indivíduos com traço falciforme.

MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo série de casos realizado no Setor de Odontologia da Supervisão de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR) em São Luís, MA, Brasil. A HEMOMAR atua como centro de referência para o Maranhão nas áreas de Hematologia e Hemoterapia e auxilia no diagnóstico e pesquisa de diversas doenças hematológicas hereditárias e adquiridas.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (protocolo n° 472.943/2013) e participaram do estudo aqueles indivíduos com traço falciforme que voluntariamente aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Amostra do estudo

Os indivíduos com traço falciforme (n=123) foram selecionados aleatoriamente dentre os parentes de indivíduos com doenças falciformes atendidos na HEMOMAR (de Carvalho et al., 2016), desde que possuíssem o diagnóstico por meio de eletroforese na ocasião do nascimento.

Indivíduos que relataram tratamento periodontal e/ou antibioticoterapia e uso de anti-inflamatórios nos últimos seis meses, que estivessem em tratamento ortodôntico ou recebido tratamento ortodôntico prévio, edêntulos e mulheres que estivessem grávidas ou amamentando foram excluídos do estudo.

Avaliação dos níveis de biomarcadores salivares

Realizou-se coleta de saliva não estimulada, com o auxílio de recipientes individuais e esterilizados. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 15 minutos), aliquotadas e armazenadas a -80°C até as análises.

A quantificação das moléculas de OPG e RANK-L foi realizada por meio do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Foram utilizados os kits “Human TRANCE/RANK L/TNFSF11 DuoSet ELISA” e “Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B DuoSet ELISA”, seguindo as orientações do fabricante (R&D Systems® - Minneapolis, MN, EUA). As análises foram realizadas em triplicata e as concentrações foram quantificados em pg/ml e categorizadas em tercís.

Exame Radiográfico

A obtenção e o processamento radiográfico foram realizados de forma padronizada conforme descrito em estudo prévio (de Carvalho et al., 2016). A perda óssea

alveolar foi avaliada nas faces mesial e distal de cada dente, por meio de radiografias periapicais, utilizando régua de Shei. Esta régua consiste em uma série de linhas equidistantes que divergem de um ponto comum, com 10 intervalos, cada um representando 1mm (10%) de perda óssea. As imagens radiográficas foram analisadas por três examinadores treinados (κ inter e intra-examiner=0.83).

Avaliação dos parâmetros clínicos periodontais

As avaliações clínicas periodontais foram realizadas sob luz artificial com auxílio de espelho bucal e sonda periodontal milimetrada Williams (Hu-Friedy, Chicago, EUA), por um único examinador ($k=0.82$).

Os parâmetros clínicos periodontais avaliados em 6 sítios por dente, com exceção dos terceiros molares, foram: (1) Profundidade Clínica de Sondagem (PCS), considerada como a distância (mm) entre a margem gengival e o fundo do sulco/bolsa periodontal e (2) Nível de Inserção Clínica (NIC), considerado como a distância (mm) entre a junção cimento-esmalte e o fundo do sulco/bolsa periodontal.

Desfechos primário e secundários

O desfecho primário deste estudo foi a taxa de progressão da doença periodontal. Essa variável foi definida pela razão entre a porcentagem de perda óssea radiográfica no pior dente afetado e a idade (Tonetti et al., 2018). Esta variável foi dicotomizada em: (1) progressão lenta a moderada (razão ≤ 1) e (2) progressão rápida (razão > 1) (Tonetti et al., 2018).

Um caso de periodontite foi definido quando: (1) foram detectados perda de inserção clínica interproximal em 2 dentes ou mais não adjacentes, ou (2) foram detectados 2 dentes ou mais com sítio vestibular afetado por $NIC \geq 3\text{mm}$ e $PCS > 3\text{mm}$ (no mesmo local) (Tonetti et al., 2018).

A extensão da periodontite avaliada pelo (1) número de dentes afetados por $NIC \geq 4\text{mm}$ e (2) número de dentes afetados por $PCS \geq 4\text{mm}$ também foram considerados como desfechos nas análises de sensibilidade.

Covariáveis

Os dados referentes ao sexo (masculino ou feminino), idade (em anos), classe socioeconômica de acordo com o critério estabelecido pela ABEP (A, B, C, D ou E) (Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, 2016), tabagismo (0-não; 1-sim), consumo de álcool (0-não; 1-sim), última visita ao dentista (0-nunca visita; 1-mais de 1 ano; 2-

menos de 1 ano) e presença de comorbidades (0-não; 1-sim), tais como diabetes, doença renal crônica, hipertensão e doenças cardiovasculares, foram obtidos por meio de questionário estruturado.

Análise Estatística

Foram estimadas frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas bem como média e desvio padrão para variáveis numéricas.

As associações de interesse foram estimadas por meio de análises de regressão. Razões de média (RM) bruta e ajustadas para as covariáveis sexo, idade, classe socioeconômica, tabagismo, álcool, última visita ao dentista e comorbidades foram estimadas utilizando-se Regressão de Poisson quando o desfecho foi contagem (número de sítios afetados por $NIC \geq 4\text{mm}$ ou $PCS \geq 4\text{mm}$). Razões de Prevalência (RP) bruta e ajustada para as covariáveis sexo, idade, classe socioeconômica, tabagismo, álcool, última visita ao dentista e comorbidades foram estimados utilizando-se Regressão Logística quando o desfecho foi categórico (progressão da doença periodontal e periodontite). Intervalos de confiança a 95% foram estimados em todas as análises.

As análises estatísticas foram realizadas no software Stata versão 12.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA) considerando nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as características demográficas e socioeconômicas, hábitos comportamentais, estado geral de saúde, aspectos relacionados à saúde bucal dos indivíduos com traço falciforme e os níveis salivares dos biomarcadores de reabsorção óssea ($n=123$). A amostra foi composta especialmente por mulheres (91.06%), com idade média de 33,3 anos (± 7.51), pertencentes à classe socioeconômica C (52.85%), dos quais 8.95 % relataram histórico de tabagismo e 30.89% relataram consumo de bebidas alcoólicas. Comorbidades foram relatadas por 21.14% e a maior parte da amostra (63.42%) relatou última visita ao dentista há mais de um ano. A periodontite foi observada em 76.42%, sendo que 25.21% apresentaram rápida progressão da periodontite (**Tabela 1**).

Tabela 1. Análise descritiva da amostra incluída no estudo (n=123), São Luís-MA, Brasil.

	n	%
Sexo		
Masculino	11	8.94
Feminino	112	91.06
Tabagismo		
Não	112	91.06
Sim	11	8.95
Bebidas alcoólicas		
Não	85	69.11
Sim	38	30.89
Classe Socioeconômica		
A-B	12	9.76
C	65	52.85
D	37	30.08
E	9	7.32
Última visita ao dentista		
Nunca visitou	3	2.44
Mais de 1 ano	78	63.42
1 ano	42	34.15
Comorbidades		
Não	97	78.86
Sim	26	21.14
Periodontite		
Não	29	23.58
Sim	94	76.42
Progressão da Periodontite		
Sem periodontite	29	23.58
Lenta a Moderada	63	51.21
Rápida	31	25.21
	Média	Desvio Padrão
Idade	33.3	7.51
Nº dentes com sítios NIC \geq 4mm	5.69	5.29
Nº dentes com sítios PCS \geq 4mm	4.97	5.29
OPG (pg/ml)	7846.9	6073.0
RANKL (pg/ml)	1529.5	695.67

NIC: nível de inserção clínica; PCS: profundidade clínica de sondagem

Após análises ajustadas para as covariáveis, maior tercil de OPG foi associado à rápida progressão da doença periodontal (OR 2.55, IC95% 1.11-5.84, $p=0.026$), ao maior número de dentes com $NIC \geq 4\text{mm}$ (RM 1.48, IC95% 1.18-1.85, $p=0.001$) e ao maior número de dentes com $PCS \geq 4\text{mm}$ (RM 2.01, IC95% 1.53-2.63, $P<0.001$). O maior tercil da razão Rank-L/OPG foi inversamente associado ao número de dentes com $PCS \geq 4\text{mm}$ (RM 0.76, IC95% 0.59-0.97, $p=0.03$) nas análises bruta e ajustada (**Tabela 2**).

Tabela 2. Associação entre biomarcadores de reabsorção óssea, periodontite, extensão e progressão da periodontite em indivíduos com traço falciforme ($n=123$), São Luís-MA, Brasil.

	Periodontite		$NIC \geq 4\text{mm}$		$PCS \geq 4\text{mm}$		Progressão da periodontite	
	Modelo Bruto	Modelo Ajustado						
	RP (IC 95%) p-valor	RP (IC 95%) p-valor	RM (IC 95%) p-valor	RM (IC 95%) p-valor	RM (IC 95%) p-valor	RM (IC 95%) p-valor	RP (IC 95%) p-valor	RP (IC 95%) p-valor
Rank-L								
1° tercil	Ref.							
2° tercil	1.14 (0.91-1.44) P=0.23	1.16 (0.92-1.45) P=0.18	1.04 (0.86-1.26) P=0.64	1.08 (0.89-1.31) P=0.43	1.08 (0.88-1.31) P=0.42	1.10 (0.90-1.35) P=0.33	1.27 (0.66-2.44) P=0.46	1.57 (0.79-3.12) P=0.190
3° tercil	0.98 (0.76-1.26) P=0.92	1. (0.78-1.29) P=0.97	0.96 (0.80-1.14) P=0.66	1.04 (0.87-1.25) P=0.60	0.87 (0.72-1.05) P=0.15	0.92 (0.74-1.11) P=0.36	1.26 (0.69-2.30) P=0.44	1.68 (0.89-3.19) P=0.10

OPG									
1° tercil	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
2° tercil	1.19 (0.86-1.65) P=0.28	1.18 (0.85-1.64) P=0.30	1.23 (0.98-1.55) P=0.06	1.21 (0.95-1.54) P=0.11	1.83 (1.40-2.41) P<0.001	1.71 (1.28-2.28) P<0.001	1.26 (0.54-2.96) P=0.58	2.20 (1.02-4.72) P=0.042	
3° tercil	1.22 (0.90-1.67) P=0.192	1.24 (0.91-1.70) P=0.16	1.58 (1.26-1.96) P<0.001	1.48 (1.18-1.85) P=0.001	2.24 (1.73-2.90) P<0.001	2.01 (1.53-2.63) P<0.001	1.24 (0.51-3.01) P=0.62	2.55 (1.11-5.84) P=0.026	
Razão Rankl/Opg									
1° tercil	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
2° tercil	0.97 (0.78-1.21) P=0.81	0.95 (0.77-1.18) P=0.96	0.87 (0.74-1.02) P=0.10	0.90 (0.76-1.06) P=0.24	0.83 (0.70-0.99) P=0.039	0.88 (0.74-1.05) P=0.16	0.78 (0.44-1.37) P=0.39	0.82 (0.46-1.45) P=0.50	
3° tercil	0.98 (0.74-1.28) P=0.883	1.0 (0.76-1.31) P=0.96	0.77 (0.62-0.95) P=0.016	0.92 (0.73-1.12) P=0.37	0.64 (0.50-0.81) P<0.001	0.77 (0.59-0.97) P=0.030	0.84 (0.44-1.37) P=0.39	0.85 (0.42-1.75) P=0.67	

RM: razão de médias; RP: razão de prevalência; IC95%: intervalo de confiança a 95%.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, maiores níveis salivares de OPG foram associados à rápida progressão e a maior extensão da periodontite (número de dentes com $PCS \geq 4\text{mm}$ e $NIC \geq 4\text{mm}$); enquanto maior razão RANK-L/OPG apresentou associação inversa com o número de dentes afetados por $PCS \geq 4\text{mm}$ em indivíduos com traço falciforme. Assim, é possível que haja um aumento nos níveis de OPG como consequência de alterações no metabolismo ósseo que parecem contribuir para a maior degradação dos tecidos periodontais nesses pacientes.

Nossos resultados são intrigantes já que RANK-L é um *cell membrane-bound* fator responsável por estimulação da diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea, enquanto OPG atua como um *decoy receptor*, bloqueando a ligação do RANK-L ao seu receptor celular RANK na membrana das células precursoras dos osteoclastos, assim, reduzindo a reabsorção óssea (Boyle et al., 2003). Em indivíduos sistemicamente saudáveis, a nível local, OPG está associado à saúde periodontal e à menor perda óssea; ao passo que a concentração de RANK-L e a relação RANK-L/OPG tendem a aumentar com o avanço da periodontite (Bostanci et al., 2007; Mogi et al., 2004). Ressaltamos que outros estudos avaliando níveis de biomarcadores de reabsorção óssea em indivíduos com TF não foram identificados, o que dificulta as comparações dos achados desse estudo. Entretanto, apesar de termos avaliado os níveis desses biomarcadores em saliva, de forma similar ao nosso estudo, níveis séricos de OPG elevados foram associados à perda de inserção periodontal e à gravidade da doença periodontal em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo I (Antonoglou et al., 2013; Lappin et al., 2009). Portanto, parece provável que, à exemplo do que ocorre em pacientes com *diabetes mellitus* tipo I, OPG pode ser um indicador de inflamação periodontal e destruição tecidual óssea em indivíduos com TF.

Alguns estudos evidenciaram um desequilíbrio na remodelação óssea em pacientes adultos com herança HbS (Voskaridou et al., 2006). Esse desequilíbrio foi atribuído especialmente ao eixo OPG/RANK-L/RANK, sendo observado níveis de OPG relativamente elevados em tecidos ósseos necróticos, como resultado de um fenômeno compensatório (Voskaridou et al., 2006). Assim, especulamos que a saúde óssea prejudicada evidenciada em adultos com traço falciforme pode resultar em uma redução compensatória de RANK-L e aumento compensatório de OPG.

Levantamos essa especulação considerando especialmente os achados de Tombak et al. (2020), que observaram menores valores de Densidade Mineral Óssea e diminuição compensatória de sRANK-L com aumento compensatório de OPG em indivíduos com beta talassemia/traço falciforme. Voskaridou et al. (2019) também mostraram que o aumento dos níveis de OPG e aumento da atividade eritropoiética correlacionavam-se fortemente com marcadores da reabsorção óssea em indivíduos beta talassemia/traço falciforme. Além disso, a concentração observada de OPG foi mais alta em pacientes com osteoporose e é comumente considerada como um reflexo da remodelação

óssea elevada e uma resposta compensatória à ação excessiva dos osteoclastos (Voskaridou et al. 2019).

Similar ao que é observado em indivíduos com traço falciforme, as concentrações séricas de OPG foram significativamente maiores em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose do que em controles normais da mesma idade e, dentro do grupo osteoporótico, as concentrações de OPG foram maiores em mulheres com menor densidade mineral óssea, sugerindo que a concentração de OPG muda em função da massa óssea (Yano et al., 1999). Achados similares foram descritos em pacientes com Síndrome de Wilson (Hegedus et al., 2002). Dessa forma, o aumento dos níveis séricos de OPG pode refletir uma resposta compensatória ao aumento da atividade osteoclástica ou balanço negativo de remodelação óssea (Hegedus et al., 2002).

A remodelação óssea em condições HbS é altamente influenciada pela hipóxia (Carbonare et al., 2015). A HbS apresenta como característica principal a capacidade de polimerização em situações de baixa oferta de oxigênio, levando à vasclusão de capilares e pequenos vasos com subsequente lesão de isquemia/reperfusão (Carbonare et al., 2015). Embora isso ocorra com mais frequência em pacientes com herança homozigótica (HbSS), relatos em pacientes com traço falciforme também estão disponíveis na literatura (Zimmerman et al., 1974). A hipóxia decorrente da vasclusão afetou gravemente a estrutura óssea e aumentou a remodelação óssea em modelos animais com doenças falciformes (Carbonare et al., 2015), estando também associado à baixa densidade mineral óssea em população HbSS (Lal et al., 2006).

Nesse sentido, cabe ressaltar que a osteoporose tem sido associada à periodontite inclusive em pacientes jovens (Costa et al., 2021). O osso osteoporótico apresenta um desequilíbrio nas citocinas, interleucina (IL)-1 α e β , fator de necrose tumoral- α e IL-6, que são os principais intervenientes na promoção de osteoclastos, aumentando a taxa de remodelação óssea, o que pode contribuir para a maior degradação dos tecidos periodontais de suporte (Ralston, 1994), podendo ser este um mecanismo subjacente aos resultados aqui encontrados em pacientes com TF. Ressaltamos que a amostra deste estudo é majoritariamente de adultos jovens, com média de idade de 33 anos, o que pode indicar que tais indivíduos sejam predispostos à uma redução da densidade mineral óssea em fases mais precoces quando comparados a indivíduos saudáveis.

Em adição, o mecanismo inflamatório também poderia justificar as associações encontradas nesse estudo. Relações significativas entre alto nível sérico de OPG e a progressão de alterações teciduais patológicas como, por exemplo, doenças cardiovasculares e complicações do *diabetes mellitus* têm sido demonstradas na literatura (Bjerre, 2013; Secchiero et al., 2006). Altos níveis séricos de OPG parecem se relacionar com aumento de hemoglobina glicada, com a disfunção endotelial e com a aterosclerose (Bjerre, 2013; Secchiero et al., 2006); isso porque a OPG induz a expressão de moléculas de adesão intercelular, como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e

a E-selectina, promovendo a adesão de leucócitos (Bjerre, 2013; Secchiero et al., 2006; Zauli et al., 2007). Tais fatos são dignos de nota visto que a periodontite tem sido constantemente associada às doenças cardiovasculares e ao *diabetes mellitus* (Khumaedi et al., 2019; Preshaw & Bissett, 2013). Assim, não podemos descartar que as associações encontradas nesse estudo sejam em decorrência da inflamação sistêmica de baixo grau.

Destacamos que embora o traço falciforme seja uma condição que reconhecidamente cursa com menos complicações quando comparada à anemia falciforme, existem estudos apontando maior risco de tromboembolismo e acidente vascular cerebral em indivíduos traço falciforme quando comparados ao controle saudáveis (Caughey et al., 2014; Folsom et al., 2015), o que reforça a possibilidade de haver um aumento da condição inflamatória sistêmica de baixo grau em indivíduos com herança heterozigótica do HbS. Fazendo um paralelo com a anemia falciforme, sabe-se que a herança homozigótica da HbS cursa com inflamação crônica, caracterizada pelo aumento da quantidade de leucócitos (Nuzzo & Fonseca, 2004), alterações nos níveis de citocinas inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator estimulador de colônias de granulócitos (GC-SF) (Loggetto et al., 1999; Nuzzo & Fonseca, 2004; Zago et al., 2007) aumento da adesividade dos eritrócitos e leucócitos e injúria ao endotélio vascular (Stypulkowski & Manfredini, 2010), que ainda não pode ser descartada no grupo de indivíduos com traço falciforme.

O presente estudo tem alguns pontos fortes que devem ser enfatizados. A condição periodontal foi examinada em toda a boca e não apenas nos dentes índices, e estimamos associações usando parâmetros clínicos (CAL e PD) e evidências radiográficas de destruição óssea. Portanto, o presente estudo considera múltiplas dimensões da doença periodontal, tais como o estado da doença atual e a história cumulativa de destruição periodontal, com evidências indiretas de progressão com base na avaliação da perda óssea em função da idade (Tonetti et al., 2018). Além disso, realizamos análise estatística multivariada que reduziu a possibilidade de encontrar associações devido ao viés de confusão.

Este estudo é uma série de casos e, portanto, tem menor rigor metodológico. No entanto, o objetivo primário de uma série de casos deve ser a geração de hipóteses que possam ser posteriormente investigadas usando outros desenhos de estudo. Ressaltamos que, apesar de ser uma série de casos, o estudo conta com uma amostra de 123 indivíduos com traço falciforme, e, além disso, é o primeiro estudo a investigar possíveis mecanismos que justifiquem a associação entre periodontite e traço falciforme. Para isso avaliamos a concentração de biomarcadores em saliva que é um fluido de diagnóstico importante devido à sua biodisponibilidade e acessibilidade não invasiva. Biomarcadores salivares têm emergindo como uma ferramenta potencial para avaliar doenças periodontais (Sukriti et al., 2020).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que aumento dos níveis salivares de OPG e redução nos níveis salivares de RANKL podem ser indicadores de destruição periodontal, evidenciada por uma maior taxa de progressão e maior extensão da periodontite em indivíduos com traço falciforme.

Referências

- Antonoglou, G., Knuuttila, M., Nieminen, P., Vainio, O., Hiltunen, L., Raunio, T., Niemelä, O., Hedberg, P., Karttunen, R., & Tervonen, T. (2013). Serum osteoprotegerin and periodontal destruction in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, *40*(8), 765–770. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12129>
- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. (2016). Critério Brasil 2015 e atualização da distribuição de classes para 2016. *Critério de Classificação Econômica Brasil*, 1–6. <http://www.abep.org/criterio-brasil>
- Bjerre, M. (2013). Osteoprotegerin (OPG) as a biomarker for diabetic cardiovascular complications. *SpringerPlus*, *2*, 1–6. <http://www.springerplus.com/content/2/1/658>
- Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Töz, H., Atilla, G., Hughes, F. J., & Belibasakis, G. N. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology*, *34*(5), 370–376. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2007.01061.X>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* *2003* *423*:6937, *423*(6937), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- Carbonare, L. D., Matte', A., Valenti, M. T., Siciliano, A., Mori, A., Schweiger, V., Zampieri, G., Perbellini, L., & De Franceschi, L. (2015). Hypoxia-reperfusion affects osteogenic lineage and promotes sickle cell bone disease. *Blood*, *126*(20), 2320–2328. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-641969>
- Caughey, M. C., Loehr, L. R., Key, N. S., Derebail, V. K., Gottesman, R. F., Kshirsagar, A. V., Grove, M. L., & Heiss, G. (2014). Sickle Cell Trait and Incident Ischemic Stroke in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke*, *45*(10), 2867. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006110>
- de Carvalho, H. L. C. C., Thomaz, E. B. A. F., Alves, C. M. C., & Souza, S. F. C. (2016). Are sickle cell anaemia and sickle cell trait predictive factors for periodontal disease? A cohort study. *Journal of Periodontal Research*, *51*(5), 622–629. <https://doi.org/10.1111/jre.12342>
- Folsom, A. R., Tang, W., Roetker, N. S., Kshirsagar, A. V., Derebail, V. K., Lutsey, P. L., Naik, R., Pankow, J. S., Grove, M. L., Basu, S., Key, N. S., & Cushman, M. (2015). Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, *13*(1), 2. <https://doi.org/10.1111/JTH.12787>
- Hegedus, D., Ferencz, V., Lakatos, P. L., Meszaros, S., Lakatos, P., Horvath, C., & Szalay, F. (2002). Decreased bone density, elevated serum osteoprotegerin, and β -cross-laps in Wilson disease. *Journal of Bone and Mineral Research*, *17*(11), 1961–1967. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.11.1961>
- Khumaedi, A. I., Purnamasari, D., Wijaya, I. P., & Soeroso, Y. (2019). The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, *13*(2), 1675–1678. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.023>
- Lal, A., Fung, E. B., Pakbaz, Z., Hackney-Stephens, E., & Vichinsky, E. P. (2006). Bone mineral density in children with sickle cell anemia. *Pediatric Blood Cancer*, *47*(7), 901–906. <https://doi.org/10.1002/pbc>
- Lappin, D. F., Eapen, B., Robertson, D., Young, J., & Hodge, P. J. (2009). Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, *36*(8), 634–641. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2009.01440.X>

- Loggeto, S. R., Pellegrini-Braga, J. A., Costa-Carvalho, B. T., & Solé, D. (1999). Immunological disorders in sickle cell disease. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 22(3), 77–82. <http://www.asbai.org.br/revistas/vol223/anemia.htm>
- Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N., & Togari, A. (2004). Differential Expression of RANKL and Osteoprotegerin in Gingival Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 83(2), 166–169. <https://doi.org/10.1177/154405910408300216>
- Naik, R. P., Smith-Whitley, K., Hassell, K. L., Umeh, N. I., De Montalembert, M., Sahota, P., Haywood, C., Jenkins, J., Lloyd-Puryear, M. A., Joiner, C. H., Bonham, V. L., & Kato, G. J. (2018). Clinical outcomes associated with sickle cell trait: A systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 169(9), 619–627. <https://doi.org/10.7326/M18-1161>
- Nuzzo, D. V. P., & Fonseca, S. F. (2004). Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria*, 80(5), 347–354. <https://doi.org/0021-7557/04/80-05/347>
- Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2013). Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(4), 849–867. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.05.012>
- Ralston, S. H. (1994). Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: Evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(6), 883–890. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090614>
- Secchiero, P., Corallini, F., Pandolfi, A., Consoli, A., Candido, R., Fabris, B., Celeghini, C., Capitani, S., & Zauli, G. (2006). An Increased Osteoprotegerin Serum Release Characterizes the Early Onset of Diabetes Mellitus and May Contribute to Endothelial Cell Dysfunction. *The American Journal of Pathology*, 169(6), 2236–2244. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060398>
- Stypulkowski, J. B., & Manfredini, V. (2010). Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(1), 56–62. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000001>
- Sukriti, K. C., Wang, X. Z., & Gallagher, J. E. (2020). Diagnostic sensitivity and specificity of host-derived salivary biomarkers in periodontal disease amongst adults: Systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(3), 289–308. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13218>
- Tombak, A., Boztepe, B., Akbayir, S., Dogru, G., & Sungur, M. A. (2020). Receptor Activator of Nuclear Factor κ -B Ligand/Osteoprotegerin Axis in Adults with Hb S/ β -Thalassemia and β -Thalassemia Trait. *Hemoglobin*, 44(5), 334–337. <https://doi.org/10.1080/03630269.2020.1811116>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 45(Suppl 20), S149–S161. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
- Voskaridou, E., Stoupa, E., Antoniadou, L., Premetis, E., Konstantopoulos, K., Papassotiriou, I., & Terpos, E. (2006). Osteoporosis and osteosclerosis in sickle cell/ β -thalassemia: The role of the RANKL/osteoprotegerin axis. *Haematologica*, 91(6), 813–816.
- Xiao, L., Andemariam, B., Taxel, P., Adams, D. J., Zempsky, W. T., Dorcelus, V., & Hurley, M. M. (2016). Loss of bone in sickle cell trait and sickle cell disease female mice is associated with reduced igf-1 in bone and serum. *Endocrinology*, 157(8), 3036–3046. <https://doi.org/10.1210/en.2015-2001>
- Yano, K., Tsuda, E., Washida, N., Kobayashi, F., Goto, M., Harada, A., Ikeda, K., Higashio, K., & Yamada, Y. (1999). Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: Increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(4), 518–527. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.4.518>
- Zago, M. A., Cristina, A., & Pinto, S. (2007). The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. In *Rev.bras. hematol. hemoter* (Vol. 29, Issue 3). <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v29n3/v29n3a03.pdf>

- Zauli, G., Corallini, F., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Celeghini, C., Tedesco, F., & Secchiero, P. (2007). Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*, *110*(2), 536–543. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-068395>
- Zimmerman, J., Mummert, K., Granatir, R., & Cioffi, R. (1974). Sickle crisis precipitated by exercise rhabdomyolysis in a patient with sickle cell trait: case report. *Military Medicine*, *139*(4), 313–315.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Indivíduos com AF e TF apresentam alterações significativas nas concentrações dos biomarcadores salivares. Há aumento nas concentrações salivares medianas de IL-6, TIMP-1, OPG e RANK-L em indivíduos com AF, contudo tais alterações não atuam como mediadoras e nem explicam a ocorrência de periodontite no grupo AF. Já em indivíduos com TF, uma maior taxa de progressão e maior extensão da periodontite pode ser explicada pelo aumento dos níveis salivares de OPG e redução nos níveis salivares de RANKL, atuando como indicadores de destruição periodontal.

Em conjunto, os dados demonstram que esses indivíduos apresentam um estado inflamatório local e sistêmico distinto de indivíduos sem essas hemoglobinopatias. Estes achados podem refletir os eventos inflamatórios e uma alteração na resposta imunológica previamente verificada no sangue, em decorrência dos fenômenos vasoclusivos característicos dessas condições.

Assim, o conhecimento do perfil imunológico de indivíduos com AF e TF e da rede complexa de fatores associados às DPs se configuram como referenciais básicas para o planejamento de ações estratégicas preventivas direcionadas para a redução e controle da periodontite. Estas ações poderão garantir atenção ao cuidado e à qualidade de vida a estas pessoas.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S. Oral and Dental Considerations in Management of Sickle Cell Anemia. **International journal of clinical pediatric dentistry**, v. 8, n. 2, p. 141–4, jan. 2015.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of periodontology**, v. 70, n. 4, p. 457–70, 12 abr. 1999.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Position Paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 8, p. 1237–1247, 11 ago. 2003.
- AMIN, C.; ADAM, S.; MOOBERRY, M. J.; KUTLAR, A.; KUTLAR, F.; ESSERMAN, D.; BRITTAIN, J. E.; ATAGA, K. I.; CHANG, J.-Y.; WOLBERG, A. S.; KEY, N. S. Coagulation activation in sickle cell trait: an exploratory study. **British Journal of Haematology**, v. 171, n. 4, p. 638–46, nov. 2015.
- ARMITAGE, G. C. Clinical evaluation of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 7, p. 39–53, fev. 1995.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal Diseases: Diagnosis. **Annals of Periodontology**, v. 1, n. 1, p. 37–215, nov. 1996.
- ARMITAGE, G. C. Diagnosis of periodontal diseases. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 8, p. 1237–47, ago. 2003.
- AROWOJOLU, M. O. Periodontal probing depths of adolescent sickle cell anaemic (SCA) Nigerians. **Journal of Periodontal Research**, v. 34, n. 1, p. 62–4, jan. 1999.
- ASSIS, A.; CONRAN, N.; CANALLI, A. A.; LORAND-METZE, I.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Effect of Cytokines and Chemokines on Sickle Neutrophil Adhesion to Fibronectin. **Acta Haematologica**, v. 113, n. 2, p. 130–136, 2005.
- ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 1, p. 403–9, 1 jan. 1998.
- BARKSBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clinical and experimental immunology**, v. 149, n. 2, p. 217–25, ago. 2007.
- BARTOLD, P. M.; CANTLEY, M. D.; HAYNES, D. R. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 53, n. 1, p. 55–69, jun. 2010.
- BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v. 40, n. 1, p. 29–49, fev. 2006.
- BASSIM, C. W.; REDMAN, R. S.; DENUCCI, D. J.; BECKER, K. L.; NYLEN, E. S. Salivary Procalcitonin and Periodontitis in Diabetes. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 7, p. 630–634, jul. 2008.

BAUM, B. J.; YATES, J. R.; SRIVASTAVA, S.; WONG, D. T. W.; MELVIN, J. E. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 4, p. 360–8, 14 out. 2011.

BELCHER, J. D.; MARKER, P. H.; WEBER, J. P.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, 2000.

BENOIST, H. M.; SECK-DIALLO, A.; DIAGNE, I.; DIOUF, A.; NDIAYE, R.; SEMBENE, M.; DIALLO, P. D. Evaluation of gingival condition in homozygous children and adolescents with sickle cell anemia in Senegal. **Odonto-stomatologie tropicale = Tropical dental journal**, v. 29, n. 116, p. 12–8, dez. 2006

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 64, n. 5s, p. 474–484, maio 1993.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–46, 15 maio 2008.

BRAGGER, U. Radiographic parameters: biological significance and clinical use. **Periodontology** 2000, v. 39, n. 1, p. 73–90, out. 2005.

BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S.; ALVES, C. M. C.; LOPES, F. F.; PEREIRA, A. de F. V.; GUERRA, R. N. M.; PEREIRA, A. L. A. Salivary IgA and periodontal treatment needs in diabetic patients. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 6, p. 550–5, 2011.

BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S.; CRUZ-ALMEIDA, Y.; GONZALEZ-MARRERO, Y.; HUANG, H.; AUKHIL, I.; HARRISON, P.; WALLET, S. M.; SHADDOX, L. M. Local and Plasma Biomarker Profiles in Localized Aggressive Periodontitis. **JDR Clinical & Translational Research**, v. XX, n. July, p. 258–268, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: saúde bucal: prevenção e cuidado**. Brasília, 2014.

BUDUNELI, N.; KINANE, D. F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, p. 85–105, mar. 2011.

CHAMBRONE, L.; PRESHAW, P. M.; ROSA, E. F.; HEASMAN, P. A.; ROMITO, G. A.; PANNUTI, C. M.; TU, Y.-K. Effects of smoking cessation on the outcomes of non-surgical periodontal therapy: a systematic review and individual patient data meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 6, p. 607–615, jun. 2013.

COSTA, C. P. S.; THOMAZ, E. B. A. F.; SOUZA, S. D. F. C. Association between sickle cell anemia and pulp necrosis. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 2, p. 177–181, 2013.

COSTA, P. P.; TREVISAN, G. L.; MACEDO, G. O.; PALIOTO, D. B.; SOUZA, S. L. S.; GRISI, M. F. M.; NOVAES, A. B.; TABA, M. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 3, p. 384–91, 2010.

CRAWFORD, J. M. Periodontal disease in sickle cell disease subjects. **Journal of Periodontology**,

v. 59, n. 3, p. 164–9, mar. 1988.

CREARY, M.; WILLIAMSON, D.; KULKARNI, R. Sickle cell disease: current activities, public health implications, and future directions. **Journal of women's health (2002)**, v. 16, n. 5, p. 575–82, jun. 2007.

DA FONSECA, M.; OUEIS, H. S.; CASAMASSIMO, P. S. Sickle cell anemia: a review for the pediatric dentist. **Pediatric dentistry**, v. 29, n. 2, p. 159–69, jan. 2007.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 481–490, 1 jul. 2010.

DA SILVA, B. B., PONTES, A. E. F., LEMOS, C. A. A., ORTEGA, R. M. Association between sickle cell disease and periodontal disease: A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, 2023.

DE CARVALHO, H. L. C. C.; ROLIM, J. Y. S.; THOMAZ, É. B. A. F.; SOUZA, S. D. F. C. Are dental and jaw changes more prevalent in a Brazilian population with sickle cell anemia? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 124, n. 1, 2017.

DE CARVALHO, H. L. C. C.; THOMAZ, E. B. A. F.; ALVES, C. M. C.; SOUZA, S. F. C. Are sickle cell anaemia and sickle cell trait predictive factors for periodontal disease? A cohort study. **Journal of periodontal research**, v. 51, n. 5, p. 622–629, 16 dez. 2015.

FRY, P. H. The significance of sickle cell anemia within the context of the Brazilian government's "racial policies" (1995-2004). **Historia, ciencias, saude--Manguinhos**, v. 12, n. 2, p. 347–70, 2005.

GIANNOBILE, W. V.; BEIKLER, T.; KINNEY, J. S.; RAMSEIER, C. A.; MORELLI, T.; WONG, D. T. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology 2000**, v. 50, n. 1, p. 52–64, jun. 2009

GOLDSMITH, J. C.; BONHAM, V. L.; JOINER, C. H.; KATO, G. J.; NOONAN, A. S.; STEINBERG, M. H. Framing the research agenda for sickle cell trait: building on the current understanding of clinical events and their potential implications. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 3, p. 340–6, mar. 2012.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 143–53, 6 fev. 2011.

GUZELDEMIR, E.; TOYGAR, H. U.; BOGA, C.; CILASUN, U. Dental and periodontal health status of subjects with sickle cell disease. **Journal of Dental Sciences**, v. 6, n. 4, p. 227–234, 2011.

HANNAS, A. R.; PEREIRA, J. C.; GRANJEIRO, J. M.; TJÄDERHANE, L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 65, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2007.

HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G.; NATH, K. A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 271–92, dez. 2009.

HELLER, P.; BEST, W. R.; NELSON, R. B.; BECKTEL, J. Clinical Implications of Sickle-Cell Trait and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Hospitalized Black Male Patients. **New**

England Journal of Medicine, v. 300, n. 18, p. 1001–1005, 3 maio 1979.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical Implications of the Osteoprotegerin/RANKL/RANK System for Bone and Vascular Diseases. **JAMA**, v. 292, n. 4, p. 490, 28 jul. 2004.

IRWIN, C. R.; MYRILLAS, T. T. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. **Oral diseases**, v. 4, n. 1, p. 43–7, mar. 1998.

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American journal of hematology**, v. 84, n. 9, p. 618–25, set. 2009.

KAUSHANSKY, K.; LEVI, M. **Williams hematology : hemostasis and thrombosis**. 9. ed. New York : McGraw-Hill Education, 2016.

KEIKHAEI, B.; MOHSENI, A. R.; NOROUZIRAD, R.; ALINEJADI, M.; GHANBARI, S.; SHIRAVI, F.; SOLGI, G. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European cytokine network**, v. 24, n. 1, p. 45–52, mar. 2013.

KELLEHER, M.; BISHOP, K.; BRIGGS, P. Oral complications associated with sickle cell anemia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 82, n. 2, p. 225–228, ago. 1996.

KEY, N. S.; DEREBAIL, V. K. Sickle-cell trait: novel clinical significance. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2010, p. 418–22, jan. 2010.

KINANE, D. F.; DARBY, I. B.; SAID, S.; LUOTO, H.; SORSA, T.; TIKANOJA, S.; MÄNTYLÄ, P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 4, p. 400–4, ago. 2003.

KINNEY, J. S.; MORELLI, T.; BRAUN, T.; RAMSEIER, C. A.; HERR, A. E.; SUGAI, J. V.; SHELBURNE, C. E.; RAYBURN, L. A.; SINGH, A. K.; GIANNOBILE, W. V. Saliva/Pathogen Biomarker Signatures and Periodontal Disease Progression. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 6, p. 752–758, 15 jun. 2011.

KINNEY, J. S.; RAMSEIER, C. A.; GIANNOBILE, W. V. Oral Fluid-Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, n. 1, p. 230–251, 1 mar. 2007.

KOIDE, M.; KINUGAWA, S.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. **Periodontology 2000**, v. 54, n. 1, p. 235–246, 16 ago. 2010.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S.; EMBERY, G.; WADDINGTON, R. J.; HALL, R. C.; LAST, K. S.; TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 193–214, 1997.

LERVOLINO, L. G.; BALDIN, P. E. A.; PICADO, S. M.; CALIL, K. B.; VIEL, A. A.; CAMPOS, L. A. F. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2011.

LIEM, R. I.; CHAN, C.; VU, T.-H. T.; FORNAGE, M.; THOMPSON, A. A.; LIU, K.; CARNETHON, M. R. Association among sickle cell trait, fitness, and cardiovascular risk factors in CARDIA. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 723–728, 9 fev. 2017.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral Oncology**, v. 48, n. 7, p. 569–577, jul. 2012.

MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E. C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Annals of Hematology**, v. 79, n. 8, p. 407–413, 15 ago. 2000.

MALEMUD, C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 1696–701, 1 maio 2006.

NAGASAWA, T.; KIJI, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; LU, H.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHY, G.; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontology 2000**, v. 43, n. 1, p. 65–84, fev. 2007.

NUNES, L. A. S.; BREZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 17-18, p. 1440–1444, dez. 2011.

ONWUBALILI, J. K. Sickle cell disease and infection. **The Journal of Infection**, v. 7, n. 1, p. 2–20, jul. 1983.

PASSOS, C. P.; SANTOS, P. R. B.; AGUIAR, M. C.; CANGUSSU, M. C. T.; TORALLES, M. B. P.; DA SILVA, M. C. B. O.; NASCIMENTO, R. J. M.; CAMPOS, M. I. G. Sickle cell disease does not predispose to caries or periodontal disease. **Special Care in Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 55–60, mar. 2012.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, p. 60–84, mar. 2011.

QUINN, C. T.; LEE, N. J.; SHULL, E. P.; AHMAD, N.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 544–548, 15 jan. 2008.

RATHNAYAKE, N.; ÅKERMAN, S.; KLINGE, B.; LUNDEGREN, N.; JANSSON, H.; TRYSELIUS, Y.; SORSA, T.; GUSTAFSSON, A. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

SEARS, D. A. The morbidity of sickle cell trait: a review of the literature. **The American journal of medicine**, v. 64, n. 6, p. 1021–36, jun. 1978.

SEGEL, G. B.; HALTERMAN, M. W.; LICHTMAN, M. A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 3, p. 359–372, mar. 2011.

SILVA, R. B. de P. e; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. M. S. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 54–58, fev. 1993.

SOARES NUNES, L. A.; MUSSAVIRA, S.; SUKUMARAN BINDHU, O. Clinical and diagnostic

utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 2, p. 177–192, 2015.

SOUZA, S.; DE CARVALHO, H.; COSTA, C.; THOMAZ, E. Association of sickle cell haemoglobinopathies with dental and jaw bone abnormalities. **Oral Diseases**, 28 set. 2017.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillière's clinical haematology**, v. 11, n. 1, p. 163–84, mar. 1998.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 364, n. 9442, p. 1343–60, jan. 2004.

TAYLOR, J. J. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. **ISRN inflammation**, v. 2014, p. 593151, 22 abr. 2014.

THORESON, C. K.; O'CONNOR, M. Y.; RICKS, M.; CHUNG, S. T.; SUMNER, A. E. Sickle Cell Trait from a Metabolic, Renal, and Vascular Perspective: Linking History, Knowledge, and Health. **Journal of Racial and Ethnic Health Disparities**, v. 2, n. 3, p. 330–335, 25 set. 2015.

THURMAN, A. R.; STEED, L. L.; HULSEY, T.; SOPER, D. E. Bacteriuria in pregnant women with sickle cell trait. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1366–1370, maio 2006.

TONGUÇ, M. Ö., ÖZTÜRK, C., POLAT, G., BOBUŞOĞLU, O., TEK, S. A., TAŞDELEN, B., ÜNAL, S. Investigation of the relationship between periodontal and systemic inflammation in children with Sickle Cell Disease: A case-control study. **Cytokine**, v. 149, p. 155724, 2022.

TSARAS, G. et al. Complications Associated with Sickle Cell Trait: A Brief Narrative Review. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 6, p. 507–512, jun. 2009.

VEIGA, P. C.; SCHROTH, R. J.; GUEDES, R.; FREIRE, S. M.; NOGUEIRA-FILHO, G. Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 5, p. 505–10, maio 2013.

WILLIAMS, T. N.; MWANGI, T. W.; ROBERTS, D. J.; ALEXANDER, N. D.; WEATHERALL, D. J.; WAMBUA, S.; KORTOK, M.; SNOW, R. W.; MARSH, K. An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. **PLoS medicine**, v. 2, n. 5, p. e128, maio 2005.

WONG, D. T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. **Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 3, p. 313–21, mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sickle-cell anaemia. Report by the secretariat. 59th. 2006.** Disponível em: <http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA59/A59_9-en.pdf>.

YAWN, B. P. Management of Sickle Cell Disease: Recommendations from the 2014 Expert Panel Report. **American Family Physician**, v. 92, n. 12, 2015.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Título da pesquisa: **Associação entre Anemia Falciforme e doença periodontal: aspectos clínicos, radiográficos e níveis salivares de Imunoglobulina A.**

Pesquisadora responsável: SORAIA DE FÁTIMA CARVALHO SOUZA

Pesquisadora secundária: HALINNA LARISSA CRUZ CORREIA DE CARVALHO

Instituição a que pertence à pesquisadora responsável: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO (UFMA)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa *Associação entre Anemia Falciforme e severidade da doença periodontal: aspectos clínicos, radiográficos e níveis salivares de Imunoglobulina A*. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é a sua e a outra da pesquisadora responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES DA PESQUISA

OBJETIVO: Descobrir se pacientes com Anemia Falciforme têm maior chance de desenvolver doenças de gengiva.

PROCEDIMENTOS: Serão coletados seus dados pessoais e será avaliada a condição de seus dentes e da sua gengiva por meio de exames clínicos e radiográficos e coleta de saliva.

DESCONFORTOS E RISCOS AOS EXAMINADOS: É possível que ocorra leve sangramento gengival no momento do exame da gengiva e desconforto na adaptação do filme radiográfico.

BENEFÍCIOS E RETORNO PARA OS EXAMINADOS: Os pacientes com doenças de gengival receberão tratamento periodontal básico (orientação à escovação, dieta, limpeza e aplicação de flúor) ou tratamento periodontal intensivo (orientação à escovação, dieta, remoção de tártaro acima e abaixo da gengiva e aplicação de flúor) no gabinete odontológico da HEMOMAR.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Você nunca será identificado, o que preservará a privacidade de seus dados envolvidos na pesquisa. Você poderá receber esclarecimentos durante a pesquisa.

SUA PARTICIPAÇÃO NÃO É OBRIGATÓRIA, NÃO TERÁ CUSTOS E NÃO TERÁ RECOMPENSA FINANCEIRA E O SR(a) PODE DESISTIR DE PARTICIPAR A QUALQUER MOMENTO SEM QUE ISSO LHE TRAGA QUALQUER PREJUÍZO DE ATENDIMENTO NA HEMOMAR

Esta pesquisa será avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA e se você tiver alguma reclamação, poderá procurar a coordenação desse comitê que fica na sala 07, bloco C, CEB Velho, Campus Universitário do Bacanga da UFMA, telefone (98)3301-8708.

PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS

Soraia de Fátima Carvalho Souza
Telefone:(98)3235-5299/ (98)81255554

Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho
Telefone:(98)324620949/ (98)84036668

Eu, _____, CPF nº _____, declaro ter sido informado e que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação. Assim, concordo em participar, como voluntário, na pesquisa acima descrita e confirmo que recebi uma cópia desse documento assinado pela pesquisadora responsável.

Assinatura do participante [ou impressão digital]:

ou

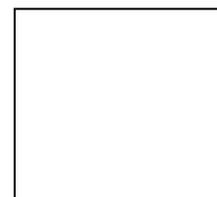


IMPRESSÃO
DACTILOSCÓPICA

Eu, _____, CPF nº _____, responsável legal por, _____, RG nº _____, declaro ter sido informado e que entendi os objetivos, riscos e benefícios de participação do mesmo. Assim, concordo com a sua participação, como voluntário, na pesquisa acima descrita e confirmo que recebi uma cópia desse documento assinado pela pesquisadora responsável.

Assinatura do responsável:

São Luís, __/__/__



IMPRESSÃO
DACTILOSCÓPICA

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO

Identificação e dados sócio-econômicos (ABEP, 2010)

n°: _____

Data do preenchimento: ___/___/_____

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/_____ (Idade: ____ anos)

Endereço: _____

Cidade/UF: _____

Telefone: () _____

Gênero:

 Masculino Feminino

Cor (auto-referida):

 Preta/Negra Parda/Mulata/Cabocla/Morena Branca Amarela/Oriental Indígena Não sabe

Cor (classificada pelo entrevistador):

 Preta/Negra Parda/Mulata/Cabocla/Morena Branca Amarela/Oriental Indígena Não sabe

Itens	Quantidade de itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

Qual é o Grau de Instrução da pessoa com maior renda?

Analfabeto/ Até 3ª série Fundamental/ Até 3ª série 1º. Grau	0
Até 4ª série Fundamental / Até 4ª série 1º. Grau	1
Fundamental completo/ 1º. Grau completo	2
Médio completo/ 2º. Grau completo	4
Superior completo	8

TOTAL DE PONTOS: _____

Classe	PONTOS
A1	42-46
A2	35-41
B1	29-34
B2	23-28
C1	18-22
C2	14-17
D	8-13
E	0-7

Situação geral da saúde

Doenças sistêmicas

Hipertensão	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Alergia	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Cardiopatias	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Doenças renais	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Doenças hepáticas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Doenças ósseas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Doenças metabólicas	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			
Outras	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Qual?
<hr/>			

Fez uso recente ou está fazendo uso de alguma medicação? Sim Não

Se sim, qual? _____

Hábitos de vida

1 Hábito de fumar

- Fumante Quanto fuma por dia? _____ Há quanto tempo fuma? _____
- Não fumante
- Ex-fumante Fumou por quanto tempo? _____ Há quanto tempo deixou de fumar?

- Quanto fumava por dia? 01 a 10 11 a 20 21 a 30 mais de 30

2 Ingestão de bebidas alcoólicas

- Bebe Com que frequência? diariamente 2 a 3 vezes/semana 1 vez/semana
 1 vez/mês ocasionalmente
- Não bebe
- Já bebe Deixou de beber há quanto tempo? _____
- Bebeu durante quanto tempo? menos de 6 meses de 6 meses a 1 ano
 de 1 a 5 anos de 5 a 10 anos mais de 10
anos

Com que frequência bebia? diariamente 2 a 3 vezes/semana

1 vez/semana 1 vez/mês ocasionalmente

3 Já fez uso de alguma droga ilícita? Sim Não

Se sim, qual? _____

Com que frequência? Raramente 1 vez/semana 2 a 3 vezes/semana Todo dia ou quase todo dia

Aspectos relacionados à saúde bucal

Assistência odontológica

1 Quando foi a última vez que foi ao dentista?

- nunca foi
- menos de 1 ano
- de 1 a 2 anos
- mais de 2 anos

2 Consulta periodicamente o dentista? Sim Não

3 Se sim, com que frequência vai ao dentista?

- de 6 em 6 meses
- 1 vez ao ano
- 2 ou mais vezes ao ano

4 Já recebeu orientação profissional em como realizar a higiene oral? Sim Não

5 Já perdeu algum dente? Sim Não

6 Se sim, por qual motivo?

- Cárie
- Trauma
- Periodontite/piorréia
- Indicação ortodôntica
- Outro _____

7 Há quanto tempo?

- menos de 6 meses
- de 6 meses a 1 ano
- de 1 a 2 anos
- mais de 2 a 5 anos
- mais de 5 anos

APÊNDICE C – TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Coeficientes padronizados dos modelos de análise fatorial e análise de caminhos considerando AF como variável independente principal – Componentes principais 1 e 2 (Modelos 1 e 2).

Efeitos / Variáveis	Modelo 1		Modelo 2	
	CP ¹	p-valor ²	CP ²	p-valor ²
Análise fatorial				
Componente principal 1				
IL-1 β	0,696	<0,001	--	--
IL-6	0,436	<0,001	--	--
MMP-8	0,721	<0,001	--	--
Componente principal 2				
TIMP-1	--	--	0,627	<0,001
OPG	--	--	0,180	0,021
RANK-L	--	--	0,279	0,001
Análise de caminhos				
Componente principal				
Grupo	0,187	0,048	0,824	<0,001
Uso de fármacos	-0,068	0,400	0,065	0,477
Comorbidades ³	-0,076	0,493	0,290	0,013
Uso de fármacos				
Grupo	0,363	<0,001	0,366	<0,001
Idade	0,041	0,542	0,035	0,611
Classe socioeconômica	-0,081	0,271	-0,080	0,276
Comorbidades	0,210	0,011	0,205	0,014
Comorbidades				
Grupo	0,347	0,004	0,346	0,004
Idade	0,192	0,078	0,254	0,018
Classe socioeconômica	-0,028	0,789	-0,047	0,646
Tabagismo				
Classe socioeconômica	0,252	0,031	0,252	0,031
Idade	0,435	0,001	0,435	0,001
Número de dentes				
Idade	-0,685	<0,001	-0,685	<0,001
Classe socioeconômica	-0,129	0,009	-0,129	0,009
Visitas ao dentista	-0,072	0,086	-0,072	0,086
Visitas ao dentista				
Classe socioeconômica	0,183	0,064	0,183	0,004
Periodontite				
Grupo	0,016	0,856	0,028	0,823
Idade	0,110	0,315	0,171	0,284
Classe socioeconômica	0,133	0,047	0,189	0,038
Visitas ao dentista	0,035	0,511	0,033	0,673
Uso de fármacos	-0,021	0,761	-0,022	0,829
Comorbidades	-0,059	0,575	-0,105	0,480
Número de dentes	-0,099	0,165	-0,117	0,254
Tabagismo	0,024	0,842	0,034	0,853
Componente principal 1	0,028	0,698	-0,486	0,528

AF: Anemia Falciforme.. ¹CP: coeficiente padronizado. ²P-valor para o CP. ³Hipertensão arterial sistêmica, alergia, cardiopatia, doenças renais, ósseas, hepáticas, metabólicas ou outras comorbidades. Os p-valores significantes estão em negrito

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE ANEMIA FALCIFORME E DOENÇA PERIODONTAL:
ASPECTOS CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E NÍVEIS SALIVARES DE

Pesquisador: Soraia de Fátima Carvalho

Souza Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14606713.6.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E
TECNOLOGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

472.943 **Data da Relatoria:**

29/10/2013

Apresentação do Projeto:

O presente estudo do tipo coorte retrospectiva propõe-se a investigar a associação entre Anemia Falciforme (AF) e a doença periodontal (DP) por meio da avaliação dos aspectos clínicos e radiográficos e dos níveis salivares de imunoglobulina A (IgA) em pacientes assistidos pelo setor de Odontologia da Supervisão de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (HEMOMAR) em São Luís, MA, Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é de que existe associação entre a Anemia Falciforme e a Doença Periodontal, considerando os aspectos clínicos, radiográficos e níveis salivares de IgA. Tendo por objetivo secundário estimar a prevalência da doença periodontal nos indivíduos com AF, TF e naqueles sem a doença e avaliar os níveis salivares de IgA em indivíduos com AF e TF e naqueles sem a doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Uma vez comprovada a hipótese de que a Anemia Falciforme está associada a doença periodontal este grupo de pesquisa propõe-se a elaborar um protocolo para o diagnóstico precoce da doença periodontal nos pacientes com Anemia Falciforme ou Traço Falciforme, contribuindo desta forma

Continuação do Parecer: 472.943

para a melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

DESCONFORTOS E RISCOS AOS EXAMINADOS: É possível que ocorra leve sangramento gengival no momento do exame da gengiva e desconforto na adaptação do filme radiográfico. **BENEFÍCIOS E RETORNO PARA OS EXAMINADOS:** Os pacientes com doenças de gengival receberão tratamento periodontal básico (orientação à escovação, dieta, limpeza e aplicação de flúor) ou tratamento periodontal intensivo (orientação à escovação, dieta, remoção de tártaro acima e abaixo da gengiva e aplicação de flúor) no gabinete odontológico da HEMOMAR.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com objetivos e metodologia adequados, repetindo os critérios éticos.

No entanto quanto ao Item VI- PROTOCOLO DE PESQUISA da RESOLUÇÃO Nº196/96 versão 2012, foram contemplados vários aspectos, mas ainda se faz necessária informação sobre a descrição da pesquisa (Item VI.2), compreendendo os seguintes itens: e) cronograma informando a duração total e as diferentes etapas da pesquisa, a partir da aprovação pelo Sistema CEP/CONEP; h) local da pesquisa: detalhar as instalações dos serviços, centros, comunidades e instituições nas quais se processarão as várias etapas da pesquisa; j) orçamento financeiro detalhado da pesquisa: recursos, fontes e destinação. Não há informação sobre fonte de recursos para a execução da pesquisa, com base no custo apresentado no orçamento da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As considerações foram acatadas e corrigidas pela autora.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas pela autora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas e corrigidas pela autora.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 472.943

SAO LUIS, 29 de Novembro de 2013

Assinador por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador)

ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE 2014-2017

1. Periódico: Brazilian Oral Research. 2015;29(1):1-7.

Título: Is sickle cell anemia a risk factor for severe dental malocclusion?

Autores: Cyrene Piazero Silva Costa, **Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho**, Soraia de Fátima Carvalho Souza, Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz.

2. Periódico: Journal of Periodontal Research 2016. Oct;51(5):622-9.

Título: Are sickle cell anaemia and sickle cell trait predictive factors for periodontal disease? A cohort study.

Autores: **Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho**, Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz, Cláudia Maria Coelho Alves, Soraia de Fátima Carvalho Souza.

3. Periódico: Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology. 2017 Jul;125(1):76-84.

Título: Are dental and jaw changes more prevalent in a Brazilian population with sickle cell anemia?

Autores: **Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho**, José Yagoh Saraiva Rolim, Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz, Soraia de Fátima Carvalho Souza.

4. Periódico: Oral Diseases. 2017;00:1-11.

Título: Association of sickle cell haemoglobinopathies with dental and jaw bone abnormalities

Autores: Soraia de Fátima Carvalho Souza, **Halinna Larissa Cruz Correia de Carvalho**, Cyrene Piazero Silva Costa, Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz.