



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facolta' di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in:

IGIENE DENTALE

Tesi di Laurea:

**MALATTIA PARODONTALE E ARTRITE
REUMATOIDE: CORRELAZIONI E RUOLO
DEL MICROBIOMA ORALE**

Candidato:

Relatore:

BIONDI MICHAEL

Prof. SPARABOMBE SCILLA

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

INTRODUZIONE.....	2
1)LA MALATTIA PARODONTALE.....	4
1.1)DIFFUSIONE E INCIDENZA DELLA PATOLOGIA.....	4
1.2)MICROBIOLOGIA DELLA MALATTIA PARODONTALE.....	8
1.2) PATOGENESI E RUOLO DELLE CITOCHINE PRO INFIAMMATORIE NELLA MALATTIA PARODONTALE.....	10
2) ARTRITE REUMATOIDE.....	18
2.1) DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA E COSTI PER LA SOCIETÀ.....	18
2.2) QUADRO CLINICO E CARATTERISTICHE DELL'AR.....	20
2.3) EZIOPATOGENESI DELL'ARTRITE REUMATOIDE.....	23
3) MALATTIA PARODONTALE E ARTRITE REUMATOIDE: REALE CONNESSIONE?	30
4)CONCLUSIONI	43
RINGRAZIAMENTI	45
BIBLIOGRAFIA.....	46

INTRODUZIONE

Questa tesi si rivolge al settore dell'igiene orale e della parodontologia, prendendo in considerazione la possibile correlazione tra malattia parodontale e artrite reumatoide.

Le motivazioni che hanno spinto ad approfondire tale tema hanno una duplice natura. L'interesse nei confronti della malattia parodontale è stato influenzato e sicuramente incentivato da alcune esperienze vissute durante il tirocinio universitario, che hanno permesso di entrare in contatto con realtà differenti. Per quanto riguarda l'artrite reumatoide, la conoscenza di una cara persona affetta da questa malattia autoimmune ha incrementato e incentivato fortemente l'interesse per l'argomento.

Lo scopo della tesi è capire se esiste una reale correlazione e influenza tra queste due patologie analizzando la bibliografia più recente sull'argomento. L'elaborato, in questo modo, mira a proporre delle nuove chiavi di lettura del possibile doppio rapporto tra le due malattie chiarendo se effettivamente l'igienista dentale può contribuire al miglioramento del benessere del paziente affetto tramite le sue terapie parodontali.

Tale trattazione verrà affrontata inizialmente definendo la malattia parodontale dal punto di vista epidemiologico, microbiologico e infiammatorio.

Successivamente verrà descritta l'artrite reumatoide, la sua classificazione, la sua eziologia, il suo quadro clinico e diagnostico, cenni sulla biochimica e sull'impatto che questa patologia ha sulla società.

Nel terzo capitolo verrà analizzato, se esiste, un possibile doppio rapporto tra le due patologie analizzando gli studi più importanti e confrontandoli tra loro.

Infine si trarranno le conclusioni sull' eventuale rapporto di influenza tra malattia parodontale e artrite reumatoide, riassumendo i punti principali della tesi e cercando di comprendere come è possibile seguire al meglio i pazienti malati e se è necessario adottare misure specifiche durante i trattamenti parodontali.

1) LA MALATTIA PARODONTALE

1.1) DIFFUSIONE E INCIDENZA DELLA PATOLOGIA

La malattia parodontale è una malattia infiammatoria cronica del parodonto ed è caratterizzata dalla perdita del legamento parodontale e dalla distruzione dell'osso alveolare circostante, con migrazione apicale dell'epitelio giunzionale (1). È la principale causa di perdita di denti ed è considerata una delle due maggiori minacce alla salute orale (1) (2). Le lesioni sono clinicamente caratterizzate da perdita di attacco clinico, accompagnate da formazione di tasche e / o recessione del tessuto gengivale. Queste lesioni sono generalmente indolori a meno che non si presentino contemporaneamente alla sua espressione acuta, l'ascesso parodontale (3).

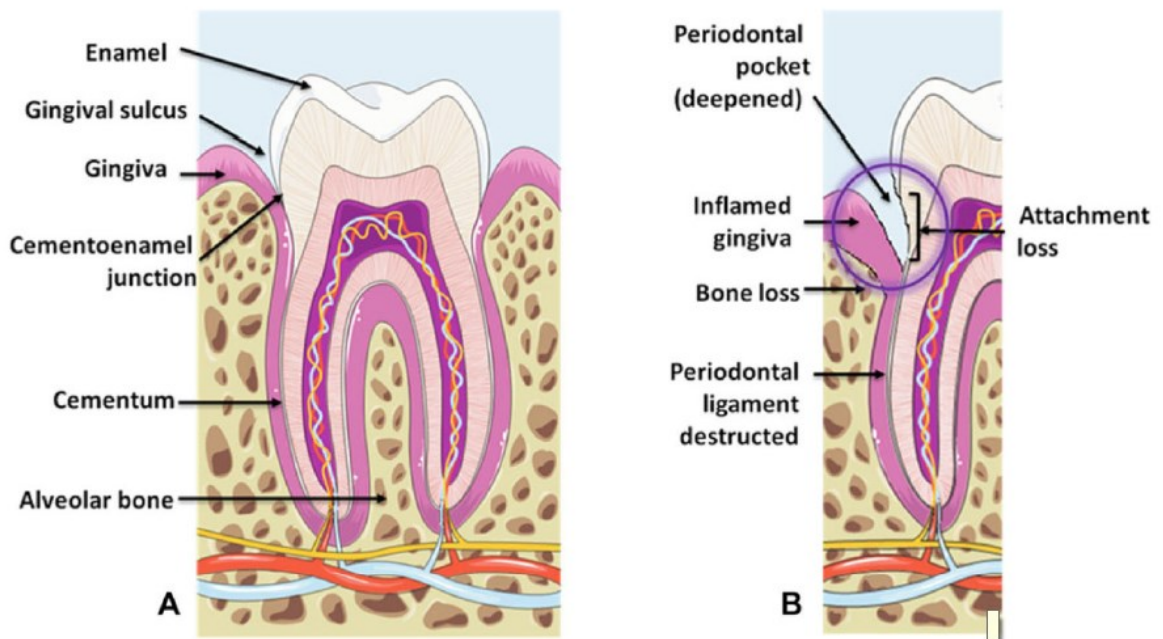


Figura 1: principali cambiamenti istopatologici nella parodontite



Figura 2: aspetto clinico della malattia parodontale

La parodontite può colpire soggetti d'ogni età: da bambini ancora in dentatura da latte a soggetti nella terza età. La prevalenza della parodontite nella popolazione varia con l'età del gruppo in oggetto: è meno del 1% in età pediatrica ma può raggiungere il 46% dei soggetti in popolazioni adulte o geriatriche (4). Addirittura le forme più severe di parodontite hanno un'incidenza del 10% su tutte le popolazioni osservate (5).

L'OMS conserva i dati globali sulla salute orale servendosi dell'indice CPI (6). La banca dati contiene importanti studi epidemiologici dei vari paesi mondiali sulla distribuzione della malattia parodontale nelle varie fasce di età, compresa la recentissima review di Billings (2018) (7). Il CPI, semplice da utilizzare per gli studi epidemiologici, presenta un punteggio che varia da 0 a 4, dove 0 non rappresenta alcuna malattia parodontale; 1 indica sanguinamento al sondaggio; 2 indica presenza di depositi di tartaro e sanguinamento; 3 indica tasche parodontali

poco profonde di 4-5 mm, mentre 4 indica tasche parodontali profonde superiori a 6mm (6). Per quanto riguarda gli adolescenti delle nazioni in via di sviluppo, essi hanno una maggiore prevalenza di depositi, sanguinamento al sondaggio e perdita di CAL. La percentuale di adolescenti con depositi di tartaro varia dal 35% al 70% nei paesi in via di sviluppo, mentre va dal 4% al 34% nei paesi sviluppati.

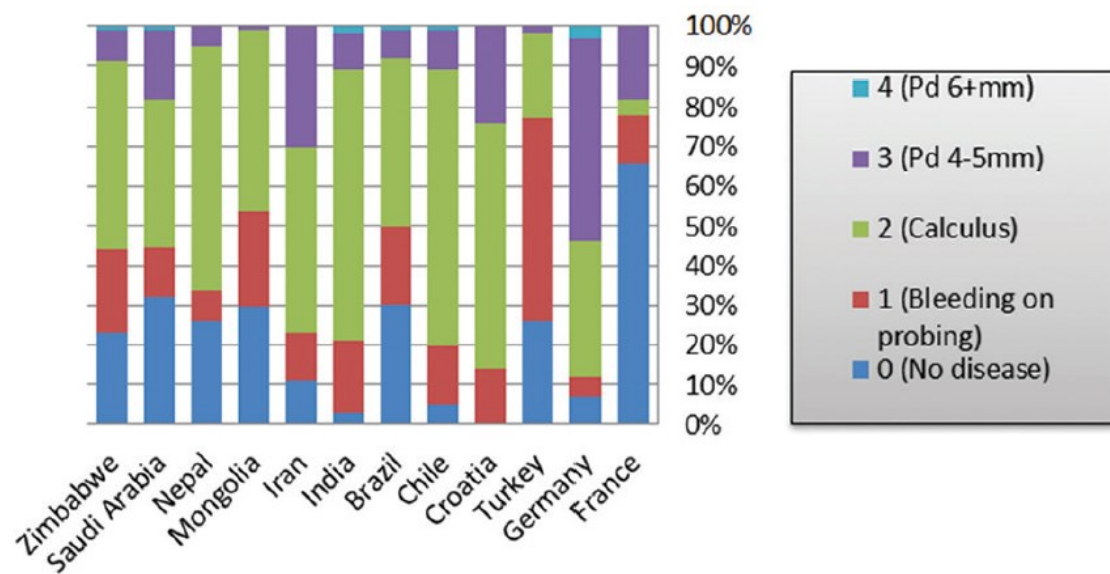


Figura 3:proporzioe di adolescenti con o senza segni di malattia parodontale

Similmente il 14-47% degli adulti nei paesi sviluppati ha molti meno depositi e perdite di CAL degli adulti nei paesi in via di sviluppo (6). In tutti i campioni analizzati, vi è un'associazione lineare tra CAL (importante fattore per delineare la severità dello stadio e grado della parodontite secondo le recenti linee guida del 2018) e età (7).

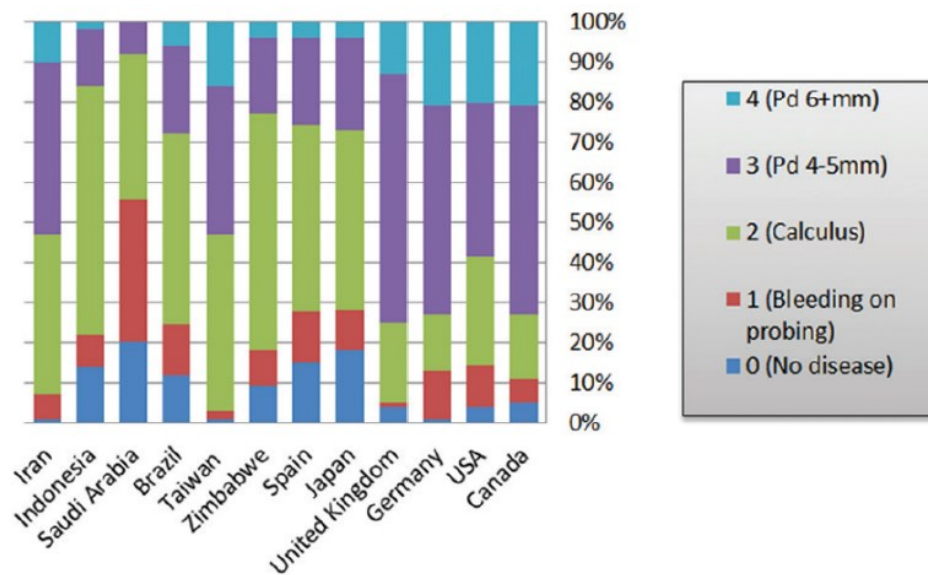


Figura 4: proporzione di adulti con o senza segni parodontali

Diversi studi epidemiologici hanno anche stabilito una relazione significativa tra stato socioeconomico e diffusione della malattia parodontale in varie fasce di età; in altre parole lo stato della malattia parodontale è più diffuso tra fasce a basso reddito o a bassa istruzione (8) (9). Ad esempio, in uno studio condotto tra la popolazione degli Stati Uniti (US) da Drury et al. (10), c'era una differenza del 10-20% in ordine alla prevalenza e alla gravità della malattia a seconda che le persone appartenessero ad uno status socioeconomico basso o alto.

1.2)MICROBIOLOGIA DELLA MALATTIA PARODONTALE

Una caratteristica distintiva della parodontite è sicuramente il fatto che sia associabile alla presenza di più di 500 specie batteriche (11). L'uomo ha tantissimi ecosistemi perfetti per la crescita, lo sviluppo e la colonizzazione di tantissimi microrganismi. In particolar modo, la cavità orale ha ottime superfici per lo sviluppo batterico. Ad esempio, il solco / tasca parodontale sono riparati da particolari forze fisiche di taglio nella cavità orale e presentano superfici durissime e non spargenti del dente, il tutto sommato alla mucosa gengivale che è a strettissimo contatto con il fluido crevicolare gengivale (12). L'epitelio, fisiologicamente viene costantemente ricambiato, tuttavia tante specie batteriche hanno acquisito la capacità di invadere e colonizzare direttamente i tessuti gengivali, risultando ancora più patogene, e mimetizzandosi dall'azione di varie cellule immunitarie (13).

Alcune specie batteriche, si è dimostrato, sono fortemente correlabili alla malattia parodontale. Per esempio *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) sono patogeni sicuramente parodontali quando sono in buon numero e in presenza di un ospite sensibile e predisposto (14).

Per esempio il *P. gingivalis* (che come vedremo secondo recenti studi è il batterio più correlabile anche all'artrite reumatoide), produce tantissimi fattori di virulenza (15). Ne sono un esempio i lipopolisaccaridi, emoagglutinine, fimbrie, e una serie di proteasi chiamate "gingipaine", che hanno la capacità di far assorbire amminoacidi da parte delle proteine ospiti, la degradazione dei linfociti T helper

CD4 (coinvolti nella difesa) e la scissione di un componente fondamentale del sistema del complemento (immunità innata) chiamato C5131. Tutto questo quindi facilita la sopravvivenza e la colonizzazione di questo dannoso patogeno parodontale. Inoltre questo batterio, come tanti altri Gram Negativi, ha una propria capsula extracellulare, che consente di resistere alla fagocitosi da parte dei macrofagi e neutrofilii polimorfonucleati (16). Il Lipide A, che è la porzione più esterna della parete cellulare, presenta particolari molecole che inducono una debole risposta immunitaria innata, processo che è di conseguenza essenziale per interrompere l'omeostasi orale e la salute orale (17).

Per quanto riguarda *A. actinomycetemcomitans*, questo è un batterio Gram negativo che produce tanti fattori di virulenza, tra cui proteine di adesione, lipopolisaccaride e tossine (18). Produce in particolar modo due tossine fondamentali nella eziopatogenesi della malattia parodontale: la tossina citoletana distensiva (CDT) e leucotossina (LtxA) (19). Queste due tossine sono implicate nella compromissione della funzionalità dell'immunità specifica (linfociti), interferendo nella capacità di progressione del ciclo cellulare, oltre a partecipare ai meccanismi di evasione immunitaria come descritto precedentemente per *P. Gingivalis* (20).

Infine *T. Forsythia* è un altro patogeno coinvolto nella patogenesi della malattia parodontale. Anche questo batterio produce proteasi della cisteina come la sialidasi (SiaHI) e la NanH, proteasi della tripsina e produce anche una proteina extracellulare BsaP che è in grado di attaccare il fibrinogeno e la fibronectina, degradando il tessuto connettivo, così importante in tutti i meccanismi di riparazione parodontale (21) (22). Tutti questi fattori di virulenza influenzano tantissimo l'omeostasi orale e lo sviluppo di patologie parodontali.

1.2) PATOGENESI E RUOLO DELLE CITOCCHINE PRO INFIAMMATORIE NELLA MALATTIA PARODONTALE

Come ben sappiamo, non è solo la presenza dei batteri l'unica causa delle malattie parodontali. Sebbene tali componenti microbici del biofilm della placca sopra e sottogengivale siano fattori eziologici fondamentali, la patogenesi della parodontite è una complessa rete di relazioni tra tanti fattori, come microbiota, ospite, tessuti modificabili da fumo, età, malattie sistemiche, genetica, natura e entità della risposta dell'ospite insieme a tantissimi altri fattori fenotipici del soggetto (23) (24). Recentemente la medicina ha fatto grandi passi in avanti riuscendo a capire i processi e le risposte innate ai batteri della placca, come avviene la loro attivazione (cellule T) compresa l'immunoregolazione del tessuto connettivo (e osso) (25). Anche le basi molecolari con i biomarkers dell'infiammazione cronica sono stati oggetti di studio e hanno rivelato tante nuove possibilità di intervento terapeutico.

Come si sviluppa il danno parodontale? I batteri grazie alle loro adesine riconoscono e interagiscono con elementi ospiti, come recettori, componenti di matrice extracellulare o proteine espresse sulle superfici di cellule ospiti (26). Una volta che vengono superate le barriere di difesa innata, questi patogeni inducono delle risposte infiammatorie locali attraverso la stimolazione dell'antigene e rilascio di tossine altamente dannose (27). Si attiverà poi in successione l'immunità innata e quella acquisita, con conseguente invasione dei tessuti gengivali e produzione di anticorpi da parte delle cellule B.

Per cercare di distruggere più patogeni possibili, le cellule epiteliali, i leucociti, osteoblasti, fibroblasti connettivali e cellule dendritiche rilasciano proteine infiammatorie come citochine e chemochine, tra cui l'interleuchina 1 (IL-1), IL-6, chemochine (CXC), fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e proteasi come le metalloproteinasi della matrice (MMP), prostaglandine e altri mediatori infiammatori (27).

Nonostante il loro ruolo di protezione e di coinvolgimento di altre cellule di difesa, queste proteine infiammatorie portano, se in eccesso, alla conseguente distruzione delle strutture portanti del dente colpendo soprattutto il tessuto connettivo e l'osso (27).

A causa di fattori infiammatori, immunitari e batterici, il tessuto parodontale appare gonfio, rosso, edematoso, infiammato e infetto, con gravi cambiamenti istologici e migrazione apicale dell'epitelio giunzionale, formazione di tasche e in alcuni casi anche perdita del dente (28).

I recenti progressi nel campo della parodontologia stabiliscono come la parodontite sia influenzata da una comunità sinergica e disbiotica piuttosto che da un complesso batterico selezionato, come invece veniva stabilito dalle prime linee guida sulle malattie parodontali dell'associazione americana di parodontologia (29)

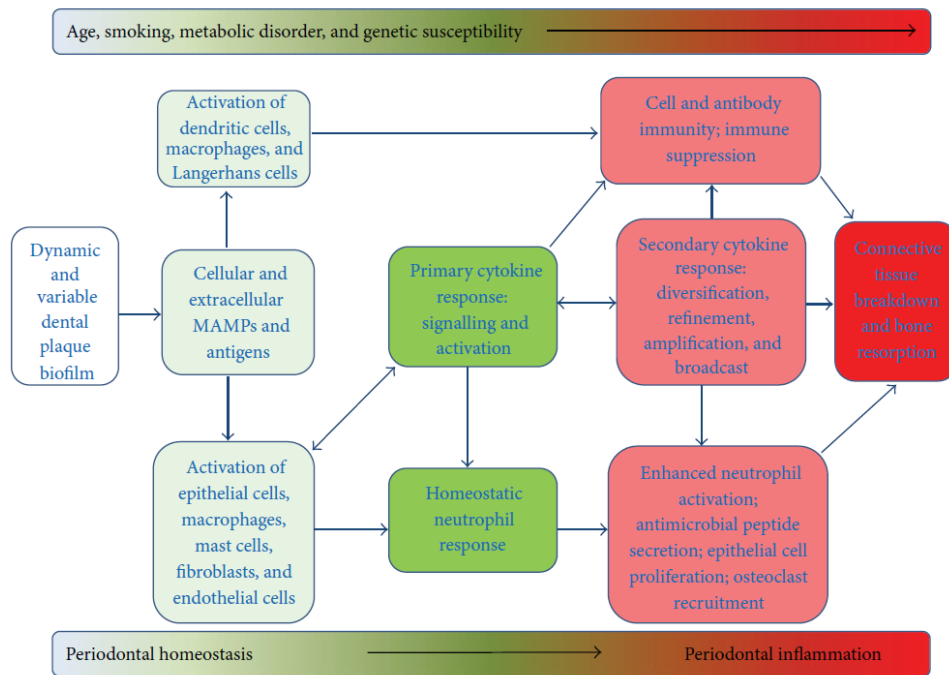


Figura 5: patogenesi della parodontite. Il biofilm è dinamico, soggetto a tanti cambiamenti quantitativi ed ecologici (cambiamenti di PH), cambiamenti nella regolazione immunitaria e fattori esterni come fumo. I batteri segnalano le cellule del tessuto locale attraverso varie vie intrinseche e tramite "molecular pattern" come lipopolisaccaridi e specifici antigeni. Un parodonto sano è mantenuto grazie a una efficace risposta da parte dei neutrofili, regolati da bassi livelli di citochine (come IL-11 β e IL-8) verso i patogeni in corrispondenza del margine gengivale. Un cambiamento nella qualità e quantità della placca verso specie più patogene come *P.gingivalis* o *T. denticola* portano a una risposta immunitaria potenziata attraverso una maggiore stimolazione nella produzione di citochine tra le cellule parodontali e immunitarie. È proprio questo che porta allo sviluppo della parodontite. La persistenza di queste risposte porta alla distruzione dei tessuti parodontali, con coinvolgimento dei tessuti connettivali (lamina propria).

Entriamo nello specifico: la risposta immunitaria costituisce un importantissimo sistema omeostatico, la prima linea di difesa in grado di riconoscere sostanze non self, innescando le opportune manovre per distruggerle. I meccanismi tramite cui si giunge alla produzione delle citochine coinvolgono strutture molecolari batteriche (chiamati MAMPS, come per esempio il lipopolisaccaride, DNA, fimbrie ecc.) e recettori di riconoscimento chiamati PRR o recettori simili chiamati NLR, attivi in tante cellule parodontali e immunitarie (30) (31). Anche se i MAMPS sono differenti, portano a percorsi biochimici simili, migliorando la funzione di alcuni

fattori di trascrizione infiammatoria (AP-1, NF- κ B), con conseguenze sul fenotipo cellulare e maggiore produzione citochinica (IL-8, IL-1 β).

Tra i principali e più studiati troviamo i PRR (recettori per il riconoscimento dei pattern), in grado di legare pattern molecolare associati ai patogeni, chiamati PAMP. Questi recettori comprendono varie famiglie, tra proteine del dominio dell'oligomerizzazione nucleotidici (NOD), recettori del complemento 3, lectine e altre forme di cluster di differenziazione 14 (CD14) (32). Tra i più importanti pattern analizzati negli studi ricordiamo i TLR, che riconoscono tanti modelli molecolari associati a vari tipi di patogeni, che agiscono tramite vari meccanismi di attivazione e segnalazione a cascata, attraverso un ligando extracellulare ricco di leucina (LRR). Tra tutti i TLR, quelli a pedaggio di tipo 2 (che riconoscono diversi componenti batterici come peptidoglicano, che non è presente nelle cellule eucariotiche) e di tipo 4 (che riconoscono il lipopolisaccaride di batteri Gram negativi) sono i più implicati e i più definiti nella eziopatogenesi della malattia parodontale (32) (33) (34). Dato che la gengiva è costantemente esposta ai microbi, si capisce quanto siano così importanti questi recettori. Come abbiamo visto, l'eccessiva produzione cronica di citochine pro infiammatorie prodotte da cellule dell'immunità innata e dai recettori a pedaggio, può portare alla distruzione dei tessuti parodontali (35) (36). Un importante studio di Rojo-Botello del 2012 (37) ha dimostrato, usando il microscopio confocale, che i recettori a pedaggio di tipo 4 e 9 erano più elevati nei pazienti parodontali rispetto a quelli sani, concludendo come l'espressione dei recettori è regolata positivamente con la gravità della malattia parodontale.

I neutrofili polimorfonucleati sono tra i primi soccorritori delle cellule infiammatorie a migrare verso il sito infiammato parodontale, attratti da particolari

proteine pro infiammatorie, come interleuchina-8, prodotta da cellule epiteliali degradate, fibroblasti connettivali e altre cellule immunitarie come macrofagi. Questi neutrofili sono quindi un chiaro segno infiammatorio (38). Hanno granuli contenenti vari enzimi che rilasciati degradano strutture di cellule dei tessuti e della matrice extracellulare. Essendo cellule di brevissima durata, una volta che hanno “ucciso” i batteri e le loro tossine, muoiono e si accumulano nei siti infiammatori, provocando rottura del tessuto nella parodontite. Una forma di parodontite associata a *P. gingivalis* è stata proprio correlata a questa eccessiva espressione dell’interleuchina 8 da parte delle cellule epiteliali gengivali che potrebbero di conseguenza alterare la corretta funzionalità dei neutrofili polimorfocellulari (39).

Oltre alle cellule dell’immunità innata, le cellule di immunità umorale e le citochine giocano un ruolo importante nello scenario della patogenesi della malattia parodontale, con particolare attenzione ai T helper CD4. Si tratta di cellule che dipendono dalle cellule presentanti l’antigene (immunità innata), che dopo la fagocitosi del patogeno, hanno la capacità di formare cloni di linfociti e migrare verso i linfonodi dove permetteranno la produzione di vari tipi di proteine pro infiammatorie (citochine). A loro volta queste molecole segnale contribuiscono all’attivazione di altri linfociti T helper CD4 (40). Esistono due tipologie di linfociti T in base alla caratteristica delle citochine prodotte. I linfociti T helper 1 sono alla base della produzione di citochine in grado di provocare e incentivare la distruzione ossea infiammatoria infettiva. Il linfocita T helper 2 invece produce citochine antagoniste che riducono la perdita ossea (41) (42). Negli ultimi anni sono stati scoperti altri sottogruppi di T helper con nuovi ruoli nella modulazione delle risposte dell’ospite (come per esempio i T helper17 che hanno proprietà infiammatorie coinvolti in processi autoimmuni) (43). Altri linfociti come i T helper

regolatori sono in grado di avere un effetto soppressivo sull'osteolisi infiammatoria mediata da citochine che trasformano il fattore di crescita b o l'interleuchina 10 (44) (45).

Le cellule T-helper 1 sono generate sotto stimolazione dell'interleuchina 12 / interferone- γ che porta all'attivazione del fattore di trascrizione T-bet. L'interferone - γ è associato alla produzione di citochine, chemochine e all'attivazione dei fagociti (46) (47).

Come dimostrato dai gruppi Gamonal e Garlet, l'interferone- γ è presente ad alti livelli nelle lesioni parodontali umane e può anche contribuire all'insorgenza e alla progressione della parodontite (48) (49), facilitando anche lo sviluppo di precursori di osteoclasti. Infine sembra svolgere un ruolo attivo nel controllo dell'infezione parodontale, mediato da macrofagi e all'attivazione dei neutrofili (36).

L'altra categoria di T helper è quella di tipo 2, che dipende fortemente dall'interleucina 4 e dal fattore di trascrizione GATA (50) (51). Questa interleuchina ha importanti attività soppressive e antinfiammatorie in quanto inibisce la trascrizione delle citochine e dell'interferone gamma, sopprimendo l'attivazione dei T helper di tipo 1 (52) (53). Pertanto potrebbe inibire la distruzione parodontale sia di tessuti molli che mineralizzati influenzando negativamente la patogenesi della parodontite. Uno studio ha infatti dimostrato come la concentrazione di interleuchina 4 nel fluido crevicolare migliori le lesioni parodontali (54). Possiamo quindi affermare che l'asse dell'immunità umorale che coinvolge le cellule T-helper 2 e B contribuisce anche alla protezione dell'ospite contro agenti patogeni parodontali (55).

Le citochine pro infiammatorie associate ai fenotipi delle cellule T helper 1, 2, 17, come interleuchina-1 β , interleuchina-6, interleuchina-17, interferone- γ e fattore di necrosi tumorale- α , se prodotte a dismisura possono alterare l'omeostasi cellulare (che dipende da un equilibrio dinamico tra osteoblasti e osteoclasti) e facilitare il riassorbimento osseo (56). Uno squilibrio a favore degli osteoclasti che riassorbono le ossa in maniera patologica è osservabile per esempio nell'artrite reumatoide e nel morbo di Paget., nei tumori ossei e nella parodontite (57). Grazie alla ricerca oggi sono state identificate tantissime citochine che stimolano il riassorbimento osseo compreso il fattore di necrosi tumorale- α , interleuchina-1 α , interleuchina-1 β , interleuchina-6, interleuchina-11, interleuchina-15 e interleuchina-17, mentre altre come interleuchina-4, interleuchina-5, interleuchina-10, interleuchina-13, interleuchina-18 e la trasformazione del fattore di crescita β 1 inibiscono il riassorbimento osseo (58).

Oltre alle già citate interleuchine, un documento di consenso del 7° Workshop europeo sulla malattia parodontale ha messo in evidenza in particolar modo tre citochine IL-1, TNF α , IL6 e un attivatore del ligando di fattore nucleare kappa-B (RANKL), che sembrano avere un ruolo centrale nei meccanismi a cascara delle malattie parodontali (59). L'IL-1 β , che interagisce spesso anche con TNF- α e prostaglandina E2, provoca principalmente modifiche vascolari associate all'infiammazione e influenza gli spostamenti dei neutrofili dalla circolazione al parodonto. Induce anche uno sviluppo maggiore di cellule T. Tuttavia da recenti studi sembra che non sia importanti nella patogenesi della malattia parodontale, grazie anche a indagini e studi su animali (60).

IL-6 è secreto in egual modo da tante cellule del parodonto, probabilmente in seguito a risposta secondaria dall'attività dell'IL-1 β . L'IL-6 è importante nella regolazione e nello sviluppo delle plasmacellule, cellule T e monociti (compresi gli osteoclasti che si sviluppano da essi). IL-6 sembra inoltre essere fondamentale nella propagazione dell'infiammazione in risposta a un elevato numero di batteri nella placca (61).

Capiamo quindi come le citochine possano da un lato migliorare la risposta immunitaria stimolando cellule presentanti l'antigene, come le cellule di langerhans, macrofagi e cellule dendritiche (31) regolando l'attività di varie cellule T; amplificano, trasmettono e diversificano la risposta immunitaria perfezionandola. Però la persistenza del microbiota patogeno all'interno della tasca parodontale, porta a una risposta sempre più attiva e ad una sempre maggiore produzione di proteine pro infiammatorie (62). Come conseguenza i fibroblasti gengivali vengono persi all'aumentare dell'infiltrato leucocitario; in tal modo si inizia a degradare il collagene e la distruzione del legamento parodontale che servirebbe invece per tenere ben saldo il dente nell'alveolo.

Inoltre nelle lesioni parodontali avanzate, vengono reclutati osteoclasti portando a riassorbimento osseo (63).

2) ARTRITE REUMATOIDE

2.1) DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA E COSTI PER LA SOCIETÀ

Mentre la gotta, la spondilite anchilosante e l'artrosi siano conosciute da migliaia di anni, l'artrite reumatoide (AR) è una patologia di diagnosi recentissima. Reperti di scheletri precolombiani tuttavia dimostrano che l'AR è un'antichissima patologia, che quindi ha influenzato la vita delle persone per almeno 4500 anni (64). La prima diagnosi venne fatta dal medico francese Landré-Beauvais di Parigi nel 1800, immaginandosi che la malattia colpisse solo le donne, dato che le sue pazienti erano tutte di sesso femminile (65). Il termine venne coniato da Alfred Bering Garrod nel 1876 e successivamente adottato dall'American Rheumatism Association (ARA) nel 1941 (66).

L'artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica a patogenesi immunitaria o non che colpisce soprattutto le articolazioni diartrosali, dove si verifica un processo infiammatorio a carattere erosivo che può portare alla distruzione dei capi ossei iuxta-articolari e all'anchilosi (66).

La frequenza dell'artrite reumatoide a livello internazionale è pressochè costante in tutte le popolazioni prese in analisi. In Italia si contano circa 410 mila casi di malati reumatici, in particolare le donne di età compresa tra i 40 e 50 anni, con un rapporto di 4 a 1 rispetto agli uomini (67). L'incidenza nelle donne è di 0,2-0,4 casi /1000 abitanti mentre negli uomini è di circa 0,1-0,2 casi / 1000 abitanti. L'esordio della malattia può avvenire in qualsiasi età, prevalentemente in soggetti tra i 40 e i 60 anni. Inoltre molti studi ritengono che l'artrite reumatoide riduca la vita dei pazienti di 5-10 anni rispetto al resto della popolazione oltre a comportare

una riduzione della qualità di vita e, molto spesso, la perdita della capacità lavorativa entro la prima decade dall'esordio della malattia, soprattutto quando la diagnosi viene fatta con grande ritardo in assenza di un supporto farmacologico e terapeutico (68). Per quanto riguarda i costi della patologia possiamo dire che sono molto elevati sia per il paziente che per la società. Una stima complessiva delle spese mediche in Italia consta una cifra di circa 1 miliardo di euro l'anno. La cifra può raggiungere i 5 miliardi se si considerano i costi indiretti legati alla perdita del lavoro da parte del malato e per sostenere le spese di chi lo assiste (69). Con la comparsa dei modernissimi farmaci biologici derivati dalle biotecnologie, i costi sono aumentati notevolmente in quanto, oltre ad essere molto cari, vengono prescritti più precocemente ai pazienti abbinandoli ai farmaci tradizionali. Tutto questo negli ultimi 10-15 anni. Si stima che il costo medio per paziente nel primo anno di terapia con i biologici si aggiri intorno ai 15 mila euro. È quindi necessario che ogni Stato analizzi diversi piani di azione per contenere le spese sanitarie e tutelare i diritti di cura di tutti i pazienti. (70)

2.2) QUADRO CLINICO E CARATTERISTICHE DELL'AR

Il quadro clinico può essere molto vario. Solitamente si presenta come una poliartrite che colpisce sia le grandi che le piccole articolazioni, inizialmente caratterizzata solo da dolore e non da deformità. In assenza di terapia e supporto, l'infiammazione può raggiungere altre articolazioni con conseguenti danni ai tessuti e successive deformità nei movimenti. Le tipiche deformità reumatiche, come per esempio le deviazioni ulnari delle dita, deformità a Z del pollice, collo a cigno, sono dovute principalmente al danneggiamento e allo spostamento dei tendini (71).



Figura 6: artrite reumatoide nelle mani

Sono colpite anche le articolazioni metacarpo-falangee e le interfalangee prossimali delle mani e dei polsi, le metatarso-falangee e le interfalangee dei piedi e delle caviglie, i cui sintomi sono calore e rigidità articolare. I versamenti articolari di

solito si verificano solo nelle articolazioni maggiori. In minor frequenza e in fase avanzata sono colpite le articolazioni delle ginocchia, gomito, spalle, le temporo mandibolari e le sterno clavicolari (72). Molto spesso viene interessata anche la zona cervicale. In particolare si riscontrano sublussazioni dell'atlante e, meno comunemente, sublussazioni nei livelli più bassi con compressione del cordone vertebrale. I sintomi principali sono il dolore irradiato nella zona occipitale, perdita di sensibilità, ritenzione urinaria o incontinenza.

Altre manifestazioni dell'artrite reumatoide extra-articolari comuni sono: noduli reumatici nelle zone di appoggio come nel tendine di Achille; infiammazione dei vasi sanguigni (soprattutto della mano e dei nervi e in rari casi quelli degli organi interni) (73).

Possono essere presenti in associazione all'artrite anche altri sintomi sistemici come astenia, malessere generale, febbre e depressione fin dalle prime fasi della malattia. AR presenta anche tante conseguenze sistemiche. Tanti studi hanno verificato un'associazione con eventi cardiovascolari nei pazienti con AR. (74). La causa di ciò può essere associata alle citochine che determinano una maggiore attivazione endoteliale rendendo più instabili le placche ateromatose.

Inoltre i pazienti con AR hanno spesso ipercolesterolemia (sia relativa al colesterolo HDL che LDL), soprattutto quando la patologia non è trattata (75). L'AR può coinvolgere anche le ghiandole esocrine provocando la sindrome di Sjogren; i muscoli scheletrici causando sarcopenia e ossa causando osteoporosi. Infine i pazienti con AR possono essere a maggior rischio di cancro, soprattutto leucemia e cancro renale (76).

Anche se attualmente non esiste una cura definitiva per questa patologia, il trattamento cerca di velocizzare più possibile la diagnosi in modo che la malattia si disattivi a un livello di diffusione molto basso. Le scale più utilizzate in Italia per valutare la progressione della patologia si basano sulla valutazione funzionale di 28 articolazioni (DAS-28) e sull'indice di valutazione delle malattie cliniche (CDAI) (77). I medici controllano frequentemente l'andamento della malattia attraverso la valutazione clinica del paziente e tramite esami da laboratorio specifici (tra cui il VES) in modo da comprendere se la terapia in atto è valida o è da sostituire. I farmaci attualmente più utilizzati sono i FANS (nei casi meno seri) che hanno la capacità di alleviare il gonfiore e la rigidità, senza influenzare la progressione dell'AR. Negli ultimi 20 anni hanno fatto ingresso nel mercato mondiale i cosiddetti farmaci biologici che hanno rivoluzionato completamente la prognosi di queste difficili patologie. Alcuni di questi farmaci, vanno a inibire particolare citochine pro infiammatorie (le stesse che riscontriamo nella malattia parodontale) tra cui il TNFalfa, o l'interleuchine IL-6 o IL-1. (78)

2.3) EZIOPATOGENESI DELL'ARTRITE REUMATOIDE

Esistono due differenti sottotipi di AR, definiti in base alla presenza o assenza di anticorpi circolanti anti-citrullinati (ACPA) (79) (80). La citrullinazione è catalizzata da un particolare enzima che si chiama PAD, peptidilarginina-deiminasi calcio-dipendente, che provoca una mutazione missenso sostituendo un'arginina con una citrullina polare ma neutra nella proteina finale. Questi anticorpi possono essere evidenziati in circa il 70 % dei pazienti con AR, e quindi sono ottimi markers patognomici (81). I soggetti ACPA positivi per AR in genere hanno un fenotipo clinico della malattia più aggressivo rispetto ai soggetti ACPA negativi di AR (82). Inoltre i soggetti ACPA negativi rispondono molto meno efficacemente al trattamento tramite l'immunosoppressore metotrexate e il biologico rituximab. Inoltre, i soggetti con artrite reumatoide, presentano bassi livelli di enzimi coinvolti nella glicosilazione di una particolare immunoglobulina Ig-G con alterazione della sua struttura, che quindi viene riconosciuta come estranea dal nostro sistema immunitario: si forma il cosiddetto fattore reumatoide (FR), un autoanticorpo che agisce contro il frammento FC delle Ig-G. (83)

Analizziamo ora chiaramente tutto l'aspetto patogenetico e infiammatorio dell'AR.

1) La prima fase è definita "triggering stage". ACPA si verifica in seguito ad una risposta immunitaria non corretta nei confronti di particolari proteine come la finina, la vimentina, la fibronectina, il collagene e gli istoni (delle sorte di ottameri che avvolgono il DNA cellulare), quindi tutte proteine distribuite abbondantemente in tutto il nostro corpo. Addirittura la produzione di questi ACPA potrebbe essere, secondo recenti studi, associata anche a fattori genetici o ambientali. È stato dimostrato che circa il 60-70% della popolazione caucasica affetta da AR abbia una

degenerazione all'interno di geni che codificano HLADR, in particolare HLA-DR1 e HLA-DR4, chiamati anche epitopi condivisi (SE) (84). Questi SE influenzano l'AR attraverso la produzione di anticorpi anticitrullinati e quindi rappresentano un forte fattore di rischio per tale patologia (85).

Un'altra proteina chiamata tirosina fosfatasi linfoide di tipo 22, ha influenzato tanto gli studi più recenti a causa dei polimorfismi connessi con ACPA. Sembrerebbe agire da inibitore di alcune cellule T, incentivando la produzione di ACPA (86) (87).

È inoltre stato riscontrato che la variazione genetica dell' $\alpha 1$ -antitripsina è correlata alla produzione di ACPA in AR (88)

Vi è inoltre una certa familiarità per AR. È stato dimostrato che il rischio di sviluppare AR è tre volte maggiore se uno dei due genitori ha AR (89). Un ulteriore studio su 12.590 gemelli rivela come l'ambiente, lo stile di vita e i fattori stocastici possono svolgere in alcuni casi un ruolo più importante della genetica, che è invece maggiormente implicata nella progressione della patologia. È stato infatti evidenziato come l'interazione geni ambiente possa influenzare la reattività degli ACPA (90). Per esempio il fumo di sigaretta è il principale fattore ambientale legato ad AR (91) (92) con un'influenza del 25% per l'AR nei soggetti predisposti, anche a 20 anni dalla sospensione del fumo (con un'associazione più forte per uomini che per donne) (91). Si pensa che il fumo sia la causa dell'aumento dei livelli di proteine citrullinate (93). Inoltre il fumo sembra che possa innescare recettori mucosali a pedaggio (TLR) attivando cellule presentanti l'antigene come le classiche cellule dendritiche o cellule B (94), che andrebbero a influenzare il reticolo endoplasmatico e causare malattie polmonari autoimmuni e artrite, fornendo una connessione tra le due patologie (95). Il fumo riduce la conta delle

cellule natural killer, compromette immunità umorale (96) oltre naturalmente a provocare e mantenere elevati livelli di marcatori infiammatori come IL-6 e proteina C reattiva (97), aumentando anche il livello del fattore reumatoide (altro anticorpo coinvolto).

Un altro possibile fattore ambientale implicato nell'eziopatogenesi dell'AR sembra essere il silice. L'esposizione alla polvere di silice che passa attraverso il tratto respiratorio (durante attività come perforazione di rocce, estrazione e sabbiatura) è stata collegata al rischio di AR in vari studi epidemiologici. Il silicio può causare infiammazione cronica e fibrosi polmonari, fattori che possono portare a risposta immunitarie umorali alterate e quindi a un rischio maggiore di AR (98) (99). Anche oli industriali e minerali possono essere considerati come potenziali fattori che inducono l'artrite reumatoide (100).

Abbondanti prove epidemiologiche coinvolgono anche gli ormoni nell'incidenza dell'AR. Le donne hanno infatti una probabilità 2-4 volte maggiore rispetto agli uomini di sviluppare AR (101) (102). In particolare l'AR sembra manifestarsi in periodi in cui i livelli degli estrogeni femminili siano in flusso, come nei periodi post partum e perimenopausali (103). In tanti (104) (105), ma non in tutti gli studi (106) (107), l'uso di contraccettivi orali è protettivo invece nei confronti di AR.

L'autoimmunità da AR è stata associata anche a vari microrganismi che possono colpire il tratto parodontale (di cui parleremo nel terzo capitolo) o il tratto intestinale.

Infine anche la dieta sembra poter influenzare la patologia. Gli acidi grassi omega-3 potrebbero ridurre il rischio di produzione di ACPA, oltre a prevenire anche l'insorgenza dell'artrite (108). Anche meccanismi di regolazione dell'espressione

genica attraverso microRNA e longRNA non condificante sono stati proposti per contribuire alla patogenesi dell'AR. .

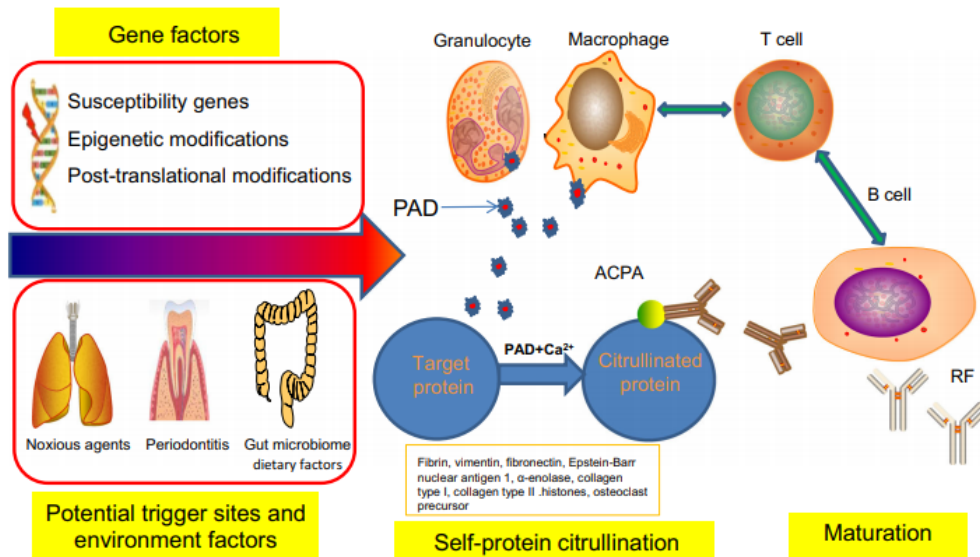


Figura 7: possibili siti di innesco dell'AR. Dall'interazione tra geni e fattori ambientali, caratterizzata dalla comparsa di citrullinazione auto-proteina, si ha la comparsa di autoanticorpi contro tali peptidi. Esposizioni polmonari, agenti infettivi, microbioma intestinale, fattori dietetici, fumo possono indurre tutto ciò con maturazione di ACPA.

2) La seconda tappa nella eziopatogenesi è la cosiddetta “maturation stage”. È stato dimostrato che la risposta immunitaria agli autoantigeni possa esistere anche anni prima della comparsa della malattia e risiedere al di fuori delle articolazioni. Infatti in tale fase, che risiede a livello degli organi linfoidi secondari o nel midollo osseo, la diffusione dell'epitopo condiviso e un titolo aumentato di ACPA possono durare diversi anni prima dell'insorgenza dei sintomi articolari (109). I neoantigeni della citrullinazione attivano di conseguenza le cellule T MHC dipendenti di classe II che a loro volta inducono le plasmacellule B a produrre più ACPA. Quest'ultimo provoca dolore, perdita ossea e infiammazione in AR (110).

Sembra inoltre che la citrullinazione svolga un ruolo fondamentale inducendo l'attivazione degli osteoclasti sotto stimolo dell'ACPA (questo potrebbe spiegare il perché del fatto che sono le articolazioni i principali organi bersaglio).

3) "Target stage" e fase di distruzione

Quindi l'interazione tra predisposizione e presenza di antigeni scatenanti dà il via al processo di infiammazione e distruzione. Cosa accade di preciso? L'immunità innata che ha precedentemente riconosciuto antigeni-self o antigeni scatenanti, attiva i linfociti CD4 con produzione di IL-4 che a sua volta alimenta la produzione di altri linfociti compresi quelli di classe B, ulteriori altri monociti-macrofagi e sinoviociti. In tal modo si automantiene l'infiammazione (111). Per ultimi i linfociti B sono i responsabili nella produzione del fattore reumatoide e degli anticorpi contro l'antigene scatenante con formazione di strutture che si chiamano immunocomplessi che si vanno a depositare a livello delle cartilagini articolari, del liquido sinoviale (sinovite acuta) e dei vasi extra-articolari, con danno sistemico (112).

Il gonfiore articolare percepito a livello dell'articolazione è la riflessione esterna dell'infiammazione in seguito all'attivazione immunitaria. La normale sinovia articolare viene inondata di leucociti e mediatori infiammatori che provocano effetti a cascata attraverso le interazioni tra i sinoviociti simil fibroblasti (FLS) e le cellule del sistema immunitario innato e acquisito come linfociti T e cellule B. I due sistemi immunitari a contatto sono intimamente uniti nello sviluppo di AR ACPA positiva con lo sviluppo di una sinovite cronica. Questo ACPA può indurre maggiori produzioni di TNF- α in monociti / macrofagi (113) provocando uno squilibrio tra macrofagi proinfiammatori e antiinfiammatori.

4) Fase di danneggiamento: a causa di questi processi infiammatori le cellule sinoviali (che normalmente secernono acido ialuronico e lubrificante per garantire la funzione articolare) perdono l'inibizione da contatto, proliferano in maniera anormale portando all'iperplasia della sinovia. Le citochine prodotte dai linfociti T e dai macrofagi-monociti-sinoviociti (IL-1, IL6, IL-8, INF- γ , TNF α , CSF-1) causano la proliferazione e la successiva distruzione articolare. Si crea un microambiente che permette la sopravvivenza delle cellule T e B, accumulando ulteriori neutrofili (114).

Successivamente l'infiammazione diventa cronica quando viene prodotto il panno sinoviale, cioè un tessuto di granulazione destruento che va ad intaccare la cartilagine (sotto l'influenza di abbondanti quantità di citochine pro infiammatorie (soprattutto IL-1); essa viene privata sempre di più di condrociti che subiscono apoptosi (115)). Viene colpito anche l'osso subcondrale (le prove a favore della teoria infiammatoria ossea tradizionale affermano che TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17 e altre citochine potrebbero sopprimere la formazione ossea attraverso vari segnali, come l'attivazione del recettore nucleare kappa-B ligando e il fattore di stimolazione dei macrofagi (116). Questi promuoverebbero la differenziazione in osteoclasti e la propagazione della distruzione e infiammazione); i tendini.

Anche nell'artrite reumatoide, come avveniva nella malattia parodontale, si verifica una perdita di equilibrio tra varie citochine, tra cui le più importanti e studiate sono IL-1 e TNF α .

Quindi per riassumere: inizialmente si ha la presentazione dell'antigene (l'ipotetico fattore scatenante) da parte di macrofagi e cellule dendritiche (tutte cellule che si attivano nel corso delle risposte immunitarie) presenti nella membrana sinoviale ai linfociti; quindi i linfociti T e B proliferano all'interno della sinovia con produzione

di autoanticorpi (Fattore Reumatoide, anti-CCP), richiamo di leucociti (globuli bianchi) dai vasi sanguigni alle sedi di infiammazione, e produzione di citochine. La progressiva ipertrofia della sinovia e formazione del cosiddetto “panno”, comporta conseguentemente il danno delle strutture contigue, con invasione della cartilagine, osso subcondrale e tendini.

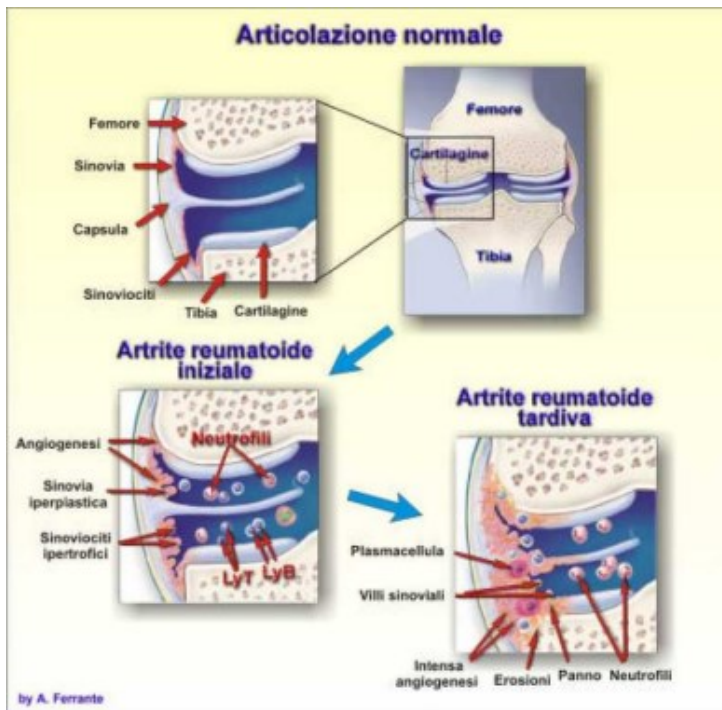


Figura 8:patogenesi dell'artrite reumatoide

3) MALATTIA PARODONTALE E ARTRITE REUMATOIDE: REALE CONNESSIONE?

Negli ultimi 100 anni è stata considerata una possibile associazione tra l'artrite reumatoide (AR) e la malattia orale (parodontite). La prima associazione risale al 19° secolo quando il Dr. Rush ha ipotizzato che l'eradicazione di tutti i denti potesse essere una soluzione al cosiddetto "reuma". Questa pratica rimase negli anni fino a quando il Dr. Cecil e colleghi, alla fine degli anni '30, non stabilirono che l'eradicazione dei denti non fosse una soluzione all'AR (teoria che verrà confermata successivamente anche dall'American Medical Association nel 1952) (117). Nonostante alcune differenze nei processi eziologici, l'evidenza che emerge da tanti studi epidemiologici e clinici recenti e remoti (compresi gli studi dello stesso Arnitage) stabilisce una relazione tra AR e malattia parodontale (118).

I primi studi effettuati sulla possibile correlazione tra le due patologie hanno stabilito che la strumentazione parodontale non chirurgica può portare a una diminuzione dei livelli di PCR entro 30 giorni dal trattamento (119). Questa iniziale osservazione è fondamentale per chiarire come la parodontite non sia una malattia localizzata solo al cavo orale, ma come vedremo coinvolge l'intero organismo.

Il presente lavoro inizia analizzando la possibile correlazione tra queste due importanti patologie basandosi sulle più recenti review degli ultimi anni, estrapolate da Pubmed. Due importanti review (120) (121) sono concordi nell'affermare che esistono reali correlazioni tra le due patologie, in particolare la loro attenzione si è concentrata su un pericoloso patogeno orale, il *P. gingivalis*. Tutte queste ipotesi si basano sul fatto che vari studi hanno rilevato la presenza di questo batterio

anaerobio Gram negativo e altri titoli anticorpali contro questo batterio nel siero e nel liquido sinoviale dei pazienti con AR in fase iniziale e durante la manifestazione della patologia (122) (123) (124) (121) (125). Questi batteri orali altamente patogeni infatti, come già inizialmente affermato in occasione del World Workshop in Periodontics nel 1999, hanno la capacità di penetrare attraverso la barriera gengivale e immettersi nel circolo ematico danneggiando organi distanti (endocardio) (126). In particolar modo *P. gingivalis* ha la capacità di degradare l'epitelio, invadere le sue cellule influenzando la trascrizione e la traduzione proteica. (127). Recentemente, per esempio, è stato dimostrato che questo patogeno è in grado di invadere i condrociti umani a livello del ginocchio provocando particolari effetti cellulari (per esempio aumentando l'apoptosi di queste cellule a causa delle sue leucotossine e lipopolisaccaridi) (128).

Il *P. gingivalis* è in grado di produrre inoltre due proteasi responsabili della sua particolare virulenza: la prima chiamata R relativa alla arginina, la seconda chiamata K riferita alla lisina, che hanno la capacità di assorbire amminoacidi dalle proteine ospiti (129) (130). Queste proteasi (chiamate gingipaine) permettono l'attivazione di altre proteinasi come MMP-1, MMP-3 e si genera una degradazione di proteine della matrice extracellulare come laminina, fibronectina e collagene. Tali gingipaine sono responsabili anche di una maggiore permeabilità vascolare e della degradazione di alcuni fattori del complemento (immunità innata) (131).

Sappiamo come l'AR sia innescata da una risposta autoimmune contro proteine citrullinate. Tali proteine sono generate in condizioni fisiologiche ma la perdita di tolleranza nella suscettibilità individuale genetica permette la formazione di

autoanticorpi contro tali proteine (ACPA) nella sinovia e al conseguente sviluppo di AR (132).

La citrullinazione proteica (processo nel capitolo 2) è assolutamente essenziale per la differenziazione dell'epidermide, sviluppo del cervello e regolazione dell'espressione genica rimodellando e compattando eucromatica e eterocromatina (133). Però questo processo si ha in abbondanza anche in presenza di apoptosi cellulare o necrosi. In tali casi si verifica una ipercitrullinazione degli istoni formando delle sorte di "trappole" per i neutrofili dell'immunità innata.

Tutto questo è collegato a sclerosi multipla, psoriasi, Alzheimer, e AR. Quindi la citrullinazione porta ad alterazioni nella struttura tridimensionale delle proteine modificate, determinando la formazione di epitopi e violando la tolleranza immunologica delle stesse proteine citrullinate. In soggetti sensibili questo può facilmente portare alla AR (134) tramite la formazione di anticorpi anti ACPA.

La citrullinazione viene effettuata da un enzima che si chiama peptidil-arginina deiminasi (PAD), la cui attività dipende da alte concentrazioni di calcio. Sono stati identificati 5 differenti PAD nell'uomo raggruppati nell'epidermide e nei follicoli piliferi, nel muscolo, nel cervello e nelle cellule ematopoietiche (135).

Cosa c'entra la fisiologia con i patogeni orali? *P.gingivalis* è l'unico patogeno parodontale del gruppo rosso di Socransky in grado di esprimere un PAD (chiamata PPAD) molto simile a quelle umane (che non richiede calcio per funzionare) (136). Addirittura recenti scoperte indicano che l'infezione da *P.gingivalis* orale precede la manifestazione di AR e che il batterio è fondamentale per il mantenimento dei processi infiammatori autoimmuni (137). Il PPAD localizzato sulla capsula batterica di *P.gingivalis* è in grado di citrullinare le proteine ospiti che interagiscono

con il patogeno tramite adesine batteriche (138). Questa ipotesi è stata supportata dall'identificazione di IgG che riconoscono direttamente il PPAD citrullinato nei sieri di pazienti con AR. Non a caso un ceppo di *P. gingivalis* che esprime PPAD catalicamente inattivo e privo di autocitrullinazione non ha indotto risposte anticorpali, confermando una risposta immunitaria specifica al PPAD citrullinato (139)

Anche Hitchon e colleghi hanno riportato una connessione tra le risposte immunitarie al patogeno *P. gingivalis* e la presenza di ACPA in una popolazione con suscettibilità all'AR (avendo un'alta prevalenza di fondo di alleli HLA-DRB1 che predispongono per tale patologia autoimmune).

Questa relazione ambiente.gene può facilmente facilitare la rottura dell'autotolleranza agli antigeni citrullinati amplificando tutte le risposte immunitarie e permettendo lo sviluppo di AR (140).

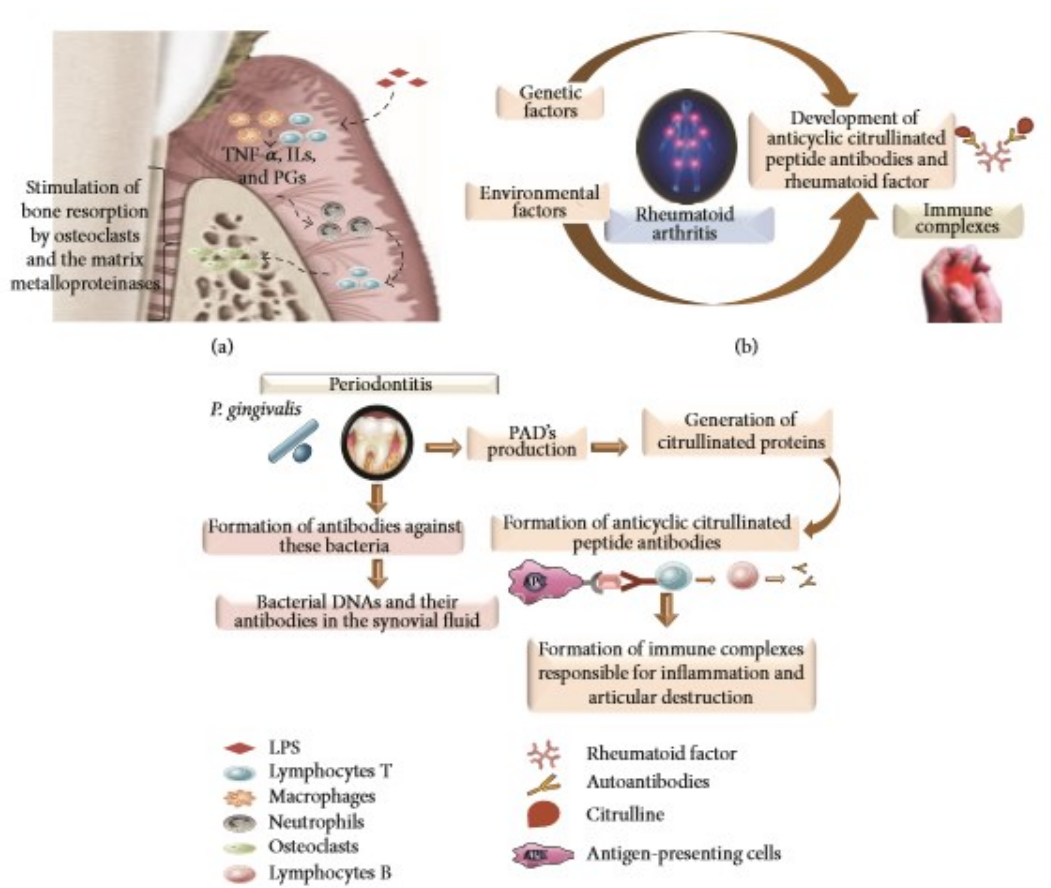


Figura 9: patogenesi della parodontite ed effetti dei lipopolisaccaridi dei patogeni sull'eziopatogenesi della artrite reumatoide e di altre patologie.

Oltre al ruolo del *P.gingivalis*, un'altra review analizzata (141) afferma quanto simili citochine (a volte anche le stesse) influenzino sia la malattia parodontale che i processi patologici dell'AR. Abbiamo visto come la sinovite che contraddistingue l'AR sia caratterizzata da infiltrazione di mastociti, cellule B, leucociti, proliferazione dei sinoviociti simil fibroblasti. Questo liquido sinoviale è altamente ricco di citochine caratteristiche come IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 e IL17 (142) e il ligando NF-kappaB. Il TNF α è la citochina più studiata per comprendere la relazione tra AR e parodontite. Spesso il trattamento dell'AR prevede l'utilizzo di farmaci anti-TNF α e non a caso questo può essere importante anche per la gestione della parodontite. Questa citochina è rilasciata in risposta al

lipopolisaccaride del *P.gingivalis* e di altri patogeni del gruppo rosso. Un aumento locale di $TNF\alpha$ provoca calore, arrossamento e dolore. Elevati livelli di $TNF\alpha$ determinano una sovrapproduzione di PCR e promuovono l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali consentendo diapedesi neutrofila e attivazione di IL-1. IL-1 a sua volta stimola i sinoviociti a produrre MMP con attivazione della collagenasi e distruzione della cartilagine (oltre a determinare la morte di condrociti). Questi stessi processi li ritroviamo anche nella parodontite, con meccanismi molto simili. Il $TNF\alpha$, quando è elevato a causa di infezioni parodontali, determina una sovrapproduzione di prostaglandine causando stimolazione degli osteoclasti. Questo provoca assorbimento osseo pro-infiammatorio mentre il $TNF\alpha$ sovraregola la produzione di prostaglandine E2 e matrice-metalloproteinasi (MMP), causando la stimolazione degli osteoclasti (143). Tutto ciò ci fa capire quanto anche gli stessi meccanismi di distruzione ossea siano simili in entrambe le patologie.

Un'altra recente review (124) su Pubmed del 2016 ha analizzato circa 367 articoli tra il 2012 e il 2016, considerando come predittivi dell'associazione tra le due patologie circa 26 articoli che rientravano nei corretti standard di indagine. Nella maggior parte degli studi vengono analizzate donne. L'età analizzata era all'incirca sui 40 anni, ad eccezione di uno studio di Dev et al. (144) e di Ranade and Doiphode (145) nei quali i pazienti avevano 20-30 anni rispettivamente. Più della metà degli articoli analizzati (tra i più recenti ricordiamo il (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152)), ha analizzato pazienti fumatori, il 30 % (153) invece pazienti non fumatori. L'11% non ha menzionato lo stato di fumo dei pazienti (154). Alcune patologie come sindrome di Sjogren, ipertensione, malattie cardiovascolari, iperlipidemia, malattie renali e osteoporosi sono state analizzate nello studio di

Mikulus (147), Khantisoponetal. (2014) (155) e Ghalesalesetal (2015) (156). Per la maggior parte degli studi il trattamento più frequente per artrite reumatoide comprendeva farmaci antireumatici modificanti la malattia (sulfasalazina e leflunomide) terapia biologica (anti-TNF- α), corticosteroidi (prednisolone) e antinfiammatori.

I risultati hanno confermato le conclusioni delle precedenti revisioni di cui abbiamo parlato in precedenza. Tra tutti gli studi selezionati, alcuni studi hanno esaminato la relazione epidemiologica e clinica dei pazienti con artrite reumatoide e malattia parodontale (tra i più recenti (149) (157) (158) (159)), dimostrando come ci fosse una maggiore incidenza di parodontite nei pazienti con artrite reumatoide. Come nelle precedenti revisioni, l'effetto della rimozione meccanica dei biofilm e tartaro a livello orale ha migliorato i valori dei vari parametri infiammatori dell'AR (149) (151), in quanto riducevano i livelli di citochine proinfiammatorie circolanti.

Alcuni studi hanno evidenziato la presenza di proteine citrullinate con i loro anticorpi, anticorpi contro *P. gingivalis* nei pazienti con AR, evidenziando un'associazione tra patogeno orale e titoli del fattore reumatoide e anticorpi peptide citrullinato (148).

Per quanto riguarda i biomarkers infiammatori, circa 21 su 24 hanno mostrato una correlazione significativa tra i due processi patologici (in sintonia con le precedenti review). La review inoltre ha ribadito come il fumo venga considerato come un fattore importante nello sviluppo di artrite reumatoide (dato che interagisce con gli HLA e aumenta il rischio di anticorpi anti CC nei pazienti con AR (160); i pazienti fumatori con AR avevano naturalmente una maggiore profondità di sondaggio rispetto a tutti gli altri.

La letteratura della review mostra che la malattia parodontale in genere non richiede un trattamento farmacologico, ad eccezione del trattamento parodontale non chirurgico. In tale recensione circa la metà degli studi prevedeva un approccio farmacologico alla AR. L'uso di farmaci antireumatici (DMARD) come metotrexate, gli inibitori del fattore di necrosi tumorale (etanercept), inibitori di particolari interleuchine come la 1 o la 6, FANS, hanno ridotto i sintomi articolari, dolore e manifestazioni sistemiche (161).

L'uso prolungato di corticosteroidi tuttavia ha favorito la comparsa di patologie orali, come candidosi, ulcerazioni orali e compromissioni alla saliva (162). Tutto questo complica le eventuali patologie parodontali orali, con aumentata perdita di attacco clinico e profondità della tasca parodontale (163). Sicuramente l'uso di questi farmaci potrebbe compromettere la valutazione parodontale dei pazienti. Analizzando gli articoli quindi, la maggior parte di questi trova una relazione vera tra parodontite e AR (dato che questi pazienti presentavano parametri parodontali peggiori, come il livello di attacco clinico, perdita di osso alveolare, elevata profondità di tasca, indice di placca e di sanguinamento elevati).

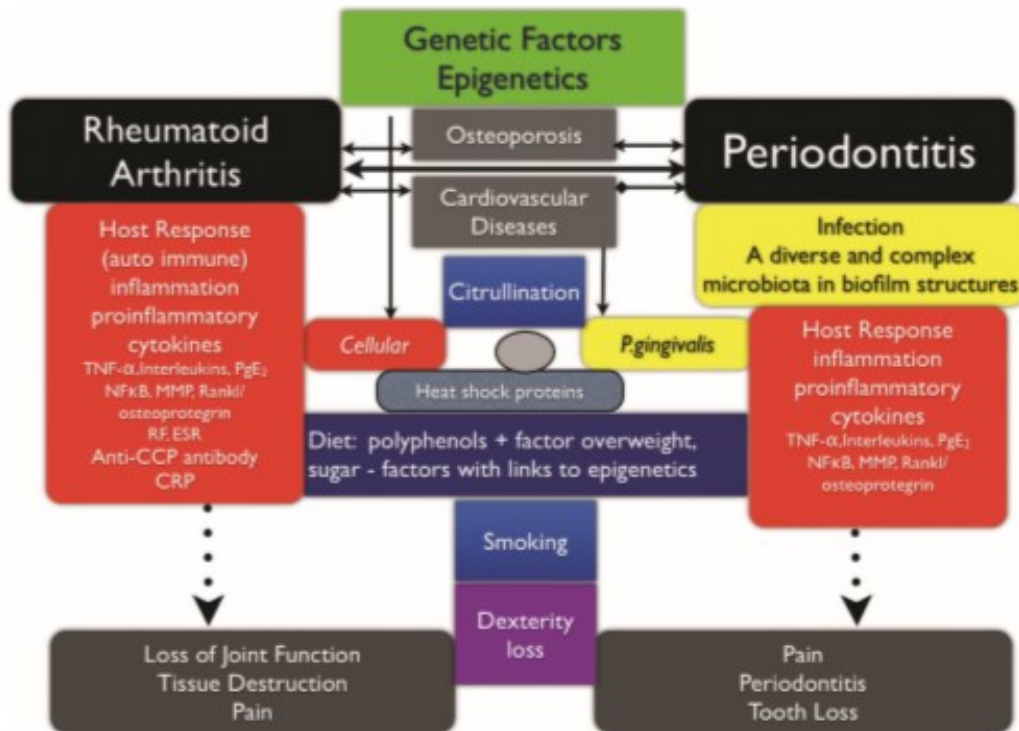


Figura 10: riassunto della precedente review sulle correlazioni.

In effetti, la review ha dimostrato che il trattamento parodontale meccanico come ridimensionamento e controllo dell'infezione parodontale ha migliorato tantissimi parametri non solo orali ma anche dell'AR. Per esempio si è evidenziato una diminuzione del DAS28 e dei livelli sierici di IL-1 β , TNF α , proteina C-reattiva ed eritrosedimentazione.

Solo un articolo non trova queste correlazioni (159). Tutti gli studi tuttavia hanno difeso l'ipotesi che le infezioni parodontali orali possano svolgere un ruolo fondamentale nella patogenesi di AR, promuovendo citrullinazione proteina. Come nelle review precedenti il P. gingivalis ha un ruolo centrale in tutto questo, ma anche il F. nucleatum. Un solo studio (164) non ha rilevato questo, dimostrando come l'anticorpo anticitrullina sia diverso tra artrite reumatoide e parodontite.

Inoltre la revisione ha ribadito come i processi di distruzione ossea tra i due processi siano molto analoghi.

Nella ricerca bibliografica sulle possibili correlazioni tra queste due tremende patologie, si evidenzia un recentissimo articolo dell'anno scorso, il quale conferma una forte correlazione tra AR e malattia parodontale ma considera meccanismi e patogeni differenti. In tale studio (165) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), che era stato a lungo secondo la penultima classificazione delle malattie parodontali associato a parodontite aggressiva (166), è stato anche rilevato nel fluido crevicolare gengivale dei soggetti con AR (167). Inoltre negli ultimi anni si è scoperto che la leucotossina, rilasciata da questo patogeno, è altrettanto in grado di determinare l'attivazione del PAD endogeno dei neutrofili (167), risultando un altro possibile patogeno per la citrullinazione proteica gengivale che potrebbe influenzare autoimmunità in AR. Lo scopo di questo studio era capire se proteine citrullinate indotte PAD di questo *A. actinomycetemcomitans* fossero riscontrabili in soggetti con artrite reumatoide. Sono state effettuate biopsie gengivali su 30 pazienti con malattia parodontale con età media di 50 anni, e 30 su pazienti non parodontali (con età media di 44 anni), oltre 15 pazienti controllo con AR. Criteri di inclusione sono stati segni di parodontite secondo le ultime linee guida, quindi presenza di un CAL interdentale maggior o uguale a 2mm in denti non adiacenti oppure un CAL vestibolare o buccale maggiore o uguale a 3 mm con la presenza di almeno 2 denti di un sondaggio maggiore a 3 mm (naturalmente questi CAL non dovevano essere di cause non parodontali); è stato valutato anche il riassorbimento osseo radiografico e profondità di tasca superiore a 5mm. I soggetti con farmaci anti-infiammatori o con malattie sistemiche sono stati esclusi dallo studio. Il grado di infiammazione delle biopsie gengivali, trattate tramite

coloranti e sostanze varie, è stata valutata tramite il CPI. Anche il grado di cellule colorate positivamente per specifici anticorpi è stato valutato sempre tramite una scala a 3 valori: 0 = nessuna cella positiva, 1 = presenza minima, 2 = quantità moderate e 3 = alto grado di cellule colorate (168) (169). È stata anche valutata la conta totale di RNA dei patogeni dalle biopsie gengivali nei soggetti con parodontite e senza

Quali sono stati i risultati? Naturalmente nei soggetti con parodontite si sono evidenziati alti livelli di infiammazione gengivale, mentre dalle biopsie dei sani si sono rilevati bassi livelli di infiammazione (risultato analogo anche per la conta dei linfociti, molto più alta nei soggetti con parodontite). È stata poi valutata la presenza di proteine citrullinate (che come sappiamo possono fungere da fattori scatenanti della produzione di anticorpi). Tali proteine sono state evidenziate principalmente in associazione con cellule infiammatorie ma anche con fibroblasti a livello della matrice extracellulare del tessuto connettivale (in maggiore quantità nei soggetti con parodontite, su più dei $\frac{3}{4}$ dei soggetti analizzati e solo in alcuni del gruppo sano, 7%). A livello epiteliale invece, dove la citrullinazione avviene come processo fisiologico, non vi erano grosse differenze nella presenza di citrullinazione tra parodontite e non. Naturalmente vi erano alcuni pazienti sani che esprimevano proteine citrullinate, tuttavia le espressioni di entrambe le PAD analizzate erano significativamente più alte nei soggetti con parodontite rispetto ai controlli sani. Una sezione di tessuto sinoviale di pazienti con AR è stata utilizzata come controllo positivo.

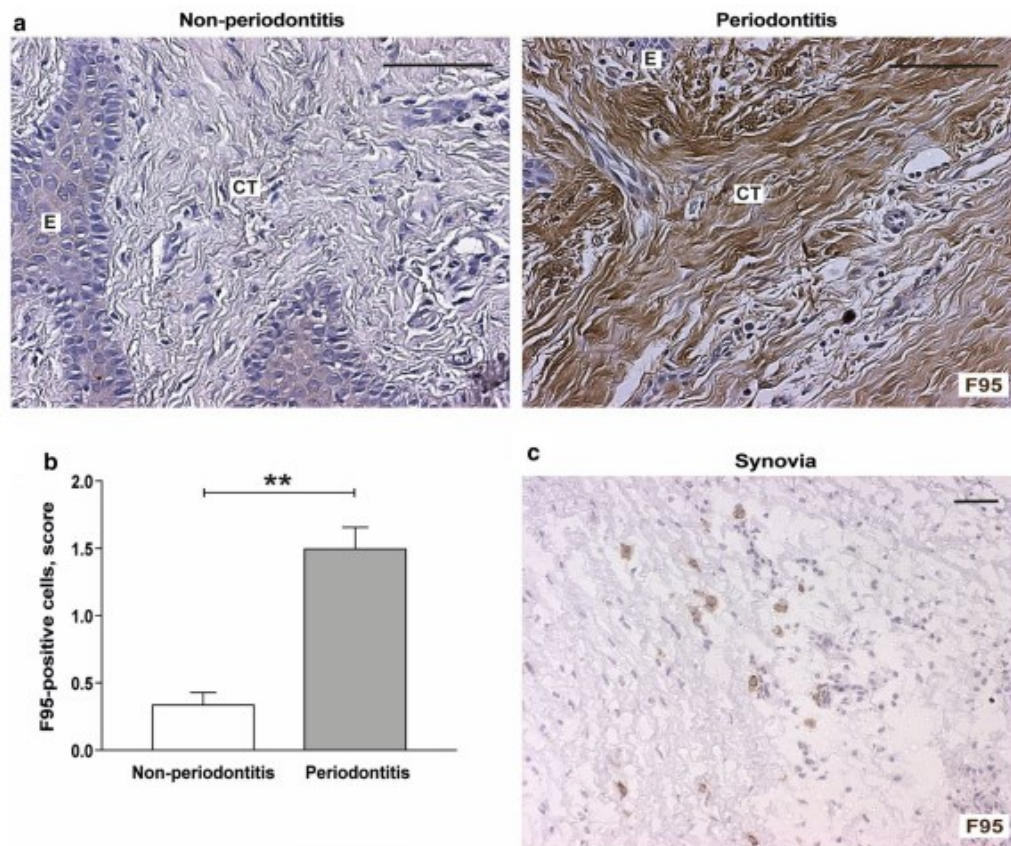


Figura 11: rappresentazione immunoistochimica di proteine citrullinate in pazienti con parodontite e senza, compresa la sinovia. Figura 11b: grafico con le diverse concentrazioni di proteine citrullinate tra gruppo controllo e malato.

La rivoluzione dello studio è stata quella di indagare la presenza di leucotossina A nelle biopsie del tessuto gengivale. Questa struttura di virulenza è stata valutata utilizzando anticorpi contro A. actinomycetemcomitans LtxA e M. haemolytica LktA, poiché le due linfotossine condividono omologia nella successione della loro struttura primaria proteica (170). Tuttavia, l'anticorpo emolitico LktA è stato osservato in percentuali molto simili sia nei tessuti gengivali che epiteliali dei soggetti con parodontite o senza. Risultati simili sono stati osservati quando si utilizzava un secondo anticorpo policlonale, prodotto contro A. actinomycetemcomitans LtxA, Perciò questo studio,

a differenza di quanto riportato nelle review precedenti, non correla la citrullinazione proteica, possibile causa di innesco dell'AR, con la presenza dell'antigene patogeno parodontale *A. actinomycetemcomitans*. Una possibile spiegazione a tutto ciò è che la malattia parodontale non dipende solo dalla quantità dei patogeni (qui misurata), ma anche da altri fattori come fumo e predisposizione genetica. (171). Anche perché come era emerso da altri studi, alcuni batteri Gram negativi possono essere presenti anche in soggetti senza malattia parodontale (per esempio *P. gingivalis*, anche se in numero esiguo, può aumentare la virulenza dell'intera comunità, promuovendo e incentivando la disbiosi e il passaggio alla patogenicità). Inoltre all'interno della stessa categoria di batteri, questi possono differire per il PAD espresso, compresa la loro attività (172)

Lo studio inoltre, sempre a differenza delle precedenti review e articoli, ha stabilito come i livelli di ACPA nei soggetti con AR, siano più alti rispetto ai pazienti sistematicamente sani ma con parodontite. Quindi ci potrebbe essere uno specifico denominatore comune associato a citrullinazione e immunità anti-citrullina, ma sono necessari ulteriori studi per poterlo stabilire con certezza. Naturalmente maggiore validità scientifica va attribuita alle precedenti review, tuttavia abbiamo preferito considerare anche i risultati di autori e di studi differenti, che hanno ottenuto risultati leggermente differenti.

4)CONCLUSIONI

La tesi mira alla descrizione fisiopatologica dell'artrite reumatoide e della malattia parodontale nel tentativo di comprendere se effettivamente esista una correlazione tra queste due patologie.

Tutte le review analizzate, sebbene qualche studio abbia concluso il contrario, affermano quanto sia forte questo doppio rapporto tra le due patologie e quanto la malattia parodontale possa fornire un ulteriore elemento causale o fattore di rischio che incentiva l'infiammazione e la distruzione ossea sistemica, sovrapponendosi a quella della malattia autoimmune. Questo risultato è coerente con tutti i principi patogenetici di entrambe le patologie, caratterizzate da fattori fisiologici e biochimici molto analoghi. Negli ultimi cinque anni, grande interesse è stato indirizzato verso la comprensione della citrullinazione nella malattia parodontale, in grado di scatenare l'autoimmunità e incentivare la progressione dell'artrite reumatoide.

La maggiore attenzione si è tradotta in un apprezzamento più profondo delle manifestazioni orali sull'artrite reumatoide, soprattutto incentrate su un batterio Gram negativo che è il *P. gingivalis*, specie batterica per la quale la medicina è praticamente certa del suo coinvolgimento nella patologia autoimmune.

È possibile concludere quanto la valutazione dentale, l'attenzione all'igiene orale domiciliare e professionale (tramite sedute più ravvicinate per pazienti affetti da AR, magari ogni 3 mesi) e controlli da professionisti del settore (igienisti dentali in primis) siano sempre più importanti nella gestione clinica del paziente con artrite reumatoide. Sicuramente tale maggiore attenzione alla salute orale in tutti questi

pazienti migliorerà la qualità della loro vita e dell'artrite reumatoide in atto, riducendo i livelli di infiammazione sistemica.

Perciò la collaborazione tra igienista dentale, immunologo, patologo orale, microbiologo, parodontologo e reumatologo è assolutamente FONDAMENTALE per comprendere appieno le relazioni tra artrite reumatoide e malattia parodontale e per ampliare le nostre vedute verso una visione olistica del paziente, che non si fossilizzi solo alla mera osservazione del cavo orale.

RINGRAZIAMENTI

In conclusione di questo mio percorso accademico sento il dovere di ringraziare il mio relatore, la professoressa Scilla Sparabombe, per l'aiuto e l'assistenza che professionalmente e umanamente mi ha prestato in questi tre anni di corso.

Profondi ringraziamenti vanno anche alla mia famiglia che mi ha supportato psicologicamente ed economicamente durante tutto il mio percorso formativo, credendo sempre in me.

BIBLIOGRAFIA

1. *Periodontitis in systemic rheumatic diseases.* de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. 2009, Nat Rev Rheumatol , Vol. 5, p. 218-224.
2. *Oral health: The silent epidemic.* RM, Benjamin. 2010, Public Health Rep , Vol. 125, p. 158-159.
3. *Periodontal abscess.* HX., Meng. 2000, Ann Periodontol, Vol. 4, p. 79.
4. *Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012.* Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., et al. 2015, J. Periodontol., Vol. 81, p. 611-622.
5. *Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review.* Needleman I, Garcia R, Gkranias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio AD, Moreno F, Petrie A. 2018, Vol. 20, p. 112-124.
6. Organization, World Health. http://www.who.int/oral_health/databases/niigata/en. [Online] 2005.
7. *Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012.* Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. 2018, J Clin Periodontol., Vol. 20, p. 130-148.
8. *Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons.* Albandar JM, Tinoco EMB. 2002, J. Periodontology, Vol. 29, p. 153-176.
9. *Social factors and periodontitis in an older population.* Borrell LN, Burt BA, Neighbors HW, Taylor GW. 2004, Am J Public Health, Vol. 94, p. 748-754.

10. *Socioeconomic disparities in adult oral health in the United States*. Drury TF, Garcia I, Adesanya M. NY : s.n., 2000, Ann NY Acad Sci, Vol. 896, p. 322-324.
11. *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. 2001, J microbiology, Vol. 183, p. 3770-80.
12. *Periodontal microbial ecology*. Socransky S, Haffajee AD. 2005, Periodontol, Vol. 38, p. 135-187.
13. *Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue*. Tribble GD, Lamont RJ. 2010, Periodontol , Vol. 52, p. 68-83.
14. *Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors*. report, Consensus. 1996, Ann. Periodontology, Vol. 1, p. 926-932.
15. *T cell responses to 53-kDa outer membrane proteina of Porphyromonas gingivalis in humans with early-onset periodontitis*. Ohyama H, Matsushita S, Kato N, Nishimura F, Oyaizu K, Kokeyuchi S, et al. 1998, Y. Hum Immunol. , Vol. 59, p. 635-643.
16. *Isolation and characterization of the cell-surface polysaccharides of Porphyromonas gingivalis*. Farquharson SI, Germaine GR, Gray GR. 2000, Vol. 15, p. 151-157.
17. *Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to periodontitis*. Jain S, Darveau RP. 2010, Periodontol 2000, Vol. 54, p. 53-70.
18. *How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: a model for infectious diseases*. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. 2006, Periodontol 2000, Vol. 42, p. 114-57.

19. *Cloning and expression of the leukotoxin gene from Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. 1989, Infect Immun. , Vol. 57, p. 1465-9.
20. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: from threat to therapy.* SC., Kachlany. 2010, J Dent Res. , Vol. 89, p. 561-70.
21. *A 5-year longitudinal study of Tannerella forsythia prtH Genotype: association with loss of attachment.* Hamlet SM, Ganashan N, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. 2008, J Periodontol. , Vol. 79.
22. *Virulence mechanisms of Tannerella forsythia.* Periodontol 2000. A., Sharma. 2010, Vol. 54, p. 106-10.
23. *Host responses in periodontal diseases: current concepts,.* Genco., R. J. 1992, JournalofPeriodontology, Vol. 63, p. 338-55.
24. *“Howhasresearchintocytokine interactions and their role in driving immune responses impactedourunderstandingofperiodontitis? P.M.PreshawandJ.J.Taylor.* 2011, JournalofClinicalPeriodontology, Vol. 38, p. 60-84.
25. *“Mechanisms andcontrolofpathologicbonelossinperiodontitis,.* P. M. Bartold, M. D. Cantley, and D. R. Haynes,. 2010, ”Periodontology2000, Vol. 53, p. 55-69.
26. *Bacterial adhesins to host components in periodontitis. .* A, Amano. 2010, Periodontology 2000, Vol. 52, p. 12-37.
27. *Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss.* Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. 2013, Clin. Dev. Immunol. .
28. *Causation and pathogenesis of periodontal disease.* Kinane, DF. 2001, Periodontology 2000, Vol. 25, p. 8-25.

29. *Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology.* Hajishengallis G, Lamont RJ. 2012, Mol Microbiol. , Vol. 27, p. 409-19.
30. *Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis.* R.P. Darveau. 2010, Nature Reviews Microbiology, Vol. 8, p. 481- 490.
31. *Cytokine regulation of immune responses to Porphyromonas gingivalis.* Taylor, J. J. 2010, Periodontology 2000, Vol. 10, p. 160-194.
32. *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001, Nat Immunol. , Vol. 2, p. 675-80.
33. *Toll-like receptors are key participants in innate immune responses.* Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, et al. 2007, Biol Res. , Vol. 40, p. 97-112.
34. *Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria.* Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. 2007, Oral Microbiol Immunol. , Vol. 22, p. 145-51.
35. *Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis.* Watanabe K, Iizuka T, Adeleke A, Pham L, Shlimon AE, Yasin M, et al. 2011, J. Periodontology, Vol. 56, p. 21-30.
36. *Immunohistochemical localization of Toll-like receptors.* Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. 2008, Oral Microbiol Immunol. , Vol. 23, p. 425-31.
37. *Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis.* Rojo-Botello NR, García-Hernández AL, Moreno-Fierros L. 2012, J. Periodontology, Vol. 47, p. 62-73.

38. *The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease.* . Dennison DK, Van Dyke TE. 1997, *Periodontol 2000.*, Vol. 14, p. 54-78.
39. *Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure.* Dixon DR, Darveau RP. 2005, *J Dent Res.* , Vol. 84, p. 584-93.
40. *Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis.* Cutler CW, Jotwani R. 2004, *Periodontol 2000.* , Vol. 35, p. 135-57.
41. *Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions.* Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. 2009, *Mol Immunol.* , Vol. 47, p. 101-13.
42. *Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions.* . Graves DT, Oates T, Garlet GP. 2011, *J Oral Microbiol.* , Vol. 17, p. 3.
43. *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming.* Dong, C. 2008, *Nat Rev Immunol.* , Vol. 8, p. 337-48.
44. *Regulatory ripples.* Belkaid Y, Chen W. 2010, *Nat Immunol.* , Vol. 11, p. 1077-8.
45. *Regulatory T cells in the control of hostmicroorganism interactions.* Belkaid Y, Tarbell K. 2009, *Annu Rev Immunol.* , Vol. 27, p. 551-99.
46. *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues.* Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008, *Cytometry*, Vol. 73, p. 975-83.

47. *Interferongamma: an overview of signals, mechanisms and functions.* . Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004, J Leukoc Biol., Vol. 75, p. 163-89.
48. *Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease.* Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. 2003, J Periodontal Res. , Vol. 38, p. 210-38.
49. *Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva.* Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. 2003, J Periodontol. , Vol. 74, p. 178-85.
50. *Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis.* . Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. 2003, J Periodontal Res., Vol. 38, p. 380-7.
51. *Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis.* Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y. 2003, Oral Microbiol Immunol., Vol. 18, p. 54-8.
52. *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights.* Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, et al. 2003, J Clin Immunol. , Vol. 23, p. 147-61.
53. *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues.* Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008, Cytometry A. , Vol. 73.
54. *Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology.* Hajishengallis G, Lamont RJ. 2012, Mol Microbiol. , Vol. 27.

55. *Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, et al. 2009, J Periodontal Res. , Vol. 44, p. 368-77.
56. *Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis.* Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. 2005, J Clin Periodontol. , Vol. 32, p. 383-9.
57. *Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis.* . Rojo-Botello NR, García-Hernández AL, Moreno-Fierros L. 2012, J Periodontal Res. , Vol. 47, p. 62-73.
58. *Inflammatory bone destruction and osteoimmunology.* . H., Takayanagi. 2005, J Periodontal Res., Vol. 40, p. 287-95.
59. *Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions : consensus of the 7th European Workshop on Periodontology.* D. F. Kinane, P. M. Preshaw, and B. G. Loos. 2011, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 38, p. 44-48.
60. *The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders.*,. H. E. Barksby, S. R. Lea, P. M. Preshaw, and J. J. Taylor. 2007, Clinical and Experimental Immunology, Vol. 149, p. 117-25.
61. *The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease.* Myrillas, C. R. Irwin and T. T. 1998, Oral Diseases, Vol. 4.

62. *How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?* P.M.Preshaw, J.J.Taylor. 2011, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 38, p. 60-84.
63. *Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis.* P. M. Bartold, M. D. Cantley, and D. R. Haynes. 2010, Periodontology 2000, Vol. 53, p. 55-69.
64. *Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama.* Rothschild BM, Turner KR, DeLuca MA. 1988, Science, Vol. 241, p. 1498-1501.
65. *The first description of rheumatoid arthritis.* AJ, Landre-Beauvais. 2001, Joint Bone Spine, Vol. 68, p. 130-143.
66. *Malattie Reumatiche.* Todesco S, Gambari PF. 2002, Mc Graw-Hill .
67. *Prevalence of rheumatoid in Italy.* Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S. 1998, Ann Rheum Dis , Vol. 58, p. 315-318.
68. *What is the natural history of rheumatoid arthritis?* . Pincus T, Callahan LF. 1993, Rheum Dis Clin , Vol. 19, p. 123-51.
69. *A multicenter cost-of-illness study on rheumatoid arthritis in Italy.* Leardini G, Salaffi F, Montanelli R, Gerzeli S, Canesi B. 2002, Clin Exp Rheumatol. , Vol. 20, p. 505-15.
70. *Do rheumatoid arthritis patients have equal access to treatment with new medicines?: tumour necrosis factor-alpha inhibitors use in four European countries.* Hoebert JM, Mantel-Teeuwisse AK, van Dijk L, Bijlsma JW, Leufkens HG. 2012, Health Policy., Vol. 104, p. 76-83.

71. *ABC of rheumatology. Rheumatoid arthritis--I: Clinical features and diagnosis.* Akil M, Amos RS. 995, BMJ., Vol. 313, p. 587-590.
72. PE, Quirico. *Agopuntura clinica nella patologia muscoloscheletrica, parte seconda.* 1998.
73. AMRER. Associazione malati reumatici Emilia Romagna n.37. 2012.
74. *Low disease activity (DAS28 \leq 3.2) reduces the risk of first cardiovascular event in rheumatoid arthritis: a time-dependent Cox regression analysis in a large cohort study.* Arts, E. E., Fransen, J., Den Broeder, A. A., van Riel, P. & Poppa, C. D. 2017, Ann. Rheum., Vol. 76, p. 1693–1699 .
75. *Total cholesterol and LDL levels decrease before rheumatoid arthritis.* Myasoedova, E. et al. 2010, Ann. Rheum. , Vol. 69, p. 1310–1314 .
76. *The risk of cancer in patients with rheumatoid arthritis: a nationwide cohort study in Taiwan.* Chen, Y. J., Chang, Y. T., Wang, C. B. & Wu, C. Y. 2011, Arthritis Rheum. , Vol. 63, p. 352–358.
77. *Methods used to assess remission and low disease activity in rheumatoid arthritis.* Ometto, F. et al. 2010, Autoimmun. Rev. , Vol. 9, p. 161-164.
78. *Nuove terapie e approcci per il malato reumatico .* Corvetta, Dott. Angelo. Rimini : s.n., 2012.
79. *The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting.* Malmstrom V, Catrina AI, Klareskog L. 2016, Nat Rev Immuno., Vol. 17, p. 60-75.

80. *Seronegative rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects*. Pratt AG, Isaacs JD. 2014, Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol., Vol. 28, p. 651-666.
81. *Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis*. Nishimura, K. et al. 2007, Ann. Intern. Med., Vol. 146, p. 797-808.
82. *The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting*. Malmstrom, V., Catrina, A. I. & Klareskog, L. 2017, Nat. Rev. Immunol, Vol. 17, p. 60-75.
83. *Methotrexate-induced panniculitis in a patient with rheumatoid arthritis*. Al Maashari, R. & Hamodat, M. M. 2016, Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat., Vol. 25, p. 79-81.
84. *Five amino acids in three HLA proteins explain most of*. Raychaudhuri, S. et al. 2012, Nat. Genet, Vol. 14, p. 291-296.
85. *Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations*. Okada, Y. .et al. 2014, Hum. Mol. Genet., Vol. 23, p. 6916–6926.
86. *Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs*. Mori, M., Yamada, R., Kobayashi, K., Kawaida, R. & Yamamoto, K. 2005, J. Hum. Genet., Vol. 50, p. 264–266.
87. *NLRP1, PTPN22 and PADI4 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in ACPA-positive Singaporean Chinese*. Goh, L. L. et al. 2017, Rheumatol. Int., Vol. 3, p. 1295–1302.

88. *Brief report: genetic variation of the alpha1 -antitrypsin gene is associated with increased autoantibody production in rheumatoid arthritis.* McCarthy, C. et al. 2017, *Arthritis Rheumatol*, Vol. 67, p. 1576–1579.

89. *Long-term experience with etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis in elderly and younger patients: patient-reported outcomes from multiple controlled and open-label extension studies.* Schiff, M. H. et al. 2006, *Drugs Aging*, Vol. 23, p. 167–178.

90. *Environmental and genetic factors in the development of anticitrullinated protein antibodies (ACPAs) and ACPA-positive rheumatoid:: an epidemiological investigation in twins.* Hensvold, A. H. et al. 2015, *Ann. Rheum. Dis*, Vol. 74, p. 375–380.

91. *Mortality risk associated with rheumatoid arthritis in a prospective cohort of older women: results from the Iowa Women's Health Study.* Mikuls TR, Saag KG, Criswell LA, et al. 2002, *Ann Rheum Dis.*, Vol. 61, p. 994–999.

92. *Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women.* Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. 2006, *Am J Med.*, Vol. 117, p. 503–511.

93. *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination.* 2006, *Arthritis Rheum.*, Vol. 54, p. 38-46.

94. *Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis.* Stolt, P. et al. 2010, *Ann. Rheum. Dis*, Vol. 69, p. 1072–1076.

95. *COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis.* Watkin, L. B. et al. 2015, *Nat. Genet.*, Vol. 47, p. 654–660.
96. *Immunological findings in cigarette smokers.* Moszczynski P, Zabinski Z, Moszczynski P Jr, Rutowski J, Slowinski S, Tabarowski Z. 2001, *Toxicol Lett.* , Vol. 118, p. 121–127.
97. *C-reactive protein, statins, and the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease.* Bermudez EA, Ridker PM. 2002, *Prev Cardiol.* , Vol. 5, p. 42-46.
98. *Relationship between silicosis and rheumatoid arthritis.* Sluis-Cremer GK, Hessel PA, Hnizdo E, Churchill AR. 1986, *Thorax.* , Vol. 41, p. 596–601.
99. *Kidney disease and arthritis in a cohort study of workers exposed to silica.* Steenland K, Sanderson W, Calvert GM. 2001, *Epidemiology*, Vol. 12, p. 405-412.
100. *Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement.* Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. 1991, *J Autoimmun.*, Vol. 4, p. 871–880.
101. *The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality.* Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. 1980, *Am J Epidemiol.*, Vol. 111, p. 88-97.
102. *The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register.* *Br J Rheumatol.* Symmons DP, Barrett EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. 1994, *Br J Rheumatol.* , Vol. 33, p. 735-739.

103. *Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition.* Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, et al. 1990, JRheumatol. , Vol. 17, p. 1620–1622.
104. *The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study.* Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. 2004, J Rheumatol. , Vol. 31, p. 207-213.
105. *Reduction in incidence of rheumatoid arthritis associated with oral contraceptives.* Wingrave SJ, Kay CR. 1988, Lancet., Vol. 1, p. 569-71.
106. *Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study.* Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. 2004, Arthritis and rheumatism. , Vol. 50, p. 3458–3467.
107. *Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis.* Kokkonen H, Mullazehi M, Berglin E, et al. 2010, Arthritis research &therapy. , Vol. 13.
108. *The association between omega-3 fatty acid biomarkers and inflammatory arthritis in an anti-citrullinated protein antibody positive population.* Gan, R. W. et al. 2017, Rheumatology, Vol. 56, p. 2229–2236.
109. *Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis.* Van der Woude, D. et al. 2010, Ann. Rheum. Dis., Vol. 59, p. 1554–1561.
110. *Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss.* Krishnamurthy, A. et al. 2016, Ann. Rheum. Dis, Vol. 75, p. 721–729.

111. *Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages.* Burmester, G. R., Dimitriu-Bona, A., Waters, S. J. & Winchester, R. J. 1983, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 17, p. 69-82.
112. *Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic B-cell.* Yang, Z. et al. 2016, *Sci. Transl. Med.*, Vol. 8.
113. *Anti-citrullinated protein antibodies bind surface-expressed citrullinated Grp78 on monocyte/macrophages and stimulate tumor necrosis alfa production.* Lu, M. C. et al. A. 2010, *Arthritis Rheum.* , Vol. 62, p. 1213-1223.
114. *l. Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils.* Filer, A. et al. 2006, *Arthritis Rheum.*, Vol. 54, p. 2096–2108.
115. *The pathogenesis of rheumatoid arthritis.* McInnes, I. B. & Schett, G. 2011, s. N. Engl. J., Vol. 365, p. 2205–2219.
116. *Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems.* . Okamoto, K. et al. 2017, *Physiol. Rev.* , Vol. 97, p. 1295–1349.
117. *An Evaluation of the effect of dental focal infection on health.* Anonymous. 1952 , *JADA* , Vol. 42, p. 609-97.
118. *Manual periodontal probing in supportive periodontal treatment 2000.* . GC, Armitage. 1996, *Periodontol* , Vol. 4, p. 33-9.
119. *Treatment of periodontitis and endothelial function.* Tonetti MS, D’Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. 2007, *N Engl J Med*, Vol. 356, p. 911-20.

120. *The Link Between Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis: An Updated Review*. Potempa, Joanna Koziel & Piotr Mydel & Jan. 2014, *Curr Rheumatol Rep.*, Vol. 16.
121. *Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions*. Clifton O. Bingham III, and Malini Moni. 2013, *Curr Opin Rheumatol.*, Vol. 25, p. 345–353.
122. *Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs*. . Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Eribe EK, Olsen I, Jonsson R:. 2006, *Clin Exp Rheumatol.*, Vol. 24, p. 656-663.
123. *The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease*. Jacqueline Detert, Nicole Pischor, Gerd R Burmester and Frank Buttgerit. 2010, *Arthritis Research & Therapy* , Vol. 12.
124. *Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature*. Vilana Maria Adriano Araújo, Iracema Matos Melo, and Vilma Lima1. 2015, Hindawi Publishing Corporation .
125. *The Link Between Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis: An Updated Review*. Potempa, Joanna Koziel & Piotr Mydel & Jan. 2014, *Curr Rheumatol Rep* ., Vol. 16.
126. *Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis*. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, Venables PJ. 2010, *Immunol Rev.*, Vol. 233, p. 33-54.

127. *Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase.* Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. 2008, *Arthritis Rheum* , Vol. 58, p. 3009-3019.
128. *Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes.* Pischon N, Roehner E, Hocke A, N'guessan P, Mueller HC, Matziolis G, Kanitz V, Purucker P, Kleber BM, Bernimoulin JP, Burmester GR, Buttgerit F, Detert J. 2008, *Ann Rheum Dis* , Vol. 68, p. 1902-1907.
129. *Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association.* M., Ogrendik. 2009, *Mod Rheumatol.*, Vol. 19, p. 453-456.
130. *The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease.* T., Imamura. 2003, *J Periodontol.*, Vol. 1, p. 113-118.
131. *Proteolytic activities of oral bacteria on ProMMP-9 and the effect of synthetic proteinase inhibitors.* Jie Bao G, Kari K, Tervahartiala T, Sorsa T, Meurman JH. 2008, *Open Dent J.*, Vol. 2, p. 96-102.
132. *Rheumatoid arthritis.* Klareskog L, Catrina AI, Paget S. 2009, *Lancet.*, Vol. 373, p. 659-72.
133. *Citrullination: a posttranslational modification in health and disease.* Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. 2006, *Int J Biochem Cell Biol.* , Vol. 38, p. 1662-78.
134. *The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis.* van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. 2005, *J Immunol*, Vol. 175, p. 5575-80.

135. *PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease.* Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. 2003, *Bioessays*, Vol. 25, p. 1106-18.
136. *Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from Porphyromonas gingivalis, peptidylarginine deiminase.* McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. 2000, *Infect Immun.* , Vol. 67, p. 3248-56.
137. *Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection.* Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. 2010, *Nat Rev Rheumatol.* , Vol. 27, p. 727-30.
138. *Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis.* Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, et al. 2010, *Arthritis Rheum.* , Vol. 62, p. 2662-72.
139. *Heightened immune response to autocitrullinated Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase: a potential mechanism.* Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, et al. 2013, *Ann Rheum Dis.* , Vol. 73, p. 263-9.
140. *Antibodies to Porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives.* Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, Markland J, Robinson D, Elias B, Newkirk M, Toes RM, Huizinga TW, et al. 2013, *J Rheumatol* , Vol. 37, p. 1105-1112.
141. *The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease.* Jacqueline Detert¹, Nicole Pischon, Gerd R Burmester and Frank Buttgerit. 2011, *Arthritis Research & Therapy* .

142. *A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis.* Astry B, Harberts E, Moudgil KD. 2011, J Interferon Cytokine Res., Vol. 31, p. 927-40.
143. *How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?* . Preshaw PM, Taylor JJ. 2011, J Clin Periodontol., Vol. 38, p. 60-84.
144. *“Rheumatoid arthritis among periodontitis patients in baddi industriale state of himachal pradesh, India: a cross sectional study.* Y.P.Dev, N.Khuller,P.Basavaraj,and G.Suresh. 2013, Journal of Clinical and Diagnostic Research, Vol. 7, p. 2334–2337.
145. *Is there are relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis?* S.Doiphode, S.B. Ranade and. 2012, Journal of Indian Society of Periodontology , Vol. 16, p. 22-27.
146. *Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis.*, K. Ishida, T. Kobayashi, S. Ito et al. 2012, Journal of Periodontology, Vol. 8, p. 917-925.
147. *“Porphyromonas gingivalis and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis.* T.R.Mikuls, G.M.Thiele,K.D.Deane et al. 2012, Arthritis and Rheumatism., Vol. 34, p. 3522–3530.
148. *“The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation.* W.Nesse, J.Westra,J.E.vanderWaale et al. 2012, Journal of Clinical Periodontology., Vol. 39, p. 599–607.

149. *Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis*. J. U. Scher, C. Ubeda, M. Equinda et al. 2012, *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 64, p. 3083–3094.
150. *Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study*. M. D. Smit, J. Westra, A. Vissink, B. Doornbos-van der Meer, E. Brouwer, and A. J. van Winkelhoff. 2012, *Arthritis Research and Therapy*, Vol. 14.
151. *“Periodontal therapy in chronic periodontitis lowers gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and DAS28 in rheumatoid arthritis patients*. B. Bıyıkoglu, N. Buduneli, K. Aksu et al. 2013, *Rheumatology International*, Vol. 33, p. 2606-2616.
152. *Influence of periodontal disease, Porphyromonas gingivalis and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres*. D. F. Lappin, D. Apatzidou, A.-M. Quirke et al. 2013, *Journal of Clinical Periodontology*, Vol. 40, p. 907–915.
153. *Is there a relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis?* S. Doiphode., S.B. Ranade and. 2012, *Journal of Indian Society of Periodontology*, Vol. 16, p. 22–27.
154. *“Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints*. S. T’emoin, A. Chakaki, A. Askari et al. 2013, *Journal of Clinical Rheumatology*, Vol. 18, p. 117–121.
155. *Periodontal disease in Thai patients with rheumatoid arthritis*. N. Khantisophon, W. Louthrenoo, N. Kasitanon et al. 2014, *International Journal of Rheumatic Diseases*, Vol. 17, p. 511–518.

156. *Alveolar bone loss is associated with circulating anti-citrullinated proteins antibody(ACPA) in patients with rheumatoid arthritis.* S. M. Gonzales, J. B. Payne, F. Yu et al. 2015, *Journal of Periodontology*, Vol. 86, p. 221–231.
157. *Effect of rheumatoid arthritis on periodontitis: a historical cohort study.* P. Torkzaban, T. Hjiabadi, Z. Basiri, and J. Poorolajal. 2012, *Journal of Periodontal and Implant Science*, Vol. 42, p. 67-72.
158. *Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study.* H.-H. Chen, N. Huang, Y.-M. Chen et al. 2013, *Annals of the Rheumatic Diseases*, Vol. 72, p. 1206–1211.
159. *Rheumatoid arthritis among periodontitis patients in Baddi industrial state of Himachal Pradesh, India: a cross sectional study.* Y.P. Dev, N. Khuller, P. Basavaraj, and G. Suresh. 2013, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol. 7, p. 2334–2337.
160. *Gene-environmental interaction between smoking and shared epitope on the development of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: a meta-analysis.* Y. H. Lee, S.-C. Bae, and G. G. Song. 2014, *International Journal of Rheumatic Diseases*, Vol. 17, p. 528–535.
161. *“The supplementary therapeutic DMARD role of low-dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis.* M. Cutolo, C.M. Spies, F. Buttgerit, S. Paolino, and C. Pizzorni. 2014, *Arthritis Research & Therapy*, Vol. 16, p. 1-6.
162. *Methotrexate and oral ulceration.* G. M. J. Deeming, J. Collingwood, and M. N. Pemberton. 2005, *British Dental Journal*, Vol. 198, p. 83-85.

163. *Clinical and radiological assessment of effects of long-term corticosteroids therapy on oral health.* S.S.Beeraka, K.Natarajan,R.Patil,P.K.Manne,V.S.Prathi,and V.S.Kolaparathi. 2013, Dental Research Journal, Vol. 10, p. 666-673.
164. *“Association of anti-Porphyromonas gingivalis antibody titers with nonsmoking status in early rheumatoid arthritis: results from the prospective french cohort of patients with early rheumatoid arthritis.* R. Seror, S. le Gall-David, M. Bonnaure-Mallet et al. 2015, Arthritis & Rheumatology, Vol. 37, p. 1729–1737.
165. *Increased citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of P. gingivalis and A. actinomycetemcomitans in gingival tissue of patients with periodontitis.* Marianne Engström, Kaja Eriksson, Linkiat Lee, Monika Hermansson. 2018, J Transl Med., Vol. 16.
166. *Microbiology of aggressive periodontitis.* Kononen E, Muller HP. 2014, Peridodontol 2000, Vol. 65, p. 46-78.
167. *F. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis.* König MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K. 2016, Sci Transl Med., Vol. 329.
168. *Transcriptome analysis reveals mucin 4 to be highly associated with periodontitis and identifies pleckstrin as a link to systemic diseases.* Lundmark A, Davanian H, Bage T, Johannsen G, Koro C, Lundeberg J. 2015, Sci Rep.
169. *Citrullination is an inflammation-dependent process.* Makrygiannakis D, Af Klint E, Lundberg IE, Lofberg R, Ulfgren AK, Klareskog. 2006, Ann. Rheum Dis. , Vol. 65, p. 1219-22.

170. *Identification and immunological characterization of the domain of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Lally ET, Golub EE, Kieba IR. 1994, J Biol Chem., Vol. 269, p. 32189-95.
171. *Oral Biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease -connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine*. Kriebel K, Hieke C, Muller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B. 2018, Front Microbiol., Vol. 9, p. 53.
172. *Extracellular proteome and citrullinome of the oral pathogen Porphyromonas gingivalis*. Stobernack T, Glasner C, Junker S, Gabarrini G, de Smit M, de Jong A, Otto A, Becher D, van Winkelhof AJ, van Dijk JM. 2016, J Proteome Res., Vol. 15, p. 4532-43.
176. *Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics*. D. T. Wong. 2006, Journal of the American Dental Association, Vol. 137, p. 313-321.
177. *Causation and pathogenesis of periodontal disease*. Kinane, DF. 2001, Periodontol 2000, Vol. 25, p. 8-20.
178. *Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic T cell effector functions in rheumatoid arthritis*. . Yang, Z. et al. 2016, Sci. Transl. , Vol. 8.
179. *Rheumatoid arthritis and periodontitis, inflammatory and infectious connections. Review of the literature*. Persson, G. Rutger. 2012.