

LARISSA MARQUES BEMQUERER

**ANÁLISE CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DA
ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E COVID- 19: UM ESTUDO
CASO-CONTROLE**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2022**

Larissa Marques Bemquerer

**ANÁLISE CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DA
ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E COVID- 19: UM ESTUDO
CASO-CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Oliveira Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

B455a Bemquerer, Larissa Marques.
2022 Análise clínica, imunológica e microbiológica da
T associação entre periodontite e COVID- 19 : um estudo caso-
controle / Larissa Marques Bemquerer. -- 2022.

73 f. : il.

Orientador: Fernando Oliveira Costa.
Coorientadora: Tarcília Aparecida da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Citocinas. 4. Doenças
periodontais. 5. Periodontite. I. Costa, Fernando Oliveira.
II. Silva, Tarcília Aparecida da. III. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE CLÍNICA, IMUNOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E COVID- 19: UM ESTUDO CASO-CONTROLE

LARISSA MARQUES BEMQUERER

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PERIODONTIA.

Aprovada em 20 de outubro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Fernando de Oliveira Costa - Orientador
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Alcione Maria Soares Dutra Oliveira
PUCMG

Prof(a). Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Tarcília Aparecida da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 20/10/2022, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Alcione Maria Soares Dutra Oliveira, Usuária Externa**, em 20/10/2022, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Cassia Ferreira de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 20/10/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando de Oliveira Costa, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2022, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1825532** e o código CRC **A7926DEB**.

Dedico esse trabalho à **Ana Luisa** e ao **Miguel** por me inspirarem a buscar ser melhor a cada dia e por me apoiarem em todas as minhas aventuras. Vocês são meu porto seguro, fonte de amor e serenidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ieda** e **Eliseu**, por todo amor, carinho e apoio; vocês são a base de tudo. À minha irmã **Ana Luisa**, pela colaboração nesse trabalho e por sempre me aconselhar e estar ao meu lado, mesmo que do outro lado do mundo.

Ao meu orientador **Prof. Fernando Costa**, agradeço a disponibilidade de me orientar nesse projeto e pelos ensinamentos durante essa caminhada.

À **Profa. Tarcília Silva** por confiar em mim, me apoiar e incentivar desde a graduação. Agradeço todas as oportunidades de aprendizado e colaboração.

Ao **Prof. Lucas Guimarães** pela disponibilidade, ensinamentos e ajuda indispensável nesse trabalho.

Agradeço à **Fernanda Delgado** pelo companheirismo durante a coleta, esse trabalho não teria sido possível sem a sua ajuda.

À equipe do **Hospital das Clínicas**, em especial à **Profa. Denise Travassos**. À equipe do **Hospital Eduardo de Menezes**, em especial à **Ester Grassi** e ao **Daniel Mendes**.

Ao **Miguel da Mata**, pelo caminho que trilhamos. Seu companheirismo, amor e conselhos foram indispensáveis nesse percurso. Obrigada por acreditar em mim em todos os momentos e apoiar minhas escolhas.

Ao **Prof. Axel Spahr** por me receber e orientar na Universidade de Sydney. Ao **Prof. Fabian Obregon**, mentor e amigo, agradeço todo o aprendizado, apoio e oportunidades. Agradeço à equipe de Periodontia e Saúde Bucal da Universidade de Sydney, em especial ao **Prof. Andrew Terry** e **Profa. Tihana Divnic-Resnik** por me ensinarem tanto.

Aos meus colegas da área de Periodontia, agradeço a caminhada e conhecimentos compartilhados, em especial aos companheiros de Mestrado, **Ana Carolina**, **Augusto**, **Bárbara** e **Carolina**. Aos meus colegas da Estomatologia e Patologia, **Ana Carolina Pondé**, **José Alcides**, **Sicília** e **Thalita**, obrigada por me adotarem e por dividirem conhecimentos e risadas.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** pela minha formação. Agradeço também os professores da área de Periodontia, **Prof. Luis Cota** e **Prof. Rafael Lima**, pelos ensinamentos, discussões e conselhos, essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos **pacientes** que, mesmo debilitados, gentilmente aceitaram participar dessa pesquisa.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo apoio financeiro

“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.”

Franklin Roosevelt

RESUMO

Esse estudo avaliou os parâmetros clínicos, imunológicos e microbiológicos em indivíduos com COVID-19 e controles, explorando se a inflamação causada pela periodontite contribui para ocorrência e gravidade de desfechos adversos da COVID-19. Indivíduos do grupo caso [exame de transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) positivo para coronavírus da síndrome respiratória aguda grave-2 (SARS-CoV-2)] e controles (RT-PCR negativo para SARS-CoV-2) foram submetidos à avaliação clínica e periodontal. Níveis salivares de fator de necrose tumoral alfa, interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-10, osteoprotegerina, ativador de receptor do fator nuclear Kappa-B ligante (RANKL), armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) e biofilme dental foram analisadas em dois tempos. Dados de desfechos relacionados à COVID-19 e comorbidades foram extraídos dos prontuários clínicos. Noventa e nove casos de COVID-19 e 182 controles foram incluídos para análise. Periodontite foi associada com maior número de hospitalizações ($p=0.009$), maior número de dias na unidade de terapia intensiva (UTI) ($p=0.042$), maior admissão na unidade de terapia semi-intensiva (UTSI) ($p=0.047$), e elevada necessidade de uso de oxigenação suplementar ($p=0.042$). Após ajuste das variáveis de confusão, periodontite resultou em 1.13 vezes mais chance de hospitalização. Níveis salivares de IL-6 ($p=0.010$) estavam aumentados em indivíduos com COVID-19 e periodontite. Periodontite foi associada com elevados níveis RANKL e IL-1 β após o fim da infecção por COVID-19. Não foram observadas alterações significativas nas cargas bacterianas dos periodontopatógenos *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tanerella forsythia*, e *Treponema denticola* durante e após a infecção. Periodontite foi associada à piores desfechos da COVID-19 (hospitalização, uso de oxigênio suplementar, dias na UTI e admissão na UTSI), sugerindo a relevância do cuidado periodontal para reduzir a carga sistêmica de inflamação. Entender a relação entre a infecção por SARS-CoV-2 e condições crônicas que podem influenciar os desfechos da doença, como a periodontite, é importante para potencialmente prevenir complicações da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19. Citocinas. Doenças periodontais. Periodontite. SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Clinical, immunological, and microbiological analysis of the association between periodontitis and COVID-19: a case-control study

This study investigated the clinical, immunological, and microbiological parameters in individuals with coronavirus disease (COVID-19) and controls, exploring if periodontitis-driven inflammation contributes to the occurrence and severity of COVID-19 endpoints. Case [positive reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] and control (negative RT-PCR for SARS-CoV-2) individuals underwent clinical and periodontal assessment. Salivary levels of tumoral necrosis factor alpha, interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-10, osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor Kappa-B (RANKL), neutrophil extracellular traps, and subgingival biofilm were analysed at two time-points. Data on COVID-19-related outcomes and comorbidity information were assessed from medical records. Ninety-nine cases of COVID-19 and 182 controls were included for analysis. Periodontitis was associated with more hospitalization ($p=0.009$), more days in the intensive care unit (ICU) ($p=0.042$), admission to the semi-ICU ($p=0.047$), and greater need for oxygen therapy ($p=0.042$). After adjustment for confounders, periodontitis resulted in a 1.13-fold increase in the chance of hospitalization. Salivary IL-6 levels ($p=0.010$) were increased in individuals with COVID-19 and periodontitis. Periodontitis was associated with increased RANKL and IL-1 β after the end of COVID-19 infection. No significant changes were observed in bacterial loads of the periodontopathogens *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tanerella forsythia*, and *Treponema denticola* during and after the infection. Periodontitis was associated with worse outcomes from COVID-19 (hospitalization, use of oxygen, days at ICU and admission to semi-ICU), suggesting the relevance of periodontal care to reduce the burden of overall inflammation. Understanding the crosstalk between SARS-CoV-2 infection and chronic conditions such as periodontitis that can influence the disease outcome is important to potentially prevent complications of COVID-19.

Keywords: COVID-19. Cytokines. Periodontal diseases. Periodontitis. SARS-CoV-2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19 *Coronavirus Disease*

ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

HC Hospital das Clínicas

HEM Hospital Eduardo de Menezes

IL-10 Interleucina-10

IL-1 β Interleucina-1 β

IL-6 Interleucina-6

NET *Neutrophil Extracellular Trap*

OPG Osteoprotegerina

RANKL Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B

SARS-CoV-2 *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*

STROBE *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 Objetivos gerais	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 METODOLOGIA EXPANDIDA	18
2.1 Aspectos éticos.....	18
2.2 Desenho do Estudo	18
2.3 Pacientes e seleção da amostra	18
2.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	19
2.5 Coleta de dados.....	19
2.5.1 Período de coleta de dados	19
2.5.2 Dados gerais	19
2.5.3 Exame clínico	20
2.5.3.1 Avaliação estomatológica	20
2.5.3.2 Índice CPO-d	21
2.5.3.3 Índice de placa	21
2.5.3.4 Profundidade de sondagem.....	21
2.5.3.5 Sangramento gengival à sondagem	21
2.5.3.6 Nível de inserção clínica	22
2.5.3.7 Diagnóstico de periodontite	22
2.5.4 Coleta de saliva	23
2.5.5 Coleta de biofilme	23

2.5.6 Dados de prontuário	23
2.6 Análise dos dados.....	24
3 ARTIGO.....	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais	61
ANEXO B – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais	70

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A COVID-19, abreviatura em inglês de “coronavirus disease” (WHO, 2020a), é a doença causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave-2 (SARS-CoV-2) (GORBALENYA *et al.*, 2020), cuja disseminação mundial culminou na declaração de uma pandemia em março de 2020 (WHO, 2020b). Os primeiros casos da doença foram descritos em 31 dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, China, como quadros de pneumonia de etiologia desconhecida (WHO, 2020c). Até o dia 18 de setembro de 2022, mais de 609 milhões de casos da doença haviam sido confirmados em todo o mundo com mais de 6,5 milhões de mortes (WHO, 2022), embora o número de casos reportados esteja provavelmente subestimado (KRANTZ; RAO, 2020; LAU *et al.*, 2020).

Os sintomas mais comuns associados à COVID-19 são febre, fadiga, tosse seca, enxaqueca, dispneia e diarreia, com casos mais graves evoluindo com a síndrome do desconforto respiratório agudo (JIANG *et al.*, 2020). O SARS CoV-2 utiliza o receptor enzima conversora de angiotensina-2 (ECA2) para entrada nas células (ZHOU *et al.*, 2020) e a mucosa bucal apresenta elevada expressão deste receptor (XU *et al.*, 2020), particularmente no periodonto (FERNANDES-MATUCK *et al.*, 2020), epitélio e glândulas salivares (HUANG *et al.*, 2020) sugerindo a mucosa oral como importante “porta de entrada” para o vírus. A interação do vírus com as células da mucosa bucal possivelmente desencadeia a produção de citocinas semelhante ao que ocorre em infecções causadas por outros tipos de vírus (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2020).

As manifestações clínicas da COVID-19 parecem ser determinadas não somente pela ação do vírus propriamente dita, mas também pela resposta do sistema imune hospedeiro (GATTINONI *et al.*, 2020). A resposta inflamatória exacerbada do organismo é atribuída à “tempestade de citocinas”, um quadro de produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias sistêmica e localmente, que está associado à rápida deterioração do quadro clínico em pacientes graves (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2020; YE; WANG; MAO, 2020). Estudo de Han *et al.*, (2020) mostrou que pacientes com COVID-19 apresentam maior nível sérico de citocinas (TNF- α , interferon gama, IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10) e proteína C reativa do que o grupo controle sem a doença.

Entre os pacientes com COVID-19, o nível sérico de IL-6 e IL-10 foi significativamente maior nos pacientes em estado crítico do que em estados grave e moderado. Os resultados indicaram que altos níveis de citocinas estão relacionados com maior gravidade da doença e que a concentração de IL-6 e IL-10 pode ser utilizada na predição de piora do quadro clínico.

Além disso, pacientes com comorbidades como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade, doença pulmonar crônica e doença renal crônica apresentam casos mais graves da doença e pior prognóstico (EJAZ *et al.*, 2020; RICHARDSON *et al.*, 2020). A relação da COVID-19 com outras doenças inflamatórias e/ou infecciosas poderia contribuir para um aumento da carga inflamatória sistêmica e para modificação do curso da COVID-19, resultando na variedade fenotípica observada.

A periodontite é uma doença infecciosa-inflamatória que afeta os tecidos periodontais de suporte (osso, cemento e ligamento periodontal) (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018). A doença resulta da quebra da homeostase entre a microbiota subgingival e os mecanismos de resposta do hospedeiro em indivíduos suscetíveis e está associada ao aumento da resposta inflamatória local e sistêmica (BARTOLD; VAN DYKE, 2013; DARVEAU, 2010). A evolução clínica da doença é associada a progressão na profundidade das bolsas periodontais, aumento da reabsorção óssea alveolar (PAGE; KORNMAN, 1997). A periodontite apresenta alta prevalência mundial, representando um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2021; FRENCKEN *et al.*, 2017).

A presença do biofilme subgingival é necessária para o início e para a progressão da periodontite, mas não é suficiente para induzi-la sozinha. Da mesma forma, a presença de uma espécie bacteriana específica não é capaz de justificar seu desenvolvimento (HAJISHENGALLIS, 2014; PAGE; KORNMAN, 1997). Atualmente, a teoria mais aceita para a patogênese da periodontite envolve sinergia microbiana e disbiose, ou seja, modificação na proporção de cada espécie microbiana do estado de saúde (homeostase) em relação ao estado de doença, consolidando uma microbiota capaz de induzir a inflamação (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012; HAJISHENGALLIS, 2014). Contudo, a destruição tecidual observada é causada pela

interação do biofilme com componentes dos sistemas de defesa do hospedeiro (PAGE; KORNMAN, 1997), já que a resposta do organismo aos microrganismos é o principal fator do dano tecidual, via processo inflamatório exacerbado, inespecífico e disfuncional que, além de não ser capaz de reestabelecer a homeostase, sustenta a disbiose e causa a destruição dos tecidos periodontais (MEYLE; CHAPPLE, 2015). Influências multifatoriais nas respostas imunoinflamatórias tornam as alterações do microbioma disbiótico mais prováveis para alguns indivíduos do que outros e provavelmente influenciam a gravidade da doença (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018). Dessa maneira, uma disbiose incipiente em indivíduos susceptíveis pode desencadear uma resposta excessiva do hospedeiro, com produção aumentada de citocinas, espécies reativas de oxigênio e metaloproteinases de matrix, que prevalecem sobre seus antagonistas e levam a danos no tecido periodontal (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

D'Aiuto *et al.* (2004) avaliaram os níveis séricos de IL-6 e proteína C reativa de 94 pacientes com periodontite, antes e após o tratamento periodontal. Estes autores observaram a redução nos níveis de ambas, 6 meses após o tratamento periodontal, sendo que as maiores diminuições foram encontradas em pacientes que responderam melhor clinicamente ao tratamento. Em um recente estudo caso-controle que avaliou o nível de diversas quimiocinas e citocinas em saliva de pacientes diagnosticados com periodontite, aqueles classificados como Estágio III-Grau B apresentaram níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, INF- γ maiores do que seus respectivos controles (KAWAMOTO *et al.*, 2020). A secreção local de altos níveis de IL-6 resulta na amplificação da cascata pró-inflamatória pela promoção da atividade de osteoclastos e estimulação do crescimento de bactérias periodontopatogênicas (NIBALI *et al.*, 2013). Tonetti; Greenwell; Kornman, 2018, destacaram que mediadores inflamatórios do periodonto podem entrar na corrente sanguínea e ativar proteínas hepáticas, como a proteína C reativa, amplificando a inflamação sistêmica.

Nos últimos anos, a associação entre doenças sistêmicas e periodontite tem sido cada vez mais reportada. Vários estudos apontam evidências de associação entre periodontite e diversas condições como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e distúrbios na gestação (LINDEN, GERRY J.; HERZBERG, 2013; SANZ; MARCO DEL CASTILLO; *et al.*, 2020). A plausibilidade biológica dessas associações baseia-se no conceito de que a inflamação e o

microbioma periodontal contribuem para a carga global de inflamação sistêmica em um nível que afeta a ocorrência, gravidade e progressão de outras condições inflamatórias crônicas (BARTOLD; MARIOTTI, 2017).

De pontual interesse para este estudo, a relação entre periodontite e doenças respiratórias tem sido ainda confirmada por diversos estudos (GOMES-FILHO *et al.*, 2020). A associação entre periodontite e doenças respiratórias, como a pneumonia, tem sido atribuída à aspiração de bactérias orais e também à colonização da cavidade oral por patógenos respiratórios, servindo como reservatório de colônias (GOMES-FILHO; PASSOS; SEIXAS DA CRUZ, 2010). Essa associação é de maior relevância em pacientes internados que necessitam de ventilação mecânica, uma vez que pacientes com periodontite apresentam três vezes mais chance de apresentar pneumonia nosocomial em comparação a pacientes periodontalmente saudáveis (GOMES-FILHO *et al.*, 2014). Outro fator que parece explicar a associação entre a periodontite e doenças pulmonares é a liberação contínua de citocinas nas lesões periodontais, que podem alterar o epitélio respiratório e promover a adesão de patógenos respiratórios pelo aumento da expressão de receptores de adesão (GOMES-FILHO; PASSOS; SEIXAS DA CRUZ, 2010).

Estudos recentes mostraram que estado de saúde bucal e periodontite estão associados à piores desfechos da COVID-19 (ANAND *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2022; GUPTA *et al.*, 2022; LARVIN *et al.*, 2020; MAROUF *et al.*, 2021). Uma possível explicação é que o SARS-CoV-2 infecta e se replica em tecidos orais que expressam a ECA-2 e uma condição patológica pré-existente poderia exacerbar esses processos. Além disso, a periodontite e o COVID-19 ativam vias imunopatológicas semelhantes, incluindo a superexpressão de citocinas e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET), intensificando a inflamação sistêmica (GUPTA; SAHNI, 2020; HAN *et al.*, 2020; KAWAMOTO *et al.*, 2020; SHANI, GUPTA; 2020). No entanto, a literatura sobre o assunto é escassa e os mecanismos fisiopatológicos da associação COVID-19-periodontite ainda não foram definidos. A hipótese desse estudo é que a inflamação causada pela periodontite contribui para piores desfechos do COVID-19. Dessa forma, esse estudo avaliou parâmetros clínicos, imunológicos e microbiológicos em indivíduos com COVID-19 e controles.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Avaliar a condição periodontal, clínica, microbiológica e imunológica de indivíduos positivos para COVID-19 comparado com indivíduos negativos para COVID-19.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a associação entre parâmetros periodontais e desfechos de indivíduos com COVID-19
- b) Avaliar a saúde bucal através do índice de dentes Cariados, Perdidos e Obturados (CPO-d)
- c) Determinar o perfil inflamatório de indivíduos com COVID-19 e controles, através dos níveis salivares de IL-1 β , IL-6, IL-10, RANKL, osteoprotegerina (OPG), TNF- α e NET
- d) Determinar o perfil microbiológico de indivíduos positivos para COVID-19 e controles
- e) Correlacionar parâmetros periodontais e o perfil inflamatório salivar com desfechos clínicos e laboratoriais da COVID-19

2 METODOLOGIA EXPANDIDA

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e no Hospital Eduardo de Menezes (HEM), e submetido à Gerência de Ensino e Pesquisa do HC-UFMG/ Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares e ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG tendo sido aprovado sob número de parecer: 4.357.894 e CAAE: 37273320.0.0000.5149 (**ANEXO A**). O estudo também foi submetido ao COEP da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, responsável pela anuência no HEM, e foi aprovado sob número de parecer: 4.595.885 e CAAE: 3 7273320.0.3002.5124 (**ANEXO B**). Todos os indivíduos incluídos aceitaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Desenho do estudo

Este foi um estudo observacional caso-controle prospectivo, e todas as diretrizes do *STROBE* foram seguidas (KNOTTNERUS & TUGWELL, 2008).

2.3 Pacientes e seleção da amostra

Pacientes positivos para COVID-19 atendidos no HC-UFMG e no HEM entre 09/2020 e 05/2021 foram selecionados para compor o grupo caso. Pacientes negativos para COVID-19 atendidos na disciplina de Urgência da Faculdade de Odontologia (FO) da UFMG entre 01/2021 e 03/2021 foram selecionados para compor o grupo controle.

2.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão comuns aos grupos caso e controle foram indivíduos de todas as faixas etárias, presença de pelo menos 6 dentes e ausência de contraindicações para exame clínico periodontal. Os critérios de exclusão foram pacientes grávidas ou que haviam realizado tratamento periodontal nos últimos 3 meses. Os critérios de inclusão específicos para o grupo caso foram indivíduos atendidos nas alas de COVID-19 do HC-UFMG e do HEM e que apresentaram *swab* nasal positivo para COVID-19 no exame de transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os critérios de inclusão específicos para o grupo controle foram indivíduos atendidos na disciplina de Urgência da FO-UFMG e que apresentaram saliva negativa para COVID-19 no exame de RT-PCR.

Critérios de exclusão locais também foram adotados durante o exame clínico. Foram excluídos dentes com impossibilidade de determinar a junção cimento-esmalte, com severas alterações morfológicas gengivais impedindo a sondagem periodontal, com lesões cariosas extensas, com procedimentos restauradores iatrogênicos impedindo a conclusão do exame, com presença excessiva de cálculo e terceiros molares (COSTA *et al.*, 2009).

2.5 Coleta de dados

2.5.1 Período de coleta de dados

O recrutamento e coleta de amostras dos pacientes ocorreu entre setembro/2020 e maio/2021. A coleta de dados do prontuário dos pacientes ocorreu até setembro/2021.

2.5.2 Dados gerais

Inicialmente os pacientes responderam a um formulário no qual foram obtidas informações sobre (1) variáveis demográficas: sexo, idade, cor da pele (leucoderma, feoderma, melanoderma), nível educacional (anos de estudo) e nível socioeconômico (renda familiar); (2) hábitos de vida: tabagismo [fumante (≥ 100 cigarros na vida e fumava no período do exame), ex-fumante (≥ 100 cigarros na vida e não fumava no período do exame) e não fumante (≤ 100 cigarros na vida e não fumava no período do exame)] e etilismo (etilista, não etilista) (TOMAR; ASMA, 2000); e (3) informações clínicas: histórico de visita ao dentista e tratamento periodontal, hábitos de higiene bucal (número de escovação/dia e uso de fio dental), uso de medicamentos e comorbidades. Adicionalmente, no grupo COVID-19, foram obtidas informações sobre sintomas da COVID-19 e histórico de anosmia e ageusia.

2.5.3 Exame clínico

Os pacientes foram submetidos à avaliação estomatológica, clínica e periodontal em toda cavidade bucal. Os dados coletados foram índice CPO-d, presença de lesões bucais, índice de placa, sangramento gengival à sondagem, profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica. O exame clínico foi realizado com o auxílio de espelho clínico, sonda exploradora n°5, sonda periodontal UNC-15 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), gaze e luz auxiliar.

2.5.3.1 Avaliação estomatológica

O exame estomatológico foi realizado de acordo com o Guia para Epidemiologia e Diagnóstico de Condições e Doença da Mucosa Oral, publicado pela Organização Mundial de Saúde em 1980. A cavidade bucal e linfonodos submandibulares e cervicais foram examinados observando-se cor, textura e consistência à palpação. Para localização das lesões de mucosa foi utilizado o desenho da topografia da mucosa bucal modificado por ROED-PETERSEN & RENSTRUP, 1969 (WHO, 1980). As lesões foram classificadas de acordo com os critérios utilizados para classificação das lesões fundamentais ou elementares que ocorrem na boca (MILER; LANGLAIS, 2003).

2.5.3.2 Índice CPO-d

A experiência de cárie e quantidade de dentes perdidos foram mensurados pela utilização do índice CPO-d (KLEIN; PALMER, 1938). Todos os dentes foram incluídos no exame, à exceção dos terceiros molares.

2.5.3.3 Índice de placa

Foi utilizado o índice de placa descrito por Silness & Løe (1964). As mensurações foram realizadas nas superfícies mesial, distal, lingual e vestibular de todos os dentes com o auxílio de uma sonda exploradora. Os escores para cada sítio foram somados e os valores médios registrados por dente e indivíduo.

2.5.3.4 Profundidade de sondagem

A PS foi obtida mensurando-se a distância da margem gengival ao fundo do sulco ou bolsa gengival através de sondagem circunferencial de todas as faces dos dentes incluídos no exame. Foram registrados o maior valor encontrado para cada um dos quatro sítios de cada dente (distal, vestibular, mesial e lingual).

2.5.3.5 Sangramento gengival à sondagem

Os dados de sangramento gengival à sondagem foram registrados para todas as superfícies dentais incluídas no exame. A leitura do sangramento foi realizada entre 30 e 60 segundos após a sondagem dos sítios. A ocorrência de sangramento após sondagem foi registrada em cada sítio de forma dicotômica, para sua presença ou ausência (AINAMO; BAY, 1975).

2.5.3.6 Nível de inserção clínica

O nível de inserção clínico foi obtido pela mensuração da distância entre o limite amelocementário e o fundo do sulco ou bolsa gengival. Foram registrados o maior valor encontrado para cada um dos quatro sítios de cada dente (distal, vestibular, mesial e lingual).

2.5.3.7 Diagnóstico da periodontite

Os casos de periodontite foram definidos como perda de inserção clínica interproximal em ≥ 2 dentes não adjacentes, ou perda de inserção clínica vestibular ou lingual ≥ 3 mm com bolsa > 3 mm detectável ≥ 2 dentes. O diagnóstico, classificação e estadiamento da periodontite foi definida pelos critérios estabelecidos na mais recente Classificação das Doenças Periodontais (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018):

- 1) Estágio I - aqueles com pelo menos dois ou mais sítios interproximais com inserção clínica de 1 a 2mm, com PS menor ou igual a 4mm
- 2) Estágio II - aqueles com pelo menos dois ou mais sítios interproximais com inserção clínica de 3 a 4mm, com PS menor ou igual a 5mm
- 3) Estágio III - aqueles com pelo menos dois ou mais sítios interproximais com inserção clínica de ≥ 5 mm, com PS ≥ 6 mm, com perda dentária pela periodontite de 4 dentes ou menos, envolvimento de furca classe II ou III.
- 4) Estágio IV - aqueles com pelo menos dois ou mais sítios interproximais com inserção clínica de ≥ 5 mm, com PS ≥ 6 mm, com perda dentária pela periodontite de 5 dentes ou mais, disfunção mastigatória, necessidade de reabilitação extensa, colapso de mordida com menos de 20 dentes remanescentes (10 pares opositores).

2.5.4 Coleta de saliva

Amostras de saliva foram coletadas durante (T1) e após a infecção (T2) por COVID-19 em tubos Falcon 50ml. Foi utilizada a técnica não estimulada durante 5 minutos e as amostras foram armazenadas a -80 até análise. O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi empregado a fim de quantificar os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, RANKL, OPG e TNF- α e o ensaio Pico Green foi empregado para quantificar a NET, utilizando kits comercialmente disponíveis. As amostras foram mantidas em Biorepositório conforme regulamentação vigente e descartadas após finalizadas análises.

2.5.5 Coleta de biofilme

Amostras do biofilme subgengival foram coletadas dos 5 sítios com maior valor de profundidade de sondagem com cones de papel absorvente estéril (# 30, Dentsply®) introduzido em cada sítio periodontal e mantidos em posição por 60 segundos. Os cones foram colocados em um mesmo microtubo e armazenados a -80°C. A quantificação da carga bacteriana total foi determinada por PCR de tempo real. Amostras de biofilme foram coletadas durante (T1) e após a infecção por COVID-19 (T2).

2.5.6 Dados de prontuário

Os prontuários dos pacientes do grupo caso foram avaliados após o fim da internação para desfechos relacionados à infecção por COVID-19, a saber, tempo total de internação (dias), uso de oxigenação suplementar (sim ou não), internação na unidade de terapia intensiva (UTI) (sim ou não), tempo de internação na UTI (dias), internação na unidade de terapia semi-intensiva (sim ou não), tempo de internação na unidade de terapia semi-intensiva (dias), intubação (sim ou não), tempo de intubação (dias), estado da alta (melhorado ou óbito) e medicamentos para tratamento COVID-19. Dados laboratoriais de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, proteína C reativa e dímero D durante a internação também foram registrados. Além disso, foram coletados dados de alterações sistêmicas e medicamentos de uso contínuo.

2.6 Análise dos dados

Os softwares Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 25.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.) e GraphPad Prism (version 7.00, Graph-Pad software, La Jolla, CA, USA) foram utilizados para análise estatística e descrição dos grupos caso e controle. Comparações intragrupo entre indivíduos com e sem periodontite foram realizadas. O teste chi-quadrado foi utilizado para analisar as variáveis categóricas e o teste T de Student foi utilizado para variáveis quantitativas. No grupo COVID-19, comparações entre indivíduos com e sem periodontite foram realizados para desfechos relacionados à COVID-19, utilizando os testes chi-quadrado e T de Student. Regressão binária foi realizada para analisar a influência da periodontite em desfechos relacionados à COVID-19, controlando para variáveis de confusão. A comparação da concentração de citocinas entre indivíduos com e sem periodontite foram realizadas utilizando o teste T de Student. As diferenças ($\Delta T_2 - T_1$) durante (T1) a após (T2) a infecção por COVID-19 para as variáveis concentração de citocinas e carga bacteriana foram calculadas utilizando testes T pareados. Análises exploratórias foram realizadas previamente aos modelos de regressão logística multivariada para identificar as variáveis de confusão para cada desfecho. Variáveis com valor de $p \leq 0.20$ foram incluídas nos modelos.

3 ARTIGO

Título: Clinical Oral Investigations (**Submetido**)

ISSN: 1436-3771

Classificação: A1

Fator de Impacto: 4.293

Clinical, immunological, and microbiological analysis of the association between periodontitis and COVID-19: a case-control study

Abstract

Objectives: Periodontitis and coronavirus disease (COVID-19) share risk factors and activate similar immunopathological pathways, intensifying systemic inflammation. Herein, we investigated the clinical, immunological and microbiological parameters in individuals with COVID-19 and controls, exploring whether periodontitis-driven inflammation contributes to worsening COVID-19 endpoints.

Materials and methods: Case (positive RT-PCR for SARS-CoV-2) and control (negative RT-PCR) individuals underwent clinical and periodontal assessment. Salivary levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, OPG, RANKL, neutrophil extracellular traps, and subgingival biofilm were analyzed at two time-points. Data on COVID-19-related outcomes and comorbidity information were assessed from medical records.

Results: Ninety-nine cases of COVID-19 and 182 controls were included for analysis. Periodontitis was associated with more hospitalization ($p=0.009$), more days in the intensive care unit (ICU) ($p=0.042$), admission to the semi-ICU ($p=0.047$), and greater need for oxygen therapy ($p=0.042$). After adjustment for confounders, periodontitis resulted in a 1.13-fold increase in the chance of hospitalization. Salivary IL-6 levels ($p=0.010$) were increased in individuals with COVID-19 and periodontitis. Periodontitis was associated with increased RANKL and IL-1 β after COVID-19. No significant changes were observed in bacterial loads of the periodontopathogens *Porphyromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*.

Conclusions: Periodontitis was associated with worse outcomes from COVID-19, suggesting the relevance of periodontal care to reduce the burden of overall inflammation.

Clinical relevance: Understanding the crosstalk between SARS-CoV-2 infection and chronic conditions such as periodontitis that can influence the disease outcome is important to potentially prevent complications of COVID-19.

Keywords: COVID-19, cytokines, periodontal diseases, periodontitis, SARS-CoV-2.

Introduction

The SARS-CoV-2 outbreak has set up an unprecedented pandemic, causing the collapse of healthcare systems across the world due to the high number of hospitalizations and deaths [1]. Although high vaccination rates appear to be leading to disease control in some countries, inequities in vaccine distribution worldwide, combined with the virus' ability to mutate, indicate that the emergence of new variants and outbreaks cannot be ruled out [2]. Multiple factors (e.g., senility, obesity, and underlying chronic conditions) have been linked with greater odds of worse COVID-19 endpoints [3]. However, crosstalk with other inflammatory and infectious diseases can boost the systemic inflammatory burden and modify the course of infection, resulting in a variety of infection phenotypes [4].

Periodontitis is a highly prevalent infectious-inflammatory oral disease [5]. Periodontal pockets serve as a reservoir of microorganisms, including viruses, fungi, and bacteria, that can enter the bloodstream and/or be aspirated [6]. Furthermore, individuals with periodontitis are three-fold more likely to develop nosocomial pneumonia than those who are periodontally healthy [7].

Poor oral health status and periodontitis were linked to worse outcomes of COVID-19 [8-12]. A possible explanation is that SARS-CoV-2 infects and replicates in oral tissues that express angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2), for instance, periodontium [13], epithelium, salivary glands [14], and a pre-existing pathological condition may exacerbate these processes. Moreover, periodontitis and COVID-19 activate similar immunopathological pathways, including the overexpression of cytokines and neutrophil extracellular traps (NETs), intensifying systemic inflammation [15-19]. However, the literature on the issue is sparse and the pathophysiological mechanisms of the COVID-19-periodontitis association have not been defined yet. Our hypothesis is that periodontitis-driven inflammation contributes to worse COVID-19 endpoints. Herein, we investigated the clinical, immunological and microbiological parameters in individuals with COVID-19 and controls.

Materials and methods

Study design, sample characteristics and ethical clearance

A population-based case control study was carried out in the city of Belo Horizonte, Brazil, during the COVID-19 outbreak, from September 2020 to May 2021. Individuals examined in the special wards for COVID-19 of two referral services participated in this study: Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais and Hospital Eduardo de Menezes. Subjects who tested positive for SARS-CoV-2 in RT-PCR by nasal swab were

included in the case group. The control group consisted of individuals who had negative salivary RT-PCR for SARS-CoV-2. In this group, individuals had attended the Dental Urgency Department of the School of Dentistry at the Federal University of Minas Gerais from January 2021 to March 2021. The report of this study conformed to the STROBE statement. The study was approved by the Ethics Committee (#37273320.0.0000.5149; #37273320.0.3002.5124).

Sample size calculation and eligibility criteria

The two groups were matched for age and sex at a proportion of 1.8 control for every case. Inclusion criteria were participants of any age group, with at least six teeth, and no contraindication for periodontal evaluation. Individuals were excluded in case of pregnancy, and if they had been treated for periodontal disease in the last three months. Additionally, in the COVID-19 group patients were also excluded if they did not have a positive RT-PCR, if they were in mechanical ventilation or using non-rebreather masks.

Demographic and behavioral characteristics

Participants provided information on schooling, family income, habits (i.e., smoking and alcohol consumption), height and weight, oral hygiene habits, previous dental treatments and, in the case of those infected with COVID-19, signs and symptoms presented. Information regarding comorbidities and medication were also obtained from medical records.

Clinical and periodontal assessment - definition of periodontitis and staging

Clinical and periodontal examinations were performed by a single calibrated examiner (L.M.B.). Third molars, teeth with extensive dental caries, absence of a clear cemento-enamel junction, severe gingival clinical alterations, iatrogenic restorative procedures, and excessive presence of calculus precluding periodontal probing were excluded [20].

Clinical evaluation was undertaken using a head light, clinical mirror, explorer, periodontal probe (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), and gauze. Initially, the plaque index [21] and the Decayed, Missing, and Filled Teeth (DMFT) index were recorded. The following periodontal parameters were assessed on all included teeth: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), and bleeding on probing (BOP). Six measurements were performed per tooth (circumferential probing) and the highest value for each site (mesial, buccal, distal, and lingual) was recorded, summarizing four values for each tooth. Individuals were classified according to the 2018 classification for periodontitis as healthy and stages I, II, III, or IV [22]. For data analysis, participants of both groups (cases and controls) were further

classified into individuals without periodontitis [Periodontal health and stage I (borderline between gingivitis and periodontitis) were grouped] and individuals with periodontitis (stages II, III or IV).

COVID-19 related outcomes

The severity of COVID-19 was estimated using surrogate clinical outcomes: use of oxygen, hospitalization, admission to the intensive care unit (ICU), admission to the semi-intensive care unit (SICU), use of mechanical ventilation, length of hospitalization, length of ICU admission, length of mechanical ventilation, and death. Data on serum levels of lymphocytes, neutrophils, eosinophils, C-reactive protein, and D-dimer during hospitalization were collected from the medical records.

Saliva sample collection

In both groups, saliva samples were collected by the unstimulated technique for 5 minutes in sterile 50 mL tubes during the evaluation (T1) [23]. In a second moment (T2), saliva samples were collected from individuals who had had COVID-19 (mean 106.2 days after initial diagnosis). Saliva samples were stored at -80°C.

SARS-CoV-2 RNA extraction and RT-PCR assay

For SARS-CoV-2 RNA detection, RT-PCR assay was performed using saliva samples diluted in viral transport medium, as described previously [24]. Briefly, viral RNA extraction was executed using the Quick-RNA™ Viral Kit (cat#R1035, ZYMO Research, Irvine, CA USA), and later amplified using the Multiplex Luna® Universal Probe One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Bioscience, Ipswich, MA, USA). Reactions were analyzed using the Applied ABI 7500 equipment (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) at 55°C for 1 minute (45 cycles). The diagnosis of COVID-19 was performed according to CDC recommendations [25].

Quantification of molecules involved in inflammation and NET

Salivary concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-10, osteoprotegerin (OPG), and receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (RANKL) were measured through an ELISA-based capture assay using the kits (DuoSet® ELISA - R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The optical density was determined at 450 nm using FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to quantify NET's levels by identifying the myeloperoxidase (MPO)-DNA complex in saliva [26]. Fluorescence intensity (excitation at 488 nm and emission at 525 nm wavelength) was determined with a FlexStation 3 Microplate Reader.

Biofilm collection and bacterial DNA quantification

Subgingival biofilm samples were collected from the five sites with the highest PD using sterile absorbent paper cones (#30, Dentsply®, New York, NY, USA) introduced at each periodontal site for 60 seconds. The cones were then placed in a sterile microtube and stored at -80°C. A second sample of biofilm was collected from the COVID-19 patients at T2. Bacterial DNA quantification procedures were performed according to previously published methods [27, 28]. Briefly, bacterial DNA from periodontal biofilm samples was extracted by DNA Purification System (QIAamp UCP Pathogen, Qiagen, Hilden, Germany). Total bacterial load was quantified using the microbial DNA qPCR assay kit (QIAgen, Hilden, Germany) for 16S rRNA gene. RT-PCR analyses were performed in a MiniOpticon system (BioRad), using SybrGreen MasterMix (Invitrogen), specific primers (*Porphyromonas gingivalis*: sense TGCAACTTGCCTTACAGAGGG, antisense ACTCGTATCGCCCGTTATTC; *Tanerella forsythia*: sense GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT, antisense ACCCATCCGCAACCAATAAAA; *Treponema denticola*: sense AGAGCAAGCTCTCCCTTACCGT, antisense TAAGGGCGGCTTGAAATAATGA; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: sense ATGCCAACTTGACGTTAAAT, antisense AAACCCATCTCTGAGTTCTTCT) and 5 ng of DNA in each reaction. Calculations for determining each target microbe level were made from triplicate measurements of the target gene in comparison with standard curves to each target.

Data analysis

The Statistical Package for the Social Sciences software (version 22.0, IBM Inc., New Armonk, NJ, USA) and GraphPad Prism software (version 7.00, Graph-Pad software, La Jolla, CA, USA) were used for the description and statistics of the case and control groups. Intragroup comparisons between individuals with or without periodontitis were performed. The chi-square test was performed to analyze categoric variables and the Student's T test was performed for quantitative variables. In the COVID-19 group, comparisons (with the chi-square test and the Student's T test) between individuals with periodontitis or without periodontitis were performed for COVID-19-related outcomes. A binary regression was performed to examine the

influence of periodontitis on COVID-19-related outcomes, controlling for confounding variables. Comparisons of cytokines' concentrations between individuals with or without periodontitis were performed with Student T tests. The differences ($\Delta T2-T1$) for the variables cytokines' concentrations and bacterial loads during (T1) and after (T2) COVID-19 infection (cytokines variations and bacterial loads variations) were calculated with Paired T tests. Before the regression models, an explanatory analysis was conducted to identify confounders to each of the outcomes. Variables with p-value ≤ 0.20 were included in the models. For the regressions, the significance level was set at p-value ≤ 0.05 .

Results

Demographic characteristics, oral health-related behaviors and oral health outcomes

A total of 221 individuals in the COVID-19 wards were assessed for eligibility, 99 participants met the inclusion criteria and were included in the case group; age ranged from 16 to 74 years. Two hundred forty-two patients were assessed to compose the control group and 182 were included; age ranged from 20 to 74 years. There were no differences between the groups regarding age, sex, family income, schooling, oral hygiene habits, and body mass index (BMI). Smoking and alcoholism were more prevalent in the control group. Individuals in the control group had worse oral and periodontal status (higher DMFT index, higher number of tooth losses, as well as higher mean of PD, CAL, and BOP) than individuals in the COVID-19 group. However, no difference between groups was observed for the prevalence of periodontitis (**Supplementary Table 1**).

In both groups, individuals with periodontitis were older and had increased BMI compared to individuals with no periodontitis. In the COVID-19 group, individuals with periodontitis had lower family income and lower schooling than those without periodontitis. In the control group, most participants with periodontitis were male individuals and most participants without periodontitis were female. There was no difference on tooth brushing and flossing frequency between patients with and without periodontitis in both groups ($p > 0.05$) (**Table 1**).

The prevalence of depression, pulmonary and kidney diseases was higher among individuals in the COVID-19 group compared to those in the control group (**Supplementary Table 2**). The main symptoms of COVID-19 reported were respiratory symptoms (76.8%), fever (54.5%), ageusia (52.5%), anosmia (49.5%), gastrointestinal symptoms (40.4%), tiredness/malaise (21.2%), and tachycardia (2.0%).

Table 1. Demographic characteristics and oral health related behaviours of COVID-19 and control participants with and without periodontitis

Variables	Control			COVID-19		
	No periodontitis	Periodontitis	<i>p</i> value	No periodontitis	Periodontitis	<i>p</i> value
Age, <i>n</i> (%)						
<49 years	56 (58.9)	36 (41.4)	0.026*	34 (65.4)	15 (31.9)	0.001*
≥50 years	39 (41.1)	51 (58.6)		18 (34.6)	32 (68.1)	
Sex, <i>n</i> (%)						
Male	40 (42.1)	56 (64.4)	0.003*	28 (53.8)	24 (51.1)	0.842*
Female	55 (57.9)	31 (35.6)		24 (46.2)	23 (48.9)	
Family income, <i>n</i> (%)						
≤2 MWs	31 (40.3)	36 (45.6)	0.237**	20 (38.5)	32 (68.1)	0.003**
3-5 MWs	25 (32.5)	29 (36.7)		22 (42.3)	12 (25.5)	
≥5 MWs	21 (27.3)	14 (17.7)		10 (19.2)	3 (6.4)	
Schooling, <i>n</i> (%)						
≤8 years	24 (31.2)	34 (42.5)	0.186*	11 (21.2)	25 (53.2)	0.002*
>8 years	53 (68.8)	46 (57.5)		41 (78.8)	22 (46.8)	
Tooth brushing, <i>n</i> (%)						
Once/day	2 (2.6)	3 (3.8)	0.390**	3 (5.8)	3 (6.4)	0.821**
Twice/day	22 (28.6)	36 (45.0)		15 (28.8)	10 (21.3)	
3 times/day	53 (68.8)	33 (41.3)		28 (53.8)	30 (63.8)	

>3 times/day	0 (0.0)	8 (10.0)		6 (11.5)	4 (8.5)	
Flossing, <i>n</i> (%)						
No	28 (39.4)	38 (52.8)	0.132*	22 (42.3)	24 (51.1)	0.424*
Yes	43 (60.6)	34 (47.2)		30 (57.7)	23 (48.9)	
Smoking, <i>n</i> (%)						
No	55 (87.3)	52 (76.5)		40 (76.9)	33 (70.2)	
Yes	6 (9.5)	11 (16.2)	0.111**	3 (5.8)	0 (0.0)	0.262**
Ex-smoker	2 (3.2)	5 (7.4)		9 (17.3)	14 (29.8)	
BMI (kg/m ²)	25.37 ± 2.05	27.01 ± 4.37	0.019****	26.85 ± 6.06	31.03 ± 7.32	0.003****

Note: BMI, body mass index; MW, minimum wage; SD, standard deviation.

*Pearson chi-square test; **Linear by linear; ***Fisher's Exact; ****Student *t* test. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$

Periodontal and clinical status

In both groups, patients with periodontitis had worse oral health status, as the measurements of DMFT index, PD, and CAL among them were higher than among individuals without periodontitis. Tooth loss and BOP were also increased in individuals with periodontitis in both groups. In the COVID-19 group, plaque index was worse in patients with periodontitis than patients without periodontitis ($p < 0.001$) (**Table 2**).

Table 2. Clinical characteristics of COVID-19 and control participants with and without periodontitis

Variables	Control			COVID-19		
	No periodontitis	Periodontitis	<i>p</i> value	No periodontitis	Periodontitis	<i>p</i> value
DMFT index (mean ± SD)	13.92 ± 6.98	18.20 ± 5.42	0.001*	10.40 ± 7.35	16.70 ± 7.08	<0.001*
Tooth loss (mean ± SD)	3.53 ± 3.94	5.62 ± 3.70	<0.001*	3.35 ± 4.58	9.83 ± 6.54	<0.001*
PD (mm) (mean ± SD)	2.08 ± 0.45	3.08 ± 1.11	<0.001*	1.81 ± 0.25	2.39 ± 0.62	<0.001*
CAL (mm) (mean ± SD)	2.36 ± 0.68	3.54 ± 1.32	<0.001*	1.93 ± 0.35	2.90 ± 1.28	<0.001*
BOP, % (mean ± SD)	0.15 ± 0.15	0.30 ± 0.21	<0.001*	0.01 ± 0.02	0.46 ± 0.06	<0.001*
Salivary flow (ml/min) (mean ± SD)	0.40 ± 0.54	0.27 ± 0.48	0.155*	0.76 ± 0.42	0.78 ± 0.35	0.872*
Plaque index, <i>n</i> (%)						
Excellent/good	18 (94.7)	16 (76.2)	0.186***	46 (88.5)	26 (55.3)	<0.001**
Poor/terrible	1 (5.3)	5 (23.8)		6 (11.5)	21 (44.7)	

Note: BOP, bleeding on probing; CAL, clinical attachment level; DMFT, decayed, missing, and filled teeth; mm, millimeter; PD, probing depth; SD, standard deviation.

*Student *t* test; **Pearson chi-square test; ***Fisher's Exact. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

Periodontitis and COVID-19-related outcomes

Among individuals with COVID-19, periodontitis was associated to more hospitalization ($p=0.009$), more days at the ICU ($p=0.042$), admission to the SICU ($p=0.047$), and higher need for oxygen therapy ($p=0.042$). However, there was no difference in length of hospitalization, need for ICU, need for mechanical ventilation, or death between individuals with and without periodontitis in the COVID-19 group (**Table 3**).

Table 3. COVID-19-related outcomes of patients with and without periodontitis

Variables	COVID-19		
	No periodontitis	Periodontitis	<i>p</i> value
Hospitalization, <i>n</i> (%)			
No	10 (19.2)	1 (2.1)	0.009*
Yes	42 (80.8)	46 (97.9)	
Hospitalization length (mean ± SD)	16.04 ± 35.84	16.26 ± 15.53	0.969***
ICU, <i>n</i> (%)			
No	43 (82.7)	32 (68.1)	0.105*
Yes	9 (17.3)	15 (31.9)	
Change ICU to SICU, <i>n</i> (%)			
No	52 (100.0)	43 (91.5)	0.047**
Yes	0 (0.0)	4 (8.5)	
Days on ICU (mean ± SD)	0.83 ± 2.11	2.23 ± 4.20	0.042***
Mechanical ventilation, <i>n</i> (%)			
No	50 (96.2)	44 (93.6)	0.666**
Yes	2 (3.8)	3 (6.4)	
Days on mechanical ventilation (mean ± SD)	0.19 ± 0.97	0.43 ± 1.76	0.412***
Death, <i>n</i> (%)			
No	51 (98.1)	47 (100.0)	1.000**
Yes	1 (1.9)	0 (0.0)	
Oxygen therapy, <i>n</i> (%)			
No	19 (36.5)	8 (17.0)	0.042*
Yes	33 (63.5)	39 (83.0)	

Note: ICU, intensive care unit; SD, standard deviation; SICU, semi-intensive care unit.

*Pearson chi-square test; **Fisher's exact; ***Student *t* test. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

For the COVID-19 group, binary regression models evaluated the association of periodontitis with hospitalization and use of oxygen, controlled for the confounders BMI, cardiovascular alteration, and age (**Table 4**). After adjustment, individuals with periodontitis were 1.13 times more likely to be hospitalized than individuals without periodontitis (CI=1.01–1.26; $p=0.028$). The association between periodontitis and use of oxygen, controlled for the confounders was not significant.

Table 4. Binary regression of factors influencing hospitalization and use of oxygen in COVID-19 patients

	Hospitalization			Use of oxygen		
	OR	95% CI	<i>p</i> value	OR	95% CI	<i>p</i> value
Periodontitis						
No	1	-	0.028	1	0.658–1.065	0.149
Yes	1.13	1.01–1.26		1.19	0.938–1.519	
BMI						
Underweight	1	-	0.493	1		0.273
Normal weight	1.01	0.881–1.144	0.665	1.14	0.747–1.260	0.820
Overweight	1.03	0.874–1.233	0.945	1.03	0.793–1.338	0.310
Obese	1.19	0.721–1.960	-	2.69	0.457–15.873	-
Cardiovascular alteration						
No	1	-	0.026	1	-	0.183
Yes	1.16	1.018–1.322		1.18	0.924–1.510	
Age						
<49 years	1	0.833–1.055	0.285	1	-	0.557
≥50 years	1.06	0.947–1.200		1.07	0.841–1.379)	

Note: BMI, body mass index; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

Cytokine analysis in periodontitis and no periodontitis patients

The concentration of IL-6 was higher in patients with periodontitis than patients without periodontitis in the COVID-19 group ($p=0.010$). Patients with COVID-19 and periodontitis also had a higher salivary concentration of IL-6 than control individuals with periodontitis ($p=0.009$). The concentration of IL-1 β was augmented in individuals with periodontitis when compared to individuals without periodontitis in COVID-19 group ($p=0.028$) and control ($p=0.050$). No statistical differences were identified for the concentrations of IL-10, TNF- α , OPG, RANKL, and NETs (**Figure 1**).

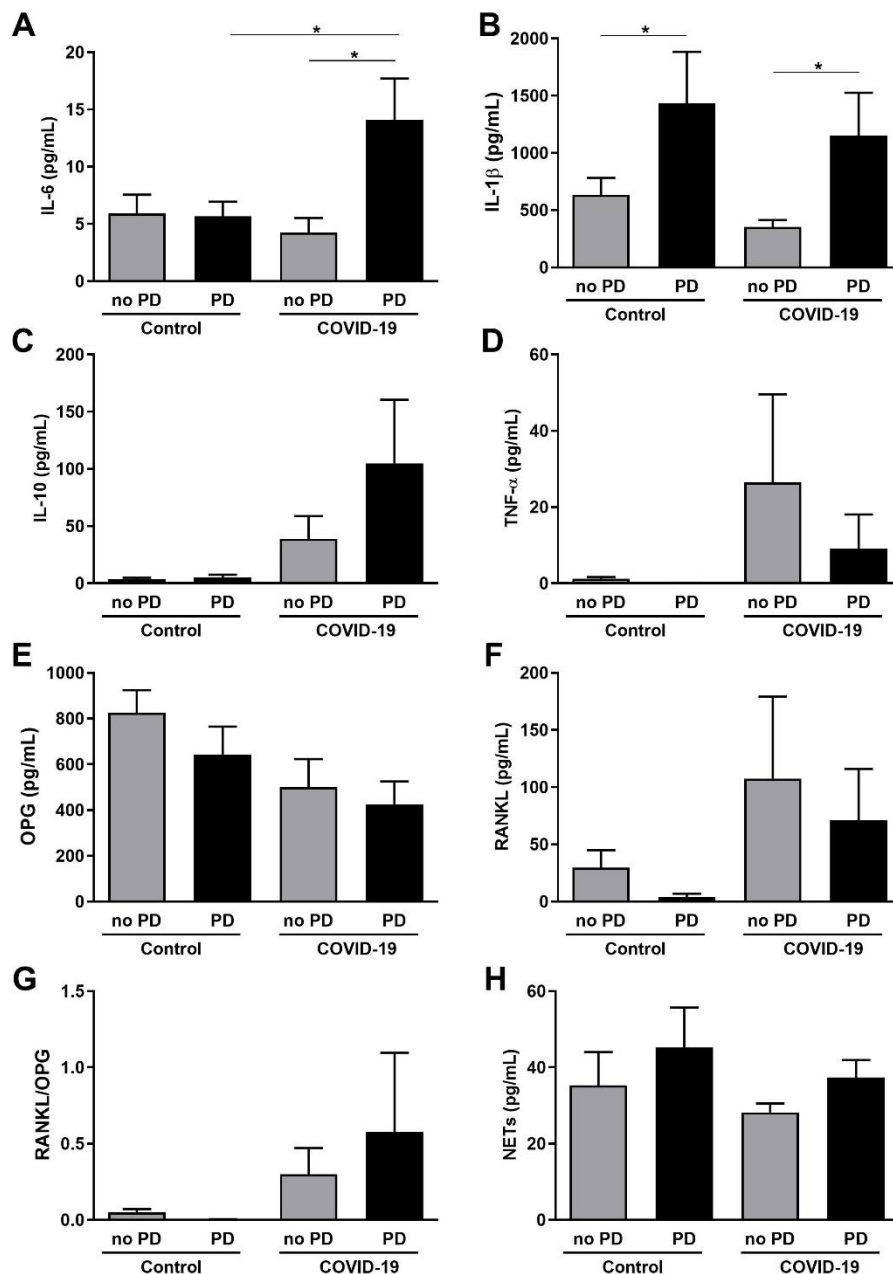


Figure 1. Cytokine and neutrophil extracellular traps (NETs) concentration on the saliva of individuals of group COVID-19 and control with and without periodontitis. (A) Interleukin (IL)-6, (B) IL-1 β , (C) IL-10, (D) tumoral necrosis factor alpha (TNF- α), (E) osteoprotegerin (OPG) (F), receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (RANKL), (G) RANKL/OPG, and (H) NETs.

Cytokine variation during and after COVID-19 infection

When analyzing cytokine variation ($\Delta T2-T1$), significant increases in IL-1 β ($p=0.005$), RANKL ($p=0.010$), and NETs ($p=0.039$) concentration were observed from T1 to T2 (≈ 100 days after initial diagnosis of SARS-CoV-2 infection). The concentrations of IL-10, OPG and TNF- α at T2 decreased compared to T1 without statistical significance (**Figure 2**). There was no association between the serum levels of lymphocytes, neutrophils, eosinophils, C-reactive protein, and D-dimer with the cytokine variation (data not shown).

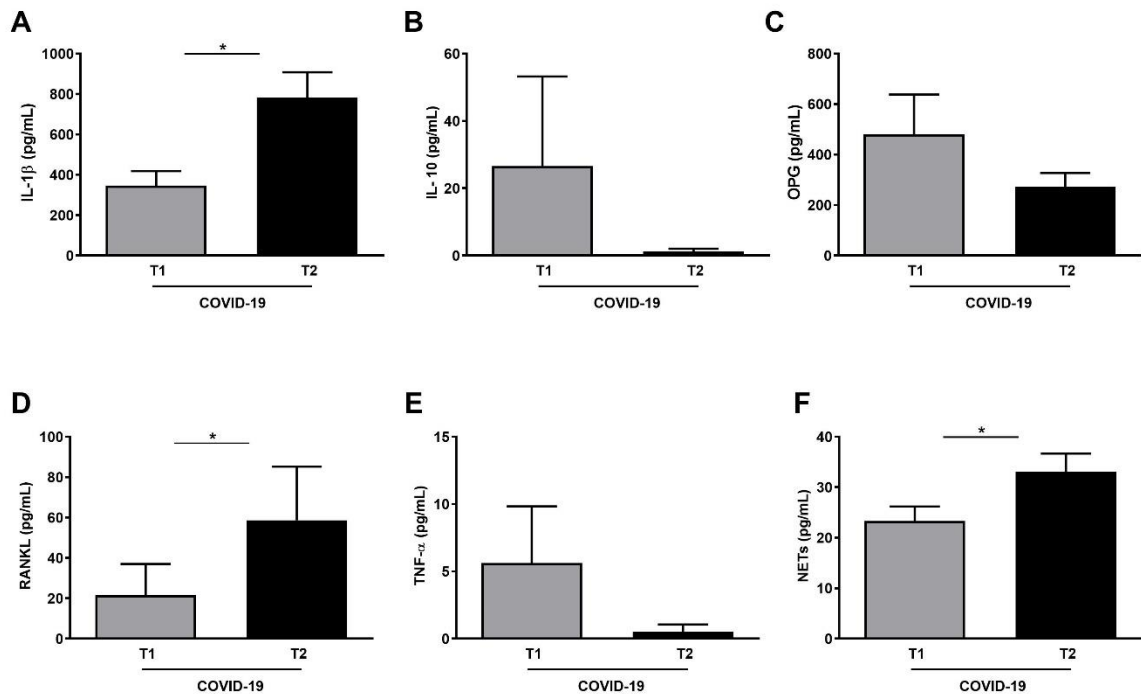


Figure 2. Cytokine and neutrophil extracellular traps concentration on the saliva of individuals with COVID-19 during and after the infection. (A) Interleukin (IL)-1 β , (B) IL-10, (C) osteoprotegerin (OPG), (D) receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (RANKL), (E) tumoral necrosis factor alpha (TNF- α), and (F) NETs.

Regression models were constructed with factors (ICU need, BMI, intubation need, periodontitis, smoking, and oxygen use) that could potentially explain the observed variation in cytokines concentration. Periodontitis was associated with a significant increase in levels of RANKL ($p=0.001$), and IL-1 β ($p=0.016$). Individuals who did not need oxygen therapy exhibited a reduction in the concentration of RANKL ($p=0.002$). The variation of NET's concentration was not associated with the variables included in the multivariate model (**Table 5**).

Table 5. Factors influencing the cytokine concentration change during and after COVID-19 infection

Variables	OPG		RANKL		IL-10		IL-1 β		TNF- α		NET	
	Mean \pm SD	<i>p</i> value	Mean \pm SD	<i>p</i> value	Mean \pm SD	<i>p</i> value	Mean \pm SD	<i>p</i> value	Mean \pm SD	<i>p</i> value	Mean \pm SD	<i>p</i> value
ICU												
No	-230.31 \pm 973.05	0.713**	-35.33 \pm 112.18	0.142**	-28.41 \pm 123.05	0.834**	439.34 \pm 592.28	0.960*	-6.29 \pm 19.34	0.618**	8.72 \pm 19.87	0.519*
Yes	-686.83 \pm 950.83		0.00 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		416.02 \pm 955.27		0.00 \pm 0.00		18.21 \pm 2.89	
BMI												
Under/normal weight	-710.11 \pm 1132.63	0.406**	-66.99 \pm 150.91	0.491**	-56.19 \pm 168.57	0.095**	249.64 \pm 472.18	0.207*	-11.87 \pm 25.95	0.126**	13.41 \pm 24.02	0.438*
Overweight/obese	110.19 \pm 575.04		0.23 \pm 0.72		2.26 \pm 5.04		605.39 \pm 678.49		0.00 \pm 0.00		6.40 \pm 13.48	
Intubation												
No	-218.32 \pm 945.37	0.561**	-33.37 \pm 109.15	0.894**	-26.84 \pm 119.57	0.886**	475.57 \pm 594.80	0.246*	-5.94 \pm 18.82	0.732**	9.14 \pm 19.36	0.583*
Yes	-662.32 \pm 985.50		23.4 \pm 33.09		0.00 \pm 0.00		-259.46 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		20.25 \pm 0.00	
Periodontitis												
No	-402.99 \pm 981.38	0.352**	-43.13 \pm 117.33	0.001**	-32.73 \pm 130.89	0.306**	271.99 \pm 549.07	0.016*	-7.12 \pm 20.52	0.453**	12.74 \pm 20.10	0.188*
Yes	188.97 \pm 782.33		11.61 \pm 21.72		1.96 \pm 3.92		1055.22 \pm 350.46		0.00 \pm 0.00		-1.58 \pm 7.81	
Smoking												
No	-281.76 \pm 982.86	0.453**	-33.37 \pm 109.15	0.497**	-26.83 \pm 119.57	0.886**	459.76 \pm 611.04	0.498*	-5.94 \pm 18.82	0.732**	7.96 \pm 17.85	0.085*
Yes	16.685 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		25.19 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		41.53 \pm 0.00	
Use of oxygen												
No	-405.84 \pm 958.34	0.272**	-42.90 \pm 123.04	0.002**	-34.51 \pm 135.69	0.716**	344.67 \pm 559.67	0.276*	-7.63 \pm 21.20	0.385**	7.97 \pm 21.87	0.308*
Yes	78.55 \pm 951.65		0.00 \pm 0.00		0.00 \pm 0.00		695.07 \pm 707.46		0.00 \pm 0.00		14.61 \pm 5.20	

Note: BMI, body mass index; ICU, intensive care unit; IL, interleukin; NET, neutrophil extracellular trap; OPG, osteoprotegerin; RANKL, receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand; SD, standard deviation; TNF, tumoral necrosis factor.

*Student t test; **Mann-Whitney test. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

Microbiological profile during and after COVID-19 infection

The bacterial loads of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* during the COVID-19 infection (T1) were higher, albeit not significant, when compared to T2 (\cong 100 days after infection). The bacterial loads of *T. forsythia* and *T. denticola* at T2 were higher, albeit not significant than at T1 (**Supplementary Figure 1**). There was no difference between the bacterial load of patients with and without periodontitis at the two time-points analyzed (data not shown).

Discussion

The present study investigated the potential association between the periodontal status and the severity of SARS-CoV-2 infection through clinical, inflammatory, and microbiological parameters. Our findings demonstrated that periodontitis was associated to higher rates of hospitalization, lengthier stay in the ICU, admission to the SICU, and higher need for oxygen therapy. After adjustment for confounders BMI, cardiovascular alteration and age, periodontitis resulted in a 1.13-fold increased chance of hospitalization. Increased salivary levels of IL-6 were seen in patients with COVID-19 and periodontitis. The presence of periodontitis was also related to a positive variation of RANKL and IL-1 β after COVID-19, even though no significant changes in the bacterial loads of periodontopathogens *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, and *T. denticola* were detected.

In 2019, there were 1.1 billion prevalent cases of severe periodontitis worldwide [5], making it one of the most prevalent diseases in the world and a public health problem, as the disease can lead to tooth loss, masticatory impairment, worse oral health-related quality of life, and a negative impact on several systemic diseases [7, 29-31]. Our clinical evaluation revealed that patients with periodontitis had higher rates of hospitalization and oxygen therapy requirements, lengthier stay at the ICU and to SICU admission, similar to data of Gupta et al. [11]. In contrast, we did not find association of periodontitis with mechanical ventilation and ICU admission or with death [9, 11, 12]. This is possibly due to the low mortality rate observed in our sample (1%) compared to other ones (2.4%, 9.7% and 24.2%, respectively) [9, 11, 12]. Further dissimilarities with other studies may be related to study design, clinical examination, periodontitis classification, and time of examination. In our study, periodontal examination was performed during the infection and the diagnosis of periodontitis was based on PD, CAL and tooth loss; moreover, a matched control group was included. Otherwise, some studies did not perform clinical periodontal examination [8, 9], did not include a control group [12, 32], and only evaluated patients after the infection [10].

The potential association of COVID-19 and periodontitis comes from the biological plausibility given that the two conditions appear to have similar pathological immune-mediated mechanisms [18, 19], they share very much alike risk factors [33, 34], and the periodontal pockets may act as reservoir of SARS-CoV-2 [13]. Periodontitis is characterized by loss of periodontal attachment due to microbiological challenge and it is associated with host-mediated inflammation [22], having been identified an increased number of proinflammatory markers such as IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , OPG, RANKL, and NETs that are representative of the periodontal disease status [17, 35, 36]. This research has verified that individuals infected with COVID-19 and diagnosed with periodontitis had higher salivary concentration of IL-6. Of clinical relevance, different studies have shown that individuals with periodontitis had increased serum and salivary levels of IL-6 [16, 37] and periodontal treatment reduces it [30, 38]. Noteworthy, patients with COVID-19 had increased serum levels of cytokines including IL-6 and this augment is significantly higher in critically ill patients [15]. Even though we did not observe significant changes in the target periodontal bacteria, it has been recently shown that periodontopathogens induce the expression of ACE-2, IL-6, and IL-8 in alveolar epithelial cells, suggesting that the aspiration of these bacteria regulates the inflammatory response on the lower respiratory tract [39]. Therefore, we hypothesize that periodontitis-induced local and systemic inflammation contributes to the deterioration of the clinical condition and more severe outcomes during COVID-19.

We also analyzed the cytokine production after COVID-19 infection detecting significant increases of IL-1 β , RANKL, and NETs. A regression model showed that presence of periodontitis explained IL-1 β and RANKL changes. Overall, these data pose concerns about the persistence of the virus at inflamed periodontal sites even after infection. The presence of virus in periodontal pockets may inhibit macrophage's response to the bacterial challenge reducing the cytokine production [40]. Thus, by these mechanisms, SARS-CoV-2 could lead to changes on the bacterial load and periodontal status, a hypothesis that needs to be further examined. Alternatively, the exacerbated systemic inflammation during COVID-19 could lead to a deterioration of the periodontal inflammation, thus resulting in an increase of those markers even after the infection. Consistently, the impact of systemic inflammation on periodontal tissues has been observed in chronic diseases such as rheumatoid arthritis [29] and diabetes [31].

A significant increase in the formation of NETs was observed in individuals with periodontal diseases [36], in contrast to our findings, in which patients with periodontitis of both groups presented higher concentration of NETs but without statistical significance.

Conversely, exacerbated formation of NETs has been reported in individuals with severe COVID-19 [41], yet in our study salivary levels of NETs increased only after infection, and this trend was not explained when correlated to confounders, including periodontitis.

The strengths of this study include the representative sample of unvaccinated patients from two reference centers, extensive data collection on cytokine, and bacterial load measurements during and after the infection. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate cytokines and microorganisms in patients with and without COVID-19 and to associate the findings with periodontal status. However, a limitation of this report is that the clinical evaluation of ICU patients was not possible because of the use of mask with reservoir and the mechanical ventilation tube, which precluded the assessment of highly severe patients. Taken together, the present data suggest that improvement in oral hygiene and periodontal treatment could potentially prevent complications of COVID-19 by reducing the possibilities of nosocomial pneumonia, reducing overall inflammation, and preventing the flow of microorganisms to the bloodstream through the periodontal pocket ulcerated epithelium.

Conclusions

In summary, worse periodontal status was associated to increased hospitalization, oxygen therapy, ICU length, and SICU admission. Periodontitis patients had augmented salivary levels of IL-6 during COVID-19 infection. The presence of periodontitis was also related to an increase of RANKL and IL-1 β after infection despite no significant changes in the bacterial loads of periodontopathogens *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, and *T. denticola*. Data reinforce the relevance of oral and periodontal care in patients with COVID-19 as a potential strategy to reduce overall inflammation and aspiration of microorganisms preventing complications.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; #APQ-00706-21), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; #88887.649872/2021-00; Finance code #001) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #305077/2021-0).

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee

and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

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

References

- [1] COVID-19 Cumulative Infection Collaborators (2022) Estimating global, regional, and national daily and cumulative infections with SARS-CoV-2 through Nov 14, 2021: a statistical analysis. *Lancet* 399:2351-2380. <https://doi.org/10.2196/24248>
- [2] Flanagan KL, MacIntyre CR, McIntyre PB, Nelson MR (2021) SARS-CoV-2 vaccines: where are we now? *J Allergy Clin Immunol Pract* 9:3535-3543. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.07.016>
- [3] Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, Javed H, Junaid K, Abdalla AE, Abosalif KOA, Ahmed Z, Younas S (2020) COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. *J Infect Public Health* 13:1833-1839. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.014>
- [4] Fagni F, Simon D, Tascilar K, Schoenau V, Sticherling M, Neurath MF, Schett G (2021) COVID-19 and immune-mediated inflammatory diseases: effect of disease and treatment on COVID-19 outcomes and vaccine responses. *Lancet Rheumatol* 3:e724-e736. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(21\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(21)00247-2)
- [5] Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM, Wen YF (2021) Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Periodontol* 48:1165-1188. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13506>
- [6] Dong J, Li W, Wang Q, Chen J, Zu Y, Zhou X, Guo Q (2022) Relationships between oral microecosystem and respiratory diseases. *Front Mol Biosci* 8:718222. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.718222>
- [7] Gomes-Filho IS, de Oliveira TF, da Cruz SS, Passos-Soares Jde S, Trindade SC, Oliveira MT, Souza-Machado A, Cruz AA, Barreto ML, Seymour GJ (2014) Influence of periodontitis in the development of nosocomial pneumonia: a case control study. *J Periodontol* 85:e82-90. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130369>
- [8] Larvin H, Wilmott S, Wu J, Kang J (2020) The impact of periodontal disease on hospital admission and mortality during COVID-19 pandemic. *Front Med (Lausanne)* 7:604980. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.604980>
- [9] Marouf N, Cai W, Said KN, Daas H, Diab H, Chinta VR, Hssain AA, Nicolau B, Sanz M, Tamimi F (2021) Association between periodontitis and severity of COVID-19 infection: A case-control study. *J Clin Periodontol* 48:483-491. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13435>
- [10] Anand PS, Jadhav P, Kamath KP, Kumar SR, Vijayalaxmi S, Anil S (2022). A case-control study on the association between periodontitis and coronavirus disease (COVID-19). *J Periodontol* 93:584-590. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0272>

- [11] Gupta S, Mohindra R, Singla M, Khera S, Sahni V, Kanta P, Soni RK, Kumar A, Gauba K, Goyal K, Singh MP, Ghosh A, Kajal K, Mahajan V, Bhalla A, Sorsa T, Räisänen I (2022) The clinical association between Periodontitis and COVID-19. *Clin Oral Investig* 26:1361-1374. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04111-3>
- [12] Costa CA, Vilela ACS, Oliveira SA, Gomes TD, Andrade AAC, Leles CR, Costa NL (2022) Poor oral health status and adverse COVID-19 outcomes: A preliminary study in hospitalized patients. *J Periodontol* <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0624>
- [13] Fernandes Matuck B, Dolhnikoff M, Maia GVA, Isaac Sendyk D, Zarpellon A, Costa Gomes S, Duarte-Neto AN, Rebello Pinho JR, Gomes-Gouvêa MS, Sousa SCOM, Mauad T, Saldiva PHDN, Braz-Silva PH, da Silva LFF (2020) Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: a post-mortem study. *J Oral Microbiol* 13:1848135. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1848135>
- [14] Huang N, Pérez P, Kato T, Mikami Y, Okuda K, Gilmore RC, Conde CD, Gasmi B, Stein S, Beach M, Pelayo E, Maldonado JO, Lafont BA, Jang SI, Nasir N, Padilla RJ, Murrah VA, Maile R, Lovell W, Wallet SM, Bowman NM, Meinig SL, Wolfgang MC, Choudhury SN, Novotny M, Aevermann BD, Scheuermann RH, Cannon G, Anderson CW, Lee RE, Marchesan JT, Bush M, Freire M, Kimple AJ, Herr DL, Rabin J, Grazioli A, Das S, French BN, Pranzatelli T, Chiorini JA, Kleiner DE, Pittaluga S, Hewitt SM, Burbelo PD, Chertow D; NIH COVID-19 Autopsy Consortium; HCA Oral and Craniofacial Biological Network, Frank K, Lee J, Boucher RC, Teichmann SA, Warner BM, Byrd KM (2021) SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med* 27:892-903. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01296-8>
- [15] Han H, Ma Q, Li C, Liu R, Zhao L, Wang W, Zhang P, Liu X, Gao G, Liu F, Jiang Y, Cheng X, Zhu C, Xia Y (2020) Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg Microbes Infect* 9:1123-1130. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1770129>
- [16] Kawamoto D, Amado PPL, Albuquerque-Souza E, Bueno MR, Vale GC, Saraiva L, Mayer MPA (2020) Chemokines and cytokines profile in whole saliva of patients with periodontitis. *Cytokine* 135:155197. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155197>
- [17] Pan W, Wang Q, Chen Q (2019) The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* 11:30. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z>
- [18] Gupta S, Sahni V (2020) The intriguing commonality of NETosis between COVID-19 & periodontal disease. *Med Hypotheses* 144:109968. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109968>

- [19] Sahni V, Gupta S (2020) COVID-19 & periodontitis: the cytokine connection. *Med Hypotheses* 144:109908. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109908>
- [20] Costa FO, Guimarães AN, Cota LO, Pataro AL, Segundo TK, Cortelli SC, Costa JE (2009) Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *J Oral Sci* 51:199-206. <https://doi.org/10.2334/josnusd.51.199>
- [21] Silness J, Loe H (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 22:121-135. <https://doi.org/10.3109/00016356408993968>
- [22] Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS (2018) Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol* 45:S149-S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>
- [23] Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar MS, Slowey PD, Almas K (2016) Human saliva collection devices for proteomics: an update. *Int J Mol Sci* 17:846. <https://doi.org/10.3390/ijms17060846>
- [24] Miguita L, Martins-Chaves RR, Geddes VEV, Mendes SDR, Costa SFDS, Fonseca PLC, Menezes D, de Souza RM, Queiroz DC, Alves HJ, de Freitas RAB, Cruz AF, Moreira RG, Moreira FRR, Bemquerer LM, de Aguiar DR, de Souza E Silva ME, Sampaio AA, Jardimino FDM, de Souza LN, da Silva TA, Gomes CC, de Abreu MHNG, de Aguiar RS, de Souza RP, Gomez RS (2022) Biosafety in dental health care during the COVID-19 pandemic: a longitudinal study. *Front Oral Health* 3:871107. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.871107>
- [25] Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (2020) Centers for Disease Control and Prevention, Division of Viral Diseases, Atlanta, USA. CDC-006-00006.
- [26] Oliveira SR, de Arruda JAA, Schneider AH, Carvalho VF, Machado CC, Corrêa JD, Moura MF, Duffles LF, de Souza FFL, Ferreira GA, Costa FO, Abreu LG, Taba Júnior M, Fukada SY, de Oliveira RDR, Louzada-Júnior P, Cunha FQ, Silva TA (2021) Are neutrophil extracellular traps the link for the cross-talk between periodontitis and rheumatoid arthritis physiopathology? *Rheumatology (Oxford)* 61:174-184. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab289>
- [27] Nonnenmacher C, Dalpke A, Muttters R, Heeg K (2004) Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods* 59:117-125. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.06.006>
- [28] Cavalla F, Biguetti CC, Colavite PM, Silveira EV, Martins W Jr, Letra A, Trombone AP, Silva RM, Garlet GP (2015) TBX21-1993T/C (rs4794067) polymorphism is associated with

- increased risk of chronic periodontitis and increased T-bet expression in periodontal lesions, but does not significantly impact the IFN-g transcriptional level or the pattern of periodontopathic bacterial infection. *Virulence* 6:293-304. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1029828>
- [29] Bartold PM, Lopez-Oliva I (2020) Periodontitis and rheumatoid arthritis: an update 2012-2017. *Periodontol 2000* 83:189-212. <https://doi.org/10.1111/prd.12300>
- [30] Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VE, Abbas F, D'Aiuto F, Kastelein JJ, Loos BG (2014) Treatment of periodontitis improves the atherosclerotic profile: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 41:70-79. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12171>.
- [31] Preshaw PM, Taylor JJ, Jaedicke KM, De Jager M, Bikker JW, Selten W, Bissett SM, Whall KM, van de Merwe R, Areibi A, Jitprasertwong P, Al-Shahwani R, Weaver J, Taylor R, Wassall RR (2020) Treatment of periodontitis reduces systemic inflammation in type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 47:737-746. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13274>
- [32] Gomes SC, da Fonseca JG, Miller LM, Manenti L, Angst PDM, Lamers ML, Brum IS, Nunes LN (2022) SARS-CoV-2 RNA in dental biofilms: Supragingival and subgingival findings from inpatients in a COVID-19 intensive care unit. *J Periodontol*. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0623>
- [33] Reynolds MA (2014) Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000* 64:7-19. <https://doi.org/10.1111/prd.12047>
- [34]. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, Gan H, Sun YL, Fu W, Li W, Liang HL, Cao YY, Yan Q, Cao C, Gao HY, Brüggem MC, van de Veen W, Sokolowska M, Akdis M, Akdis CA (2021) Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* 76:428-455. <https://doi.org/10.1111/all.14657>
- [35] Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S (2015) Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J Immunol Res* 2015:615486. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>
- [36] Magán-Fernández A, Rasheed Al-Bakri SM, O'Valle F, Benavides-Reyes C, Abadía-Molina F, Mesa F (2020) Neutrophil extracellular traps in periodontitis. *Cells* 9:1494. <https://doi.org/10.3390/cells9061494>
- [37] Reddahi S, Bouziane A, Rida S, Tligui H, Ennibi O (2022) Salivary biomarkers in periodontitis patients: a pilot study. *Int J Dent* 2022:3664516. <https://doi.org/10.1155/2022/3664516>
- [38] Altay U, Gürgan CA, Ağbaht K (2013) Changes in inflammatory and metabolic parameters after periodontal treatment in patients with and without obesity. *J Periodontol* 84:13-23. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110646>

- [39] Takahashi Y, Watanabe N, Kamio N, Yokoe S, Suzuki R, Sato S, Iinuma T, Imai K (2021) Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and Proinflammatory Cytokines Induced by the Periodontopathic Bacterium *Fusobacterium nucleatum* in Human Respiratory Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 22:1352. <https://doi.org/10.3390/ijms22031352>
- [40] Lin YL, Li M (2009) Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol* 24:243-248. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00504.x>
- [41] Masso-Silva JA, Moshensky A, Lam MTY, Odish MF, Patel A, Xu L, Hansen E, Trescott S, Nguyen C, Kim R, Perofsky K, Perera S, Ma L, Pham J, Rolfsen M, Olay J, Shin J, Dan JM, Abbott RK, Ramirez S, Alexander TH, Lin GY, Fuentes AL, Advani I, Gunge D, Pretorius V, Malhotra A, Sun X, Duran J, Hepokoski M, Crotty S, Coufal NG, Meier A, Crotty Alexander LE (2022) Increased peripheral blood neutrophil activation phenotypes and neutrophil extracellular trap formation in critically ill coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a case series and review of the literature. *Clin Infect Dis* 74:479-489. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab437>

Supplementary Files

Supplementary Table 1. Clinicodemographic characteristics and oral health-related behaviors of participants with COVID-19 and controls

Variables	Control	COVID-19	<i>p</i> value
Age, <i>n</i> (%)			
<49 years	92 (50.5)	49 (49.5)	0.901*
≥50 years	90 (49.5)	50 (50.5)	
Sex, <i>n</i> (%)			
Male	96 (52.7)	52 (52.5)	1.000*
Female	86 (47.3)	47 (47.5)	
Family income, <i>n</i> (%)			
≤2 MWs	67 (42.9)	52 (52.5)	0.054**
3-5 MWs	54 (34.6)	34 (34.3)	
≥5 MWs	35 (22.4)	13 (13.1)	
Schooling, <i>n</i> (%)			
≤8 years	58 (36.9)	36 (36.4)	1.000*
>8 years	99 (63.1)	63 (63.6)	
Tooth brushing, <i>n</i> (%)			
Once/day	5 (3.2)	6 (6.1)	0.205**
Twice/day	58 (36.9)	25 (25.3)	
3 times/day	86 (54.8)	58 (58.6)	
>3 times/day	8 (5.1)	10 (10.1)	
Flossing, <i>n</i> (%)			
No	66 (46.2)	46 (46.5)	1.000*
Yes	77 (53.8)	53 (53.5)	
Smoking, <i>n</i> (%)			
No	107 (81.7)	73 (73.7)	0.006**
Yes	17 (13.0)	3 (3.0)	
Ex-smoker	7 (5.3)	23 (23.2)	
BMI - kg/m ² (mean ± SD)	26.31 ± 3.65	28.86 ± 6.98	0.002****
DMFT index (mean ± SD)	15.76 ± 6.67	13.39 ± 7.85	0.025****
Tooth loss (mean ± SD)	4.53 ± 3.96	6.42 ± 6.44	0.009****
PD (mm) (mean ± SD)	2.56 ± 0.96	2.09 ± 0.54	<0.001****
CAL (mm) (mean ± SD)	2.92 ± 1.19	2.39 ± 1.03	<0.001****
BOP - % (mean ± SD)	0.23 ± 0.19	0.27 ± 0.05	<0.001****
Salivary flow (mean ± SD)	0.34 ± 0.52	0.77 ± 0.39	<0.001****
Plaque index, <i>n</i> (%)			
Excellent/good	34 (85.0)	72 (72.7)	0.186*

Poor/terrible	6 (15.0)	27 (27.3)	
Periodontitis, <i>n</i> (%)			
Healthy	66 (36.3)	46 (46.5)	
Stage I	29 (15.9)	6 (6.1)	
Stage II	42 (23.1)	13 (13.1)	0.427**
Stage III	26 (14.3)	8 (8.1)	
Stage IV	19 (10.4)	26 (26.3)	
Periodontitis, <i>n</i> (%)			
No (healthy and stage I)	95 (52.2)	52 (52.5)	1.000*
Yes (stage II, stage III and stage IV)	87 (47.8)	47 (47.5)	

Note: BMI, body mass index; BOP, bleeding on probing; CAL, clinical attachment level; DMFT, decayed, missing and filled teeth; mm, millimeter; MW, minimum wage; PD, probing depth; SD, standard deviation.

*Pearson chi-square test; **Linear by linear; ***Fisher's Exact; ****Student *t* test. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

Supplementary Table 2. Comparison of systemic conditions between individuals with COVID-19 and controls

Variables	Control, <i>n</i> (%)	COVID-19, <i>n</i> (%)	<i>p</i> value
Cardiovascular			
No	25 (59.5)	49 (49.5)	0.357*
Yes	17 (40.5)	50 (50.5)	
Diabetes			
No	91 (85.8)	74 (74.4)	0.053*
Yes	15 (14.2)	25 (25.3)	
Depression			
No	75 (82.4)	47 (47.5)	0.022*
Yes	16 (17.6)	52 (52.5)	
Pulmonary			
No	42 (100.0)	89 (89.9)	0.033*
Yes	0 (0.0)	10 (10.1)	
Neoplasm			
No	41 (97.6)	89 (89.9)	0.174*
Yes	1 (2.4)	10 (10.1)	
Liver			
No	42 (100.0)	95 (96.0)	0.318**
Yes	0 (0.0)	4 (4.0)	
Kidney			
No	42 (100.0)	89 (89.9)	0.033*
Yes	00 (0.0)	10 (10.1)	
Gastrointestinal			
No	39 (92.9)	96 (97.0)	0.363*

Yes	3 (7.1)	3 (3.0)	
Neurologic			
No	42 (100.0)	94 (94.9)	0.322*
Yes	0 (0.0)	5 (5.1)	
Reumatologic			
No	40 (95.2)	95 (96.0)	1.000*
Yes	2 (4.8)	4 (4.0)	
Lymphoma/leukaemia			
No	42 (100.0)	91 (91.9)	0.105*
Yes	0 (0.0)	8 (8.1)	
Transplant			
No	42 (100.0)	93 (93.3)	0.179*
Yes	0 (0.0)	6 (6.1)	
Anemia			
No	42 (100.0)	98 (99.0)	1.000*
Yes	0 (0.0)	1 (1.0)	
AIDS			
No	42 (100.0)	98 (99.0)	0.497*
Yes	0 (0.0)	1 (1.0)	
Behçet disease			
No	42 (100.0)	98 (99.0)	1.000*
Yes	0 (0.0)	1 (1.0)	
Other			
No	40 (95.2)	85 (85.9)	0.149*
Yes	2 (4.8)	14 (14.1)	

Note: *Cardiovascular system:* acute aortic syndrome; aneurysm; arrhythmia; arterial fibrillation; arterial hypertension; brain stroke; chagas cardiomyopathy; congestive heart failure; coronary artery disease; deep vein thrombosis; diastolic heart failure; dilated cardiomyopathy; heart murmur; heart valve; hypercholesterolemia; ischemic heart disease;

papilledema; pulmonary embolism; Raynaud syndrome; rheumatic fever; supraventricular tachycardia.

Pulmonary system: bronchitis; chronic obstructive pulmonary disease; histoplasmosis; hypersensitivity pneumonitis; idiopathic pulmonary fibrosis; obstructive sleep apnea; pulmonary hypertension; tuberculosis.

Gastrointestinal system: chronic constipation; Chron's disease; dyspeptic syndrome; gastroesophageal reflux disease; gastrectomy.

Kidney system: chronic kidney disease; IgA nephropathy; nephritis; nephrolithiasis; single kidney.

Neurologic system: Alzheimer disease; chronic headache; chronic insomnia; dementia; Joubert syndrome; opioid dependence.

Liver system: choledocholithiasis; chronic liver disease; hepatic steatosis; hepatitis C; liver fibrosis; portal hypertension.

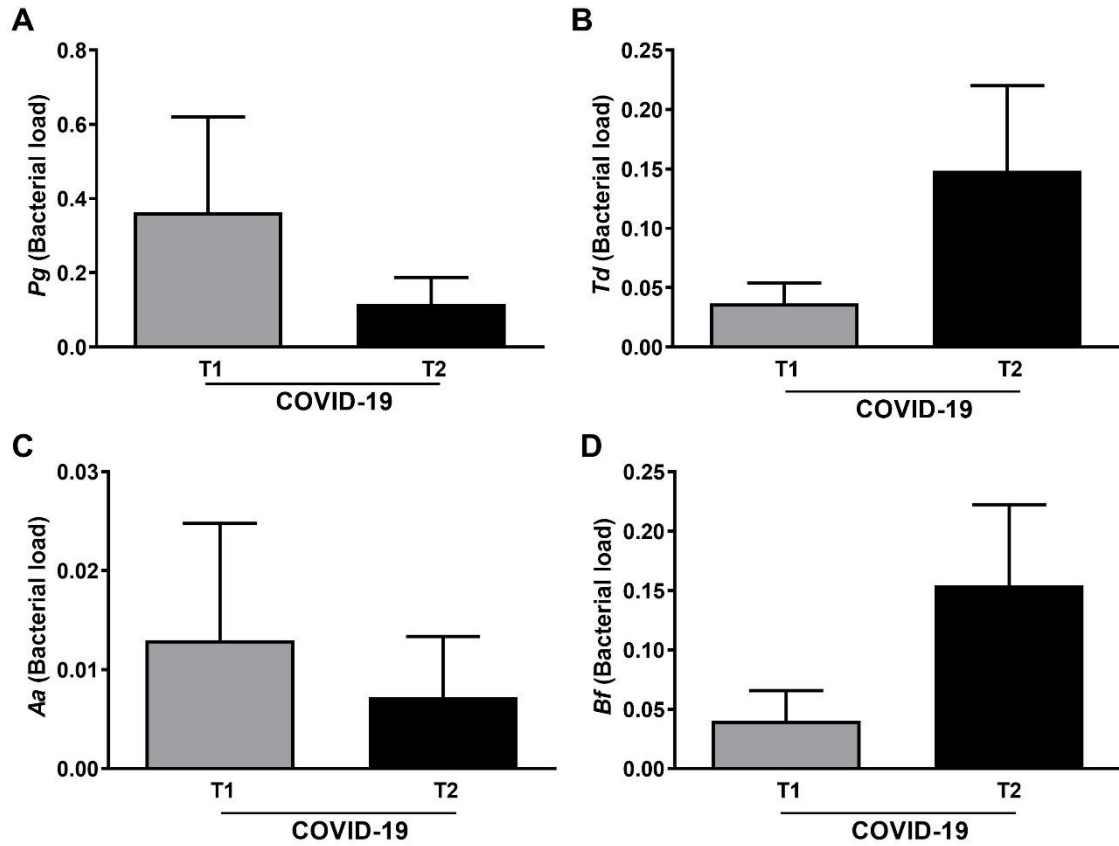
Rheumatologic conditions: arthritis; fibromyalgia; lupus.

Lymphoma/leukemia: lymphoma and lymphoproliferative/myelodysplastic diseases; leukemia; aplastic anemia.

Other: erythrocyte dysmorphism; hyperparathyroidism; hypothyroidism; monoclonal gammopathy; polycystic ovary syndrome; vitiligo; von Willebrand disease.

*Pearson chi-square test; **Fisher's Exact. Bold means statistically significant at $p \leq 0.05$.

Supplementary Figure 1. Bacterial load on periodontal biofilm of individuals with COVID-19 during (T1) and after the infection (T2). **(A)** *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), **(B)** *Treponema denticola* (*Td*), **(C)** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), and **(D)** *Tanerella forsythia* (*Tf*).



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo observou uma associação entre periodontite e taxas elevadas de hospitalização, maior admissão na Unidade de Terapia Semi-Intensiva, estadia prolongada na UTI, e maior necessidade de uso de oxigênio pelos indivíduos com COVID-19. Pacientes com periodontite apresentaram risco adicional de serem internados após ajuste para variáveis de confusão. Além disso, níveis elevados de IL-6 foram observados em pacientes com e periodontite COVID-19. A presença de periodontite esteve relacionada com uma variação positiva nos níveis de RANKL e IL-1 β após o fim da infecção pelo SARS-CoV-2 apesar de não terem sido observadas variações significativas nas cargas dos periodontopatógenos *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, and *T. denticola*. Os resultados deste estudo reforçam a relevância do cuidado periodontal e higiene bucal em pacientes com COVID-19 como potencial estratégia para reduzir a taxa global de inflamação sistêmica e a aspiração de microrganismos, possivelmente prevenindo e minimizando complicações da doença.

REFERÊNCIAS

WHO. **Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 22**. 2020a. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2. Acesso em: 10 set 2022.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. v. 1, n. 4, p. 536-544, 2020.

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report - 51**. 2020b. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10. Acesso em: 10 set 2022.

WHO. **Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 1**. 2020c. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf?sfvrsn=20a99c10_4. Acesso em: 10 set 2022.

KRANTZ, S. G.; RAO, A. S. R. S. Level of underreporting including underdiagnosis before the first peak of COVID-19 in various countries: Preliminary retrospective results based on wavelets and deterministic modeling. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 41, n. 7, p. 857–859, 2020.

LAU, H. et al. Internationally lost COVID-19 cases. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 53, p. 454–458, 2020.

JIANG, F. et al. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Journal of General Internal Medicine**. v. 35, n. 5, p. 1545-1549, 2020.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**. v. 579, p. 270–273, 2020.

XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**. v. 12, n. 1, p. 1–5, 2020.

FERNANDES MATUCK et al. Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: a post-mortem study. **Journal of Oral Microbiology**. v. 13, n. 1, p. 1848135, 2020.

HUANG N et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. **Nature Medicine**. v. 27, n. 1, p. 892-903, 2021.

SARZI-PUTTINI, P. et al. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? **Clinical and experimental rheumatology**. v. 38, n. 2, p. 337–342, 2020.

GATTINONI, L. et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? **Intensive Care Medicine**. v. 46, n. 6, p. 1099–1102, 2020.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19’. **The Journal of Infection**. v. 80, n. 6, p. 607–613, 2020.

HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes and Infections**. v. 9, n. 1, p. 1123–1130, 2020.

RICHARDSON, S. et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes among 5700 Patients Hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. **Journal of the American Medical Association**. v. 323, n. 20, p. 2052–2059, 2020.

EJAZ H et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. **Journal of Infection and Public Health**. v. 13, n. 12, p. 1833-1839, 2020

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 45, p. S149–S161, 2018.

BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**. v. 62, n. 1, 203–217, 2013.

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

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 44, n. S8, p. S94–S105, 2017.

CHEN M.X. et al. Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 48, n.9, p. 1165-1188, 2021.

HAJISHENGALLIS G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**. v. 35, n. 1, p. 3-11, 2014.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Molecular Oral Microbiology**. v. 27, n. 6, p. 409–419, 2012.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**. v. 69, n. 1, p. 7-17, 2015.

D'AIUTO, F. et al. Periodontitis and systemic inflammation: Control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **Journal of Dental Research**. v. 83, n. 2, p. 156–160, 2004.

KAWAMOTO, D. et al. Chemokines and cytokines profile in whole saliva of patients with periodontitis. **Cytokine**. v. 135, p. 155197, 2020.

NIBALI, L. et al. Influence of IL-6 haplotypes on clinical and inflammatory response in aggressive periodontitis. **Clinical Oral Investigations**. v. 17, n. 4, p. 1235–1242, 2013.

LINDEN, GERRY J.; HERZBERG, M. C. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 40, n. S14, p. S20–S23, 2013.

SANZ, M. et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 47, n. 3, p. 268–288, 2020.

BARTOLD, M.; MARIOTTI, A. The Future of Periodontal-Systemic Associations: Raising the Standards. **Current Oral Health Reports**, v. 4, n. 3, p. 258–262, 2017.

GOMES-FILHO, I. S. et al. Periodontitis and respiratory diseases: A systematic review with meta-analysis. **Oral Diseases**. v. 26, n. 2, p. 439–446, 2020.

GOMES-FILHO I.S.; PASSOS J.S.; SEIXAS DA CRUZ S. Respiratory disease and the role of oral bacteria. **Journal of Oral Microbiology**. v. 2, 2010.

GOMES-FILHO, I. S. et al. Influence of Periodontitis in the Development of Nosocomial Pneumonia: A Case Control Study. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 5, p. e82–e90, 2014.

LARVIN H. et al. The impact of periodontal disease on hospital admission and mortality during COVID-19 pandemic. **Frontiers in Medicine**. v. 7, p. 604980, 2020

MAROUF N. et al. Association between periodontitis and severity of COVID-19 infection: A case-control study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 48, p. 483-491, 2021

ANAND P.S. et al. A case-control study on the association between periodontitis and coronavirus disease (COVID-19). **Journal of Periodontology**. v. 93 ,p. 584-590, 2022

GUPTA S. et al. The clinical association between Periodontitis and COVID-19. **Clinical Oral Investigation**. v. 26, p. 1361-1374, 2022

COSTA C.A. et al. Poor oral health status and adverse COVID-19 outcomes: A preliminary study in hospitalized patients. **Journal of Periodontology**. Online ahead of print, 2022

GUPTA S.; SAHNI V. The intriguing commonality of NETosis between COVID-19 & periodontal disease. **Medical Hypotheses**. v. 144, p. 109968, 2020

SAHNI V; GUPTA S. COVID-19 & periodontitis: the cytokine connection. **Medical Hypotheses**. v. 144, p. 109908, 2020

KNOTTNERUS, A.; TUGWELL, P. STROBE--a checklist to Strengthen the Reporting of Observational Studies in Epidemiology. **Journal of Clinical Epidemiology**. v. 61,n. 4, p. 323, 2008.

COSTA, F.O. et al. Impact of different periodontitis case definitions on periodontal

research. **Journal of Oral Science**. v. 51, n. 2, p. 199–206, 2009.

TOMAR, S. L.; ASMA, S. Smoking-Attributable Periodontitis in the United States: Findings From NHANES III. *Journal of Periodontology*, v. 71, n. 5, p. 743–751, 2000

WHO. Oral health surveys: basic methods. 4th ed. **World Health Organization** , 1980

LANGLAIS R.P; MILLER C.P. Color Atlas of Common Oral Diseases. 3rd ed. 242p. 2003

KLEIN H.; PALMER C.E. Studies on Dental Caries: V. Familial Resemblance in the Caries Experience of Siblings. Public Health Reports. v. 53, n. 31, p. 1353-1364, 1938.

SILNESS J.; LOE H. Periodontal disease in pregnancy. li. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 22, p. 121–135, 1964.

AINAMO J.; BAY I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **International Dental Journal**. v.25, n.4, p. 229-235, 1975

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aspectos clínicos, periodontais, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19: um estudo caso-controle

Pesquisador: Tarcília Aparecida da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37273320.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.357.894

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto da grande área das Ciências da Saúde que propõe avaliar a condição periodontal, presença de lesões bucais, aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19 em relação a indivíduos negativos para Covid-19.

Conforme descrito pela proponente, a Covid-19 é a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, cuja disseminação mundial culminou em uma pandemia em março de 2020. Os sintomas mais comuns associados à Covid-19 são febre, fadiga, tosse seca, enxaqueca, dispneia e diarreia, com os casos mais severos evoluindo com síndrome do desconforto respiratório agudo. Um levantamento realizado no Reino Unido e Estados Unidos da América com mais de 2 milhões de pessoas, confirmou a heterogeneidade de apresentação dos sintomas em pacientes com teste positivo para Covid-19 e destacou que a anosmia, perda do olfato, pode ser o sintoma mais preditivo de identificação da infecção. Além disso, casos mais graves da doença e pior prognóstico foram relatados em pacientes que apresentavam comorbidades como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade, doença pulmonar crônica e doença renal crônica. As manifestações clínicas da Covid-19 parecem ser determinadas não somente pela ação do vírus propriamente dita, mas também pela resposta do sistema imune hospedeiro. O dano pulmonar pode estar associado a resposta imune exacerbada, levando a um estado hiperinflamatório com produção excessiva de citocinas.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

Permanece pouco explorada a relação da Covid-19 com outras doenças inflamatórias e/ou infecciosas, as quais poderiam contribuir para um aumento da resposta inflamatória sistêmica e desta forma para modificação do curso da Covid-19. Neste sentido, a periodontite (PE) é uma doença inflamatória infecciosa causada por bactérias anaeróbias, que leva à destruição dos tecidos de suporte dos dentes. A doença resulta da quebra da homeostase entre a microbiota subgingival e os mecanismos de resposta do hospedeiro em indivíduos suscetíveis e está associada ao aumento da resposta inflamatória local e sistêmica. A PE apresenta alta prevalência mundial, representando um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Nos últimos anos, a associação entre doenças sistêmicas e PE tem sido cada vez mais reportada. Vários estudos apontam evidências de associação entre PE e diversas condições como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e distúrbios na gestação. A plausibilidade biológica baseia-se no conceito de que a inflamação e o microbioma periodontal contribuem para a carga global de inflamação sistêmica em um nível que afeta a ocorrência, gravidade e progressão de outras condições inflamatórias crônicas .

De pontual interesse para este estudo, a relação entre PE e doenças respiratórias tem sido ainda confirmada por diversos estudos. Adicionalmente, trabalhos recentes propõem uma associação entre a PE e a Covid-19 com base na similaridade dos mecanismos de patogênese e fatores de risco comuns às duas doenças.

A hipótese do presente projeto é que exista correlação entre a condição de saúde periodontal e as manifestações clínicas da Covid-19, uma vez que existe plausibilidade biológica para essa conjectura.

A saliva pode representar ainda uma plataforma importante para diagnóstico rápido e precoce da doença com boa relação custo-efetividade. Além disto, a saliva pode contribuir para o estudo da resposta imune ao vírus. Um dado biológico com importante repercussão clínica é a demonstração que o novo coronavírus utiliza o receptor ACE2 (Enzima conversora de angiotensina-2) para entrada nas células e a mucosa bucal apresenta elevada expressão deste receptor, sugerindo a mucosa oral como importante "porta de entrada" para o vírus. A interação do vírus com as células da mucosa bucal possivelmente desencadeia a produção de citocinas semelhante ao que ocorre em infecções causadas por outros tipos de vírus. Citocinas antivirais, particularmente interferons

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Si 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

(IFNs) do tipo I, podem determinar o balanço da resposta Th1/Th2 e desta forma o controle ou espalhamento da infecção. A resposta primária ao SARS-CoV2 usualmente resulta no clearance viral na maioria dos casos. No entanto, por razões ainda desconhecidas, a resposta imune secundária pode ser exagerada, resultando em dano tecidual, falência de órgãos e morte. A aparente disfunção imune observada na COVID-19 está relacionada ao aumento de citocinas com padrão Th2, sendo que elevados níveis de IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, CCL2, CCL3 e TNF- no soro apresentaram correlação com a severidade da doença. Porém, não existem dados disponíveis sobre o padrão de resposta imune salivar e sua correlação desfecho da Covid-19. A Covid-19 tem sido ainda associada a algumas manifestações bucais, com a presença de lesões de apresentação clínica variada por vezes diagnosticadas como infecções secundárias/opportunistas; reações a medicamentos ou processos inflamatórios inespecíficos. Com os dados atualmente disponíveis na literatura, ainda não é possível determinar se a perda da integridade da mucosa bucal no curso da Covid-19 representa manifestação primária da doença ou decorre de alterações secundárias ao tratamento e à piora da condição sistêmica dos indivíduos infectados. Dessa forma, há necessidade de estudos que avaliem a condição bucal dos pacientes contaminados a fim de construir dados que melhor subsidiem o diagnóstico e monitoramento clínico destas alterações, bem como possíveis associações com desfechos da Covid-19. O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, recentemente criou uma Unidade de Atendimento de Sintomáticos Respiratórios para atender e acompanhar pacientes com sintomas de Covid-19. Esses pacientes serão avaliados no presente estudo para investigar fatores convergentes entre os pacientes internados, que possam influenciar ou justificar a severidade da doença. Devido ao recente surgimento do SARS-CoV-2, com dados conflitantes sobre a patogênese e evolução da doença, não existem informações consistentes sobre os parâmetros periodontais e lesões bucais em pacientes hospitalizados devido à Covid-19. Neste sentido, este estudo caso-controle busca avaliar a condição periodontal, presença de lesões bucais, aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19.

METODOLOGIA:

Os participantes serão selecionados entre aqueles atendidos, submetidos a tratamento e sendo monitorados na Unidade de Atendimento de Sintomáticos Respiratórios do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte, Brasil. O grupo controle será composto por indivíduos sem qualquer doença sistêmica, selecionados entre parentes, acompanhantes dos pacientes ou trabalhadores dos respectivos centros de referência. Todos os indivíduos serão

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

submetidos a um exame periodontal completo realizado de acordo com disponibilidade e acessibilidade na rotina médica.

O diagnóstico de Covid-19 será determinado a partir de resultado positivo no exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) realizado pela equipe de clínica médica da Unidade de Atendimento de Sintomáticos Respiratórios do Hospital das Clínicas da UFMG. Este estudo será composto por uma amostra de conveniência obtida pela disponibilidade de exames realizados em indivíduos com COVID-19 no período de outubro de 2020 a outubro de 2021. Com base de cálculo expectativa, espera-se a participação de no mínimo 90 indivíduos casos e uma proporção de controles de 1:1. Os dados clínicos serão obtidos a partir dos prontuários médicos. Os exames periodontais, de boca completa, serão realizados considerando como indicadores: a) índice de placa (IP); b) sangramento gengival à sondagem (SS); c) profundidade de sondagem (PS); e d) nível de inserção clínica (NIC). O exame estomatológico será realizado com o auxílio de dois espelhos bucais que permitirão o acompanhamento da palpação feita nas estruturas bucais observando a cor, textura e qualquer anormalidade. As biópsias serão indicadas e realizadas de acordo com as condições clínicas. A saliva será coletada utilizando tubos Salivette. O ensaio imunoenzimático (ELISA) será empregado a fim de quantificar os níveis de citocinas (TNF-, IL-6, IL-10, IL-17), utilizando kits comercialmente disponíveis. Amostras do biofilme subgengival serão coletadas dos 5 sítios com maior valor de profundidade de sondagem com cones de papel absorvente estéril. Para mensuração do impacto da saúde oral autorrelatada na qualidade de vida (OHRQL) será utilizado o instrumento Oral Impacts on Daily Performance.

Os seguintes CRITÉRIOS DE INCLUSÃO serão estabelecidos: indivíduos de todas as faixas etárias, presença de pelo menos 8 dentes e ausência de contraindicações para exame clínico periodontal. Os critérios de exclusão serão indivíduos submetidos à antibioticoterapia ou terapia periodontal nos últimos três meses. Durante os exames clínicos periodontais, também serão adotados CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO de alguns elementos dentais, sendo eles: terceiros molares, dentes com impossibilidade de determinar a junção cimento-esmalte, com severas alterações morfológicas gengivais impedindo a sondagem periodontal, com lesões cáries extensas, com procedimentos restauradores iatrogênicos impedindo a conclusão do exame e presença excessiva de cálculo

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Avaliar a condição periodontal, presença de lesões bucais, aspectos clínicos,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19 em relação a indivíduos negativos para Covid-19. OBJETIVO SECUNDÁRIO: • Investigar a correlação entre a condição periodontal e a evolução clínica de pacientes diagnosticados com Covid-19;• Avaliar a condição geral de saúde bucal empregando-se índice CPO-D;• Investigar presença de lesões bucais que possam ser manifestações orais de Covid-19;• Determinar perfil inflamatório de indivíduos positivos para Covid-19 e controles, por meio da dosagem de TNF-alfa; IFN-gama, IL-6, IL-10, IL-8 e IL-17 na saliva;• Correlacionar os dados clínicos periodontais e perfil inflamatório salivar com desfechos/parâmetros clínicos e laboratoriais de indivíduos com COVID19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: Os riscos (e/ou desconfortos) envolvidos nesse estudo são referentes a coleta de dados, exame clínico periodontal, coleta de saliva e biofilme, os quais serão feitos com instrumental devidamente esterilizado nos padrões exigidos. Em alguns casos, também será realizada coleta de raspado de lesões orais. Possível constrangimento do participante em relação ao questionário ou exame clínico será devidamente esclarecido pelo pesquisador, deixando-o livre para decidir responder ou não às perguntas. A sua identidade será mantida em sigilo mesmo após a realização da pesquisa. Os riscos relacionados ao exame clínico (avaliação dos dentes, gengiva, mucosa, coleta de saliva e biofilme) será o possível constrangimento do participante em relação ao pesquisador e desconforto/ sensibilidade pelo uso de instrumentos na avaliação clínica e na coleta das amostras. **BENEFÍCIOS:** Os benefícios são: contribuir para construção do conhecimento em torno da Covid-19 e sua associação com problemas bucais e ajudar na busca de conhecimento para estratégias de saúde pública voltada ao manejo de pacientes com Covid-19, prevenção e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo em que os participantes serão triados na Unidade de Atendimento de Sintomáticos Respiratórios do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. De acordo com a metodologia descrita, envolve as seguintes intervenções: Exames Clínicos Periodontais, Avaliação de lesões bucais, biópsias bucais (se necessário), Coleta e análise da saliva, Coleta do biofilme e análise microbiológica, consulta a prontuário, aplicação de Questionário de impacto da saúde oral autorrelatada na qualidade de vida.

Envolve a formação de banco de material biológico para pesquisa (biorrepositório).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

Critérios de inclusão, mencionados na metodologia, informa a triagem de indivíduos de todas as Previsão de início em outubro de 2020.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Folha de rosto assinada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia
- Formulário de Informações Básicas
- Parecer consubstanciado aprovado pela Chefia do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia (CPC) - UFMG
- Anuência da Gerência de Ensino e Pesquisa do HC-UFMG/Ebserh
- Projeto completo
- TCLE

Na versão de resposta à diligência, foram apresentados:

- Carta resposta
- Termo de Constituição de Biorrepositório
- TCLEs para grupo controle e grupo de intervenção, com as devidas alterações solicitadas na diligência.

A seguir, a análise das pendências do parecer anterior:

1. Apresentar TCLEs separados para o grupo avaliado e o grupo controle, explicitando as intervenções de cada grupo. **PENDÊNCIA ATENDIDA**
2. Apresentar TALE para menores de 18 anos e TCLE para seu responsável legal, usando linguagem adequada à cada faixa etária (A linguagem para crianças de 7 a 11 anos e de 12-17 deve ser adequada ao entendimento conforme faixa etária. O TCLE para responsável deve ser a ele direcionado: "Convidamos o(a) Sr(a) a permitir a participação do menor sob sua responsabilidade...") **PENDÊNCIA ATENDIDA**
3. No TCLE e demais termos de consentimento, evitar o uso de termos técnicos pouco acessíveis ao participante leigo, ou explicar com linguagem simples e acessível o que significa. Exemplos desses termos no TCLE atual: "sonda milimetrada nos sulcos gengivais", "fluido crevicular gengival". **PENDÊNCIA ATENDIDA**
4. Informar no TCLE a possibilidade de biopsia bucal e que situação poderá ser solicitada.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

PENDÊNCIA ATENDIDA

5. No TCLE e demais docs de consentimento, informar que o pesquisador irá acessar dados do prontuário médico.

6. Para adequação à Res 441-11 e Portaria 2201-11, mencionar a formação de banco de material biológico (biorrepositório). Sugestão de texto a ser incluído: "Ao concordar em participar da pesquisa, solicitamos que autorize a coleta, transporte, armazenamento, utilização e descarte das amostras de ..., que ficarão temporariamente armazenados em geladeira no laboratório sob a responsabilidade do pesquisador. O sangue (plasma?processado?) será enviado à Fiocruz Instituto René Rachou para dosagem de marcadores e depois descartado (ver possibilidade de uso em pesquisas futuras em Recomendações). O material de swab nasal será enviado para diagnóstico do corona vírus ao LINBIO na Faculdade de Farmácia – UFMG. O material será utilizado em um prazo de até 5 anos (ou quanto durar a pesquisa) e depois descartado conforme normas de biossegurança vigentes. O consentimento pode ser retirado a qualquer momento. Neste caso as amostras serão imediatamente descartadas. Em caso de possibilidade de uso das amostras em pesquisas futuras, ver sugestão do item "Recomendações" PENDÊNCIA ATENDIDA, conforme teor do documento, não haverá aproveitamento do material biológico em pesquisas futuras.

7. A criação do Biorrepositório deve também estar oficializada no corpo do projeto ou em documento separado na Plataforma Brasil, por meio de Termo de Constituição de Biorrepositório ou documento similar, que contemple as informações detalhadas sobre o uso do material. Como sugestão, o proponente pode se basear no modelo que pode ser consultado no site do COEP-UFMG (Aba Biorrepositório). Especificar o local em que as amostras serão armazenadas e demais informações. Anexar à Plataforma com as assinaturas pertinentes. PENDÊNCIA ATENDIDA, porém falta assinatura do diretor da Unidade

8. No TCLE, Informar mais claramente que o participante terá direito a indenização em caso de danos decorrentes da pesquisa (sugere-se substituir a frase "Para todos os participantes, em caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa, será observada, nos termos da lei, a responsabilidade civil.") PENDÊNCIA ATENDIDA

9. No TCLE, inserir campo para rubrica de ambos, pesquisador e do participante, nas páginas anteriores à da assinatura. PENDÊNCIA ATENDIDA

Recomendações:

-

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/ 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu as pendências elencadas, conforme especificado em seção anterior, excetuando-se a falta de assinatura da Diretoria no Termo de Constituição de Biorrepositório. Por se tratar de questão documental e considerando que as demais assinaturas (pesquisador e departamento) estão presentes no documento, consideramos o projeto APROVADO. A pesquisadora deve se comprometer a obter a assinatura e inserir o documento na Plataforma como emenda em futuro próximo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1611378.pdf	15/10/2020 21:22:53		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termobiorrepositoriofinal.pdf	15/10/2020 21:22:15	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	carta2.pdf	15/10/2020 21:20:55	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2.pdf	15/10/2020 21:20:22	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEsTALEs2.pdf	15/10/2020 21:20:04	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	parecerprojetoeste.pdf	02/09/2020 15:17:37	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	Carta_anuencia_HC_UFMG27082020_Tarcilia.pdf	27/08/2020 20:06:25	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	26/08/2020	Tarcília Aparecida	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.357.894

Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	20:18:33	da Silva	Aceito
----------------	------------------------	----------	----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Outubro de 2020

Assinado por:

Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

HOSPITAL EDUARDO DE
MENEZES/ HEM/ FHEMIG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aspectos clínicos, periodontais, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19: um estudo caso-controle

Pesquisador: Tarcília Aparecida da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37273320.0.3002.5124

Instituição Proponente: FUNDACAO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.595.885

Apresentação do Projeto:

Aspectos clínicos, periodontais, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19: um estudo caso-controle

Tarcília Aparecida da Silva (Pesquisadora Principal)

Fernando Oliveira Costa (Orientador)

Larissa Marques Bemquerer (Aluna de Mestrado)

Denise Vieira Travassos (Professora da Faculdade de Odontologia da UFMG)

Fabiana Maria Kakehasi (Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina-UFMG)

Daniel Fajardo Mendes (Analista de Gestão e Assistência à Saúde – Odontologia HEM)

O projeto tem por objetivo avaliar a condição periodontal, presença de lesões bucais, aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19 em relação a indivíduos negativos para Covid-19.

Para isso serão correlacionados os dados clínicos periodontais e perfil inflamatório salivar com desfechos/parâmetros clínicos e laboratoriais de indivíduos com Covid-19. As intervenções realizadas incluem exames clínicos periodontais, avaliação de lesões bucais, biópsias bucais (se necessário), coleta e análise da saliva, coleta do biofilme e análise microbiológica, consulta

Endereço: Av. Dr.Cristiano Rezende, 2213

Bairro: Bonsucesso

CEP: 30.622-020

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3328-5084

Fax: (31)3328-5006

E-mail: hem.cep@hemig.mg.gov.br

HOSPITAL EDUARDO DE
MENEZES/ HEM/ FHEMIG



Continuação do Parecer: 4.595.885

a prontuário e aplicação de questionário de impacto da saúde oral autorrelatada na qualidade de vida.

A solicitação desta emenda ao projeto original aprovado se deve a dois aspectos principais:

- 1) necessidade de inclusão de outro centro de recrutamento de pacientes com COVID, o Hospital Eduardo de Menezes.
- 2) necessidade de inclusão de grupo controle sabidamente negativo para COVID19.

Para tal, propõe-se a inclusão de pacientes da Faculdade de Odontologia da UFMG que estão sendo testados para COVID-19 como parte do protocolo de retorno das atividades presenciais e pacientes do HC-UFMG que tenham realizado exame e apresentem resultado negativo para doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a condição periodontal, presença de lesões bucais, aspectos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos e imunológicos em indivíduos com Covid-19 em relação a indivíduos negativos para Covid-19.

4.2 Objetivos específicos

Investigar a correlação entre a condição periodontal e a evolução clínica de pacientes diagnosticados com Covid-19;

Avaliar a condição geral de saúde bucal empregando-se índice CPO-D;

Investigar presença de lesões bucais que possam ser manifestações orais de Covid-19;

Determinar perfil inflamatório de indivíduos positivos para Covid-19 e controles, por meio da dosagem de TNF-alfa; IFN-gama, IL-6, IL-10, IL-8 e IL-17 na saliva;

Correlacionar os dados clínicos periodontais e perfil inflamatório salivar com desfechos/parâmetros clínicos e laboratoriais de indivíduos com COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos (e/ou desconfortos) envolvidos nesse estudo são referentes ao exame clínico, coleta de saliva e fluido gengival, os quais serão feitos com instrumental devidamente esterilizado nos padrões exigidos. Se houver qualquer constrangimento em relação ao questionário o participante poderá decidir responder ou não às perguntas. Os riscos relacionados ao exame clínico (avaliação dos dentes, gengiva, mucosa, coleta de saliva e biofilme) será o possível desconforto/

Endereço: Av. Dr.Cristiano Rezende, 2213
 Bairro: Bonsucesso CEP: 30.622-020
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3328-5084 Fax: (31)3328-5006 E-mail: hem.cep@hemig.mg.gov.br

HOSPITAL EDUARDO DE
MENEZES/ HEM/ FHEMIG



Continuação do Parecer: 4.595.885

sensibilidade pelo uso de instrumentos na avaliação clínica e na coleta das amostras.

Os benefícios para o participante serão a avaliação odontológica e encaminhamento caso sejam observadas necessidades de tratamento.

Os resultados dessa pesquisa servirão para elaborar novos protocolos relacionados a saúde bucal de pacientes com Covid-19, beneficiando novos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância, bem delineada e que pode auxiliar no entendimento da associação entre manifestações bucais e Covid-19. Os resultados deste trabalho contribuirão para identificar grupos de risco e estabelecer protocolos de prevenção e tratamento multidisciplinar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Projeto inclui os itens obrigatórios para a Pesquisa científica. Questionários/escalas/instrumentos de avaliação ou diagnóstico, estão especificados.

Os TCLEs apresentados estão de acordo com as orientações da Resolução 466/12.

Recomendações:

Incluir os dados do CEP-HEM no TCLE que será aplicado aos pacientes do Hospital Eduardo de Menezes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, por se tratar de estudo relevante, apresentado de forma ética, bem fundamentado e que pode contribuir com evidências científicas no enfrentamento da pandemia da Covid-19.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	justificativaadendo.pdf	23/02/2021 11:50:56	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	adendoprojeto.pdf	23/02/2021 11:50:32	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	parecerhem.pdf	23/02/2021 11:49:46	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	termobiorrepositoriofinal.pdf	15/10/2020 21:22:15	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito

Endereço: Av. Dr.Cristiano Rezende, 2213
 Bairro: Bonsucesso CEP: 30.622-020
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3328-5084 Fax: (31)3328-5006 E-mail: hem.cep@hemig.mg.gov.br

HOSPITAL EDUARDO DE
MENEZES/ HEM/ FHEMIG



Continuação do Parecer: 4.595.885

Biobanco	termobiorrepositoriofinal.pdf	15/10/2020 21:22:15	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	carta2.pdf	15/10/2020 21:20:55	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2.pdf	15/10/2020 21:20:22	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEsTALEs2.pdf	15/10/2020 21:20:04	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	parecerprojetoeste.pdf	02/09/2020 15:17:37	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito
Outros	Carta_anuencia_HC_UFMG27082020_T arcilia.pdf	27/08/2020 20:06:25	Tarcília Aparecida da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 17 de Março de 2021

Assinado por:

JADER BERNARDO CAMPOMIZZI
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dr. Cristiano Rezende, 2213
 Bairro: Bonsucesso CEP: 30.622-020
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3328-5084 Fax: (31)3328-5006 E-mail: hem.cep@hemig.mg.gov.br