UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 em pacientes com periodontite crônica

FELIPE RODRIGUES DE ALMEIDA

RECIFE-PE

2017

FELIPE RODRIGUES DE ALMEIDA

Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 em pacientes com periodontite crônica

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador(a): Profª Drª Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Co-Orientador(a): Profª Drª Renata Cimões Jovino Silveira

RECIFE-PE

2017

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

A447a Almeida, Felipe Rodrigues de.

Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 em pacientes com periodontite crônica / Felipe Rodrigues de Almeida. _ 2017.

91 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Bruna de Carvalho Farias Vajgel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Doenças Periodontais. 2. Periodontite Crônica. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4. beta-Defensinas. I. Vajgel, Bruna de Carvalho Farias. (Orientador). II. Titulo.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-139)

FELIPE RODRIGUES DE ALMEIDA

Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 em pacientes com periodontite crônica

Aprovada em 06 de Fevereiro de 2017

Orientadora: Prof[a].Dr[a]. BRUNA DE CARVALHO FARIAS VAJGEL

Banca Examinadora

3°_____
Prof[a].Dr[a].ANDREA CRUZ CÂMARA (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

2°_____
Prof[a].Dr[a]. LEILA SANTANA COIMBRA (Examinador Externo)
UNINASSAU

1°_____
Prof[a].Dr[a].DANIELA DA SILVA FEITOSA (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Universidade Federal de Pernambuco

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Prof. Dr[a] Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (Propesq)

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

Diretor do Centro de Ciências da Saúde (CCS)

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Prof. Dr[a] Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Membros do Corpo Permanente

Prof[a]. Dr[a] ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
Prof. Dr. ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES
Prof[a]. Dr[a] ANDREA CRUZ CAMARA
Prof[a]. Dr[a] ANDREA DOS ANJOS PONTUAL
Prof. Dr. ARNALDO DE FRANÇA CALDAS JUNIOR
Prof[a] Dr[a] BRUNA DE CARVALHO FARIAS VAJGEL
Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR
Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ
Prof[a] Dr[a] FLAVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ
Prof. Dr. GUSTAVO PINA GODOY
Prof. Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO
Prof[a] Dr[a] JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO
Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS
Prof[a] Dr[a] MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL
Prof[a] Dr[a] RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA

Secretária

Sr[a] Oziclere Sena

Dedico este trabalho, com muito amor e carinho,

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em busca da minha felicidade, crescimento pessoal e profissional e, por estarem ao meu lado, em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de corpo, alma e coração,

Primeiramente a Deus, por sempre me proteger, amparar, amar, cuidar, inspirar, mesmo em momentos em como filho, achasse que não merecesse ser agraciado por este amor incondicional;

Ao Ministério da Educação (MEC) - Fundação Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pelo auxílio financeiro conferido através do custeio de bolsa acadêmica, que me foi bastante útil no custeio em alguns momentos deste projeto de pesquisa;

À Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, pela possibilidade da utilização das estruturas físicas, materiais e recursos humanos para a realização de etapas deste estudo;

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPE pela oportunidade da formação acadêmica e pelos recursos oferecidos para a execução deste estudo;

A todas as entidades parceiras que contribuíram para a execução e conclusão deste projeto, tanto na forma de pessoas físicas quanto instituições. Meu profundo agradecimento;

Às minhas queridas orientadoras, mentoras e amigas Prof[a] Bruna Farias e Prof[a] Renata Cimões, por todo carinho dado e confiança em mim depositado, por fazerem parte deste processo de conquistas pessoais em minha vida e por todos os ensinamentos dados, tanto profissionais quanto para a vida;

Aos meus colegas de jornada Rayanne Melo e Roberto Mourão. Não tenho nem encontro palavras suficientes para expor meu agradecimento a vocês. Que Deus sempre continue os abençoando e protegendo;

Aos queridos alunos de iniciação científica que fazem parte do nosso grupo de pesquisa: Cândida, Carol, Gaby, Marcela e Romário, por todo apoio dado no processo de execução deste trabalho. Meus mais sinceros agradecimentos;

Ao Prof. Dr. Sérgio Crovella e equipe, do Laboratório de Genética do Laboratório de Imunoensaio Keiso Asami – LIKA/ UFPE, pela colaboração nas análises genéticas das amostras coletadas. Meus mais sinceros agradecimentos;

Aos funcionários da UFPE, Hospital Agamenon Magalhães e LIKA que auxiliaram de alguma forma para a execução e finalização deste estudo;

Aos pacientes participantes deste estudo, pois sem os mesmos, a execução e finalização desta pesquisa não seriam possíveis;

Aos entes queridos da minha família que já se foram por terem feito parte da minha caminhada, sempre apoiando e incentivando em meus passos;

A todos os amigos e pessoas próximas que de certa forma participaram de forma direta ou indireta desta conquista. Meus mais sinceros agradecimentos.

“Trabalhe duro e em silêncio. Deixe que seu sucesso faça barulho”

Dale Carnegie (1888-1955)

- Escritor e orador norte-americano –

RESUMO

Variações genéticas do gene que codifica as β-defensinas podem influenciar a susceptibilidade às infecções, inclusive à periodontite crônica. Este estudo teve como objetivo, verificar a associação de polimorfismos genéticos da β-defensina 1 (-52; -44; -20) em pacientes portadores de periodontite crônica comparados à periodontalmente saudáveis. Nesta análise clínico-laboratorial, participaram pacientes provenientes das clínicas integrais do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e dos ambulatórios do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), no período de novembro de 2015 a outubro de 2016, os quais obedeceram os critérios de inclusão e exclusão adotados. Os participantes foram divididos em 02 grupos: portadores de periodontite crônica (GP=95) e periodontalmente saudáveis (GC=69). Inicialmente foram coletados dados sóciodemográficos (nome, idade, gênero, estado civil, renda salarial, escolaridade) e clínicos dos pacientes (profunidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e índice de sangramento à sondagem (ISS)). Além disso, foram coletadas amostras de saliva total espontânea, as quais foram submetidas à isolamento e purificação do ADN e genotipagem por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RCP-TR), para verificação da presença de polimorfismos de única base (SNPs) da β-defensina 1(-52; -44; -20). O teste exato de Fisher foi utilizado para verificar associações entre os dados de PS, NIC e ISS e os genótipos investigados. O nível de significância adotado foi de 5% e intervalo de confiança de 95%. Ambos os polimorfismos da β-defensina 1 (-52, -44 e -20) foram observados em pacientes com periodontite crônica, contudo, apenas o SNP (-20) apresentou diferença estatística entre os grupos GP e GC ($p<0,05$). Para o SNP (-20), o alelo A apresentou-se em mais da metade do GP ($p<0,000$) e o genótipo AA foi mais frequente neste grupo ($p<0,000$). Verificou-se que a razão de chances de um paciente com periodontite crônica apresentar o genótipo AA foi 14,15 vezes maior do que em periodontalmente saudáveis. Quanto à freqüência haplotípica, a maior freqüência foi de GCA ($p<0,000$), seguido de ACA no grupo GP ($p<0,000$). Apenas o genótipo GG do SNP (-44) apresentou resultado significativo para a variável NIC ($p<0,017$). Portanto, o estudo sugere que o SNP (-20) parece influenciar na predisposição da periodontite crônica, sendo o genótipo AA mais presente nos indivíduos com periodontite crônica,

assimo como, os haplótipos GCA e ACA estão mais presentes em pacientes com periodontite crônica comparados a periodontalmente saudáveis.
Palavras-Chave: Doença periodontal. Periodontite crônica. Polimorfismo de nucleotídeo único. Beta-defensinas.

ABSTRACT

Genetic variations of gene that encoding β-defensins may influence the susceptibility to infections, including chronic periodontitis. This study aimed to verify the association of genetic polymorphisms of β-defensin 1 (-52; -44; -20) in patients with chronic periodontitis compared to periodontally healthy. In this clinical-laboratorial analysis participated in the study patients from dental clinics of Federal University of Pernambuco (FUPE) and outpatient clinics of Agamenon Magalhães Hospital (AMH), from november 2015 to october 2016, which obeyed the inclusion and exclusion criteria adopted. Participants were divided into 2 groups: patients with chronic periodontitis (PG = 95) and periodontally healthy (CG = 69). Initially, were collected socio-demographic data (name, age, gender, marital status, salary income, schooling) and clinical status of the patients (depth of probing (DP), clinical insertion level (CIL) and bleeding probing index (BPI)). In addition, samples of spontaneous total saliva were collected, which were submitted to DNA isolation and purification and genotyping by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to verify the presence of single-base polymorphisms (SNPs) of β-defensin 1 (-52; -44; -20). The Fisher´s exact test was used to verify associations between DP, CIL and BPI data and the investigated genotypes. The significance level was 5% and 95% confidence interval. Both polymorphisms of β-defensin 1 (-52; -44; -20) were observed in patients with chronic periodontitis; however, only SNP (-20) presented statistical difference between PG and CG groups ($p < 0.05$). For SNP (-20), “A” allele was present in more than half of PG ($p < 0,000$) and “AA” genotype was more frequent in this group ($p < 0.000$). It was verified that the odds ratio of a patient with chronic periodontitis presenting “AA” genotype was 14.15 times higher than periodontally healthy subjects. As to the haplotype frequency, the highest frequency was “GCA” ($p < 0.000$), followed by “ACA” in PG group ($p < 0.000$). Only “GG” genotype of SNP (-44) presented a significant result for CIL variable ($p < 0.017$). Therefore, the study suggests that SNP (-20) seems to influence the predisposition of chronic periodontitis, with “AA” genotype being more present in individuals with chronic periodontitis, as “GCA” and “ACA” haplotypes are more present in patients with chronic periodontitis compared to periodontally healthy.

Key words: Periodontal disease. Chronic periodontitis. Single nucleotide polymorphism. Beta-defensin

Lista de Quadros

Quadro 1 - Critérios de inclusão e exclusão adotados 27

Quadro 2 - Diretrizes para determinação da severidade da periodontite 28

Quadro 3 - Polimorfismos a serem detectados, primers, condições para RCP-TR e tamanho do amplicon..... 30

Lista de Tabelas

Tabela 1- Descrição dos dados sociodemográficos entre os grupos GP e GC .. 32

Tabela 2 - Medidas das variáveis PS, NIC e ISS em relação aos grupos GP e GC 32

Tabela 3 - Distribuição dos alelos e genótipos (SNPs: -20, -44 e -52) nos grupos GP e GC..... 33

Tabela 4 - Distribuição das frequências haplotípicas entre os grupos GP e GC 34

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos dos 3 SNPs segundo a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica..... 34

Tabela 6 - Medidas de PS, NIC e ISS no grupo GP, segundo os SNPs (-52; -44; -20)..... 35

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS / SIDA – Acquired immunodeficiency syndrome / Síndrome da imunodeficiência adquirida

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CNS – Conselho Nacional de Saúde

CPOD – Dentes cariados, perdidos ou obturados

DNA / ADN– Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucléico

HAM – Hospital Agamenon Magalhães

HBD – Human beta-defensin / Beta-defensina humana

HIV – Human immunodeficiency virus / Vírus da Imunodeficiência humana

ISS – Índice de Sangramento à Sondagem

kb – Quilobase

kDa – Quilodalton

LIKA – Laboratório de Imunoensaio Keiso Asami

NAPA – Núcleo de Acolhimento e Pronto-Atendimento

NIC – Nível de Inserção Clínica

PE – Pernambuco

PS – Profundidade de Sondagem

PCR-RT / RCP-TR – Real time polymerase chain reaction / Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SC – Santa Catarina

SNP – Single nucleotide polymorphism / Polimorfismo de nucleotídeo único

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 MARCO TEÓRICO 18

2.1 Periodontite crônica 18

2.2 Defensinas 20

2.3 Polimorfismo genético das β-defensinas 23

3 OBJETIVOS 25

3.1 Geral 25

3.2 Específicos 25

4 MÉTODOLOGIA 26

4.1Considerações éticas 26

4.2 Desenho e localização do estudo 26

4.3 População alvo e seleção da amostra..... 26

4.4 Instrumentos de pesquisa 28

4.4.1 Entrevista e questionário 28

4.4.2 Exame clínico 28

4.4.3 Coleta e armazenamento das amostras 29

4.4.4 Etapa laboratorial 29

4.5 Isolamento e purificação do ADN 29

4.6 Análise dos polimorfismos da β-defensina 1 29

4.6.1 Genotipagem da β -defensina 1..... 30

4.7 Análise estatística 31

5 RESULTADOS 31

5.1 Parâmetros sóciodemográficos 31

5.2 Parâmetros periodontais 32

5.3 Análise alotípica, genotípica e haplotípica segundo os SNPs 33

6 DISCUSSÃO 36

7 CONCLUSÃO 38

REFERÊNCIAS 39

APÊNDICES 47

Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 47

Apêndice B: Questionário Sóciodemográfico – Ficha Clínica 49

Apêndice C: Ficha Periodontal 50

Artigo: Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 (-52; -44; -20) com a periodontite crônica 52

ANEXOS 71

Anexo A: Parecer Consubstanciado do CEP – Hospital Agamenon Magalhães / HAM 71

Anexo B: Parecer Consubstanciado do CEP – Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS 75

REVISTA JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH: NORMAS PARA AUTORES 80

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica constitui-se de um processo inflamatório infeccioso progressivo, de etiologia multifatorial, que acomete os tecidos de proteção e suporte do dente, ocasionando uma destruição irreversível de forma aleatória e em sítios específicos. É caracterizada clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsas periodontais), perda de inserção clínica. As características variáveis incluem hiperplasia ou recessão gengival, exposição da furca, mobilidade e inclinação dentárias aumentadas e esfoliação dos dentes se não controlada (NUTO, NATIONS, COSTA, 2007).

A presença de micro-organismos no biofilme dentário é necessária, mas não é suficiente para o desenvolvimento de periodontite. A severidade da periodontite está relacionada à má higiene bucal, à susceptibilidade genética do hospedeiro, e ainda a fatores de risco ambiental e adquirido, tais como fumo, estresse, idade avançada, alterações hormonais e doenças sistêmicas, como por exemplo, doenças imunologicamente mediadas e diabetes mellitus. Além disso, o aspecto clínico da doença é determinado pela resposta do hospedeiro frente ao estímulo bacteriano (PAGE *et al.*, 1997; IKUTA *et al.*, 2015).

A resposta do organismo do hospedeiro aos micro-organismos pode ser tanto protetora, no que diz respeito à produção de moléculas que teriam a capacidade de combater estes micro-organismos; quanto destrutiva, quando o sistema imunológico é ativado de forma exacerbada causando danos aos tecidos próprios do organismo; ou ambas. A ativação da resposta imune permite a eliminação dos antígenos bacterianos, promovendo assim a resolução do processo inflamatório e infeccioso. Este mesmo sistema imunológico é organizado em termos de células e moléculas que têm papéis especializados para defender-se contra infecções (ALVES *et al.*, 2003; AZUMA, 2006).

Diante da perspectiva da resposta do organismo mediado pelo sistema imune e possível susceptibilidade orgânica do hospedeiro a certas condições infecciosas, como a periodontite crônica, surge uma família de peptídeos antimicrobianos que podem ser produzidas por diversas células e tecidos do organismo, as β-defensinas. Elas apresentam amplo espectro de ação com atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, espécies de fungos e vírus. Além desta atividade

antimicrobiana, estas β-defensinas apresentam ações que providenciam a ligação entre as respostas imune inata e adaptativa, agindo como fator quimiotático das células dendríticas e células T memória (BISSEL *et al.*, 2004; OCA *et al.*, 2006; DIAMOND, RYAN, 2011; SEMPLE, DORIN, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013).

As β-defensinas são reguladas em resposta ao estímulo inflamatório, e podem ser encontradas tanto na saliva quanto no fluido crevicular, sendo expressas pelo epitélio oral, língua e glândulas salivares. Acredita-se, ainda, que as mesmas possam estar envolvidas na manutenção da homeostase na cavidade oral (DIAMOND, RYAN, 2011; LOO *et al*., 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; VAN HEMERT *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013).

Supõe-se que as variações do gene que codifica as β-defensinas possam influenciar a susceptibilidade a certas infecções, tais como a periodontite, (DÖRK; STUHRMANN, 1998); infecções de vias aéreas superiores e inferiores, (BOGERFORS *et al.*, 2012; PACE *et al.*, 2012); susceptibilidade ao HIV, assim como, progressão e severidade da doença AIDS (MEHLOTRA *et al.,* 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013); carcinomas, inclusive o oral (DIAMOND, RYAN, 2011); e doenças gastrointestinais (KELLY *et al.*, 2013).

Pesquisas sobre alterações genéticas do tipo polimorfismo de única base (SNP), que são variações na sequência de DNA que podem provocar alterações no produto protéico do gene levando à produção de proteínas defeituosas (LODISH *et al*., 2002), têm sido pouco desenvolvida por grupos de pesquisa em Odontologia no Brasil e no mundo. O estudo dos polimorfismos das β-defensinas em pacientes com periodontite crônica pode conseguir uma maior elucidação da susceptibilidade de certos indivíduos à doença periodontal diante da presença de variações genéticas.

Diante disso, o estudo teve por objetivo avaliar a presença de polimorfismos genéticos da β-defensina-1 (-52; -44; -20) em pacientes portadores de periodontite crônica comparado a pacientes periodontalmente saudáveis.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Periodontite crônica

A cavidade oral é um ambiente peculiar, onde tecidos duros (os dentes) sobressaem através de tecidos moles (gengiva) em um ambiente úmido, contendo

nichos que favorecem a fixação e crescimento de micro-organismos, tais como bactérias patogênicas. A interação destes micro-organismos com o hospedeiro determina o curso e a extensão da doença resultante. Os micro-organismos podem exercer efeitos patogênicos diretamente, por causarem destruição periodontal, ou indiretamente, por estimularem e modularem a resposta do hospedeiro (LOO *et al*., 2012; MAHANONDA *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013).

O periodonto é formado por estruturas de suporte e proteção do dente, que incluem gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. A periodontite crônica é um processo inflamatório infeccioso progressivo e de etiologia multifatorial, que acomete as estruturas de suporte e proteção do dente, causando destruição irreversível das mesmas, de forma aleatória e em sítios específicos. É caracterizada por alterações de cor, textura e volume da gengiva marginal, inflamação e sangramento gengival, redução da resistência dos tecidos moles marginais à sondagem (aumento da profundidade de bolsa periodontal) e perda de inserção do dente à gengiva e ao osso alveolar, hiperplasia ou recessão da margem gengival, perda do osso alveolar, exposição de furca, aumento da mobilidade dentária, inclinação dentária aumentada e eventual esfoliação dentária (NUTO, NATIONS, COSTA, 2007; IKUTA *et al.*, 2015).

Esta patologia inicia-se com uma gengivite, mas como a sua progressão é lenta, os sintomas como perda óssea e de inserção só serão observados posteriormente. A progressão da periodontite crônica é um processo contínuo que pode sofrer períodos de exarcebação aguda através de alguns fatores de influência, tais como idade; extensão da perda de inserção e óssea; profundidade da bolsa; fatores retentivos de placa; patogenicidade das bactérias colonizadas e fumo. Esses fatores de influência fazem com que o prognóstico da periodontite seja determinado pela extensão, severidade e idade do paciente, podendo ser modificada por fumo, estresse e doenças sistêmicas como diabetes e soropositividade ao HIV (FLEMMIG, 1999; LINDHE *et al.*, 1999).

Embora a maioria dos indivíduos com mais de 50 anos de idade tenham sofrido quantidade moderada de destruição dos tecidos periodontais, formas mais avançadas da doença são vistas em apenas uma pequena parcela da população, em torno de 10%. A idade de início da periodontite crônica e sua subseqüente taxa de progressão variam entre indivíduos e são provavelmente influenciadas por fatores genéticos e de risco ambientais (PAGE *et al.*, 1997; IKUTA *et al.*, 2015).

A presença de bactérias patogênicas é essencial, mas insuficiente para produzir periodontite. O controle da doença periodontal é de extrema importância, pois além de acarretar perdas dentárias, têm sido identificadas associações e evidências epidemiológicas de que as infecções periodontais parecem ocasionar bacteremias e agravar doenças sistêmicas, principalmente nos casos de doenças cardiovasculares / cerebrovasculares, no nascimento de prematuros e crianças com baixo peso, restrição do crescimento fetal e no controle glicêmico de diabéticos. Outros fatores do hospedeiro tais como alcoolismo, tabagismo, diabetes, estresse, desnutrição e predisposição hereditária são determinantes importantes da presença e severidade da doença periodontal (SCANNAPIECO *et al.*, 1998; ARMITAGE, 2000; LI *et* al., 2000; CORSON, POSTLETHWAITE, SEYMOUR, 2001; ZINA *et al.,* 2005; VIEIRA, PÉRET, PÉRET FILHO, 2010; LOO *et al*., 2012).

2.2 Defensinas

A resposta do organismo do hospedeiro aos micro-organismos do biofilme bacteriano pode ser tanto protetora, no que diz respeito à produção de moléculas que teriam a capacidade de combater estes micro-organismos; quanto destrutiva, quando o sistema imunológico é ativado de forma exacerbada causando danos aos tecidos próprios do organismo ou ambas, o que contribui para a ampla variedade de mudanças teciduais observadas na doença periodontal. O sistema imune é dividido em duas categorias, a imunidade inata e a imunidade adaptativa, e é organizado em termos de células e moléculas que têm papéis especializados para defender-se contra a infecção, as quais são fundamentais para a resposta deste sistema contra a invasão microbiana (ALVES *et al.*, 2003; AZUMA, 2006).

A imunidade inata ou natural refere-se a qualquer resistência intrínseca já presente na ocasião em que um patógeno se apresenta pela primeira vez ao organismo onde, o que estimula o início dessa resposta é a interação de estruturas moleculares produzidas por esse patógeno e os receptores de reconhecimento para tal agente agressor do hospedeiro. A ativação da resposta imune inata, contando com a participação de fagócitos e componentes do complemento, permite a eliminação dos antígenos bacterianos, promovendo assim a resolução do processo inflamatório (ALVES *et al.*, 2003; CUNNION, WAGNER, FRANK, 2004; AZUMA, 2006).

Já a imunidade adquirida ou adaptativa refere-se à resistência que está ausente ou fraca na primeira exposição ao patógeno, mas que aumenta acentuadamente com exposições subseqüentes ao mesmo patógeno (CUNNION, WAGNER, FRANK, 2004; AZUMA, 2006).

O epitélio periodontal funciona como uma barreira física, permitindo a passagem seletiva de antígenos, células (principalmente do sistema imunológico), uma série de moléculas de defesa (tais como as defensinas), devido à presença de junções intercelulares e citoesqueleto de queratina. Esta função de barreira física ainda não é bem compreendida, mas é reconhecido que o epitélio de todo o corpo faz mais do que um bloqueio da resposta antigênica, induzindo diversos tipos de peptídeos antimicrobianos (DALE, 2002; MARSHALL, 2004).

Peptideos antimicrobianos tem sido identificados e isolados a partir de uma grande variedade de organismos, incluindo seres humanos, onde eles participam principalmente na primeira linha de defesa contra patógenos. Em geral, o mecanismo de ação antimicrobiana desses peptideos antimicrobianos é a formação de poros na membrana citoplasmática das bactérias. Entre esses peptideos estão as defensinas, pequenas moléculas proteicas que variam de cerca de 2 a 6 kDa e que são ricas em resíduos de aminoácidos catiônicos e cisteína. São abundantes em seres humanos e outros vertebrados, além de possuírem ampla atividade microbicida (JUNG *et al.,* 2011; BOGEFORS *et al.*, 2012; HUGO *et al.*, 2012; LOO *et al*., 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; SCHMIDTCHEN, 2012; SEMPLE, DORIN, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013; KELLY *et al.*, 2013; MEHLOTRA *et al.*, 2013).

Os peptídeos antimicrobianos são produzidos não só pelo epitélio, mas também pelas células do sistema imune e de reparo tecidual que o atravessam, sendo a sua produção estimulada devido ao reconhecimento da presença das bactérias pelos receptores específicos. Atualmente, existem no mínimo quatro famílias diferentes desses peptídeos (α-defensina, β-defensina, catelicidinas e saposinas) encontradas em humanos (RAJ, DENTINO, 2002; MARSHALL, 2004).

As defensinas humanas são classificadas em duas subfamílias, alfa e beta-defensinas, que se distinguem pela localização e par de seis resíduos de cisteína. Até o momento, foram encontradas 40 regiões de codificação potenciais para as β-defensinas humanas. A expressão de muitas dessas foi confirmada ao nível do mRNA, mas apenas HBD1 a HBD4 foram caracterizadas explicitamente e são predominantemente expressas em vários tecidos epiteliais. Curiosamente, as β-

defensinas humanas podem agir como quimiocinas estimulando a resposta imune adaptativa (JUNG *et al.*, 2011; LOO *et al*., 2012; FODE *et al.*, 2011; MEHLOTRA *et al.*, 2013).

As defensinas, além de estarem diretamente envolvidas em ação antimicrobiana, aparecem com o papel de dar assistência a outros participantes da resposta inata, assim como alertando a resposta imune adquirida ou adaptativa. As α-defensinas são capazes de ativar a via clássica do sistema complemento e regular a produção de interleucina-18 pelas células epiteliais, que poderia aumentar o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (MARSHALL, 2004; FODE *et al.*, 2011). No caso das β-defensinas, além da sua capacidade microbicida, são capazes de promover a ligação entre as respostas imune inata e adaptativa, agindo como fator quimiotático das células do sistema imune (BISSEL *et al.*, 2004; DIAMOND, RYAN, 2011; SEMPLE, DORIN, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013). Existem 28 β-defensinas humanas, mas apenas 04 foram caracterizadas (JUREVIC *et al.*, 2003).

Na cavidade oral, as β-defensinas podem ser encontradas tanto na saliva quanto fluido crevicular gengival, sendo expressas tanto pelo epitélio bucal quanto pela língua e glândulas salivares, sendo reguladas em resposta a estímulos inflamatórios. Em vista dessa proposição, acredita-se que as β-defensinas possam estar diretamente envolvidas na manutenção da homeostase bucal (DIAMOND, RYAN, 2011; LOO *et al*., 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; VAN HEMERT *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013).

A β-defensina 1 (HBD-1) é expressa por células epiteliais de muitos órgãos humanos, tais como pâncreas, fígado, glândulas salivares, epitélio oral e traquéia (ABIKO *et al.*, 1999). Possuem amplo espectro de ação mostrando atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, alguns fungos e vírus (DOMMISCH *et al.*, 2007; DIAMOND, RYAN, 2011; BOGEFORS *et al.*, 2012; HUGO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; WU *et al.,* 2012).

O gene da β-defensina-1 (DEFB1) está localizado na porção 8p23.2-p23.1 e sua extensão é aproximadamente 8kb (DÖRK; STUHRMANN, 1998; OCA *et al.*, 2006; FODE *et al.*, 2011). Vários genes α e β-defensinas são localizados no cromossomo 8p22-23 (CAGLIANI *et al.*, 2008).

Os seres humanos produzem naturalmente vários peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas derivadas do epitélio, que tem atividade contra *Porphyromonas*

gingivalis, Actinomycetes, Streptococcus e *Candida sp. in vitro*. Alguns micro-organismos periodontopatogênicos como *Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentam algumas cepas que são resistentes às β-defensinas (BRISSETTE, LUKEHART, 2007; DIAMOND, RYAN, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012).

Uma abordagem comum para se estudar os efeitos de peptideos antimicrobianos envolve métodos não-invasivos para medir a atividade em fluidos, como saliva e fluido crevicular gengival, que contêm produtos produzidos sistêmica e localmente. O fluido crevicular gengival fornece uma representação precisa das concentrações de mediadores inflamatórios no soro e tecidos adjacentes. Assim, grande parte dos dados pertencentes à cavidade oral são estudados pela coleta de peptídeos antimicrobianos em secreções. Esses estudos têm esclarecido atividades que conectam peptídeos antimicrobianos às funções imunológicas na cavidade oral (MAHANONDA *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013).

2.3 Polimorfismo genético das β-defensinas

Variações genéticas podem explicar a susceptibilidade genética a alguns eventos biológicos, estes incluem a predisposição às doenças e a resposta farmacológica (KRUGLYAK, 1997; FODE *et al.*, 2011).

Polimorfismos de uma única base (SNP) são variações na sequência de ADN que podem provocar alterações no produto protéico do gene levando à produção de proteínas defeituosas. São o tipo mais comum de variação e estão presentes, aproximadamente, a cada 300 pares de bases através do genoma. Os SNPs podem alterar a transcrição e translação, assim como mudar a sequência de aminoácido e consequentemente a estrutura ou função da proteína. Estes podem ser utilizados como marcadores para estudos genéticos em humanos para comparar a variação entre as populações, analisar haplótipos, determinar a ligação do desequilíbrio entre genes e como marcadores para associação com doenças (JUREVIC *et al.*, 2002; LODISH *et al*., 2002).

Um alelo é cada uma das várias formas alternativas do mesmo gene, ocupando um dado *locus* num cromossomo. Consiste em uma sequência de núcleotídeos de um gene específico. Um alelo pode ser mutante, resultando em um

fenótipo alterado, ou selvagem, caracterizado por um produto gênico ativo e um fenótipo “normal” (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

O conjunto de antígenos codificados por genes de um cromossomo haplóide constitui um haplótipo. Os haplótipos são uma determinada ordem de marcadores herdada em blocos, observada em um cromossomo particular, tendo sido úteis para estudos antropológicos e para a definição do fluxo de alelos em populações humanas (SALZANO, BORTOLINI, 2002).

O conjunto de haplótipos paterno e materno constitui o genótipo. Assim, cada indivíduo apresenta dois haplótipos, um de origem paterna e outro de origem materna, ou seja, o genótipo refere-se à constituição genética de um organismo, representada por todos os genes que possui um indivíduo de uma espécie (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

Acredita-se que variações genéticas do gene que codifica as β-defensinas possam influenciar a susceptibilidade de certos indivíduos a infecções, inclusive a periodontite crônica (DÖRK; STUHRMANN, 1998; PEREIRA *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2103), doenças tais como infecções de vias aéreas superiores e inferiores (rinite alérgica e asma, por exemplo) (BOGERFORS *et al.*, 2012; PACE *et al.*, 2012), susceptibilidade ao virus HIV-1, progressão e severidade da SIDA (MEHLOTRA *et al.,* 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013), tumores do tipo carcinomas, entre eles o bucal (ABIKO *et al.*, 1999; DIAMOND, RYAN, 2011) e afecções gastrintestinais (KELLY *et al.*, 2013).

Bogerfors *et al.* (2012) investigando a presença de HBD1-3 no tecido tonsilar e seu papel potencial na rinite alérgica (AR), verificaram que HBD1-3 estavam presentes no tecido tonsilar, incluindo células epiteliais e línfócitos CD4 +, CD8 + e CD19 +. Verificaram que a expressão foi reduzida em amígdalas alérgicas em comparação com saudáveis.

Pace *et al.* (2012) em estudo para avaliar as defesas pulmonares alteradas na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) verificaram que esta pode promover a distalização das vias aéreas, colonização bacteriana e liberação de β-defensina 2 (HBD2) por células epiteliais, crucialmente os mecanismos de defesa pulmonar. Os pesquisadores observaram que, nas vias aéreas distais, a DPOC expressa altamente HBD2. Os autores concluíram que tais dados fornecem novos insights sobre os possíveis mecanismos envolvidos na alteração da imunidade inata na DPOC.

Examinando a distribuição de SNPs do DEFB1 utilizando amostras de duas coortes de HIV / SIDA dos Estados Unidos e cinco populações diversas dos Repositórios de Células de Coriell, Mehlotra *et al.* (2013) determinaram as frequências de 10 SNPs em DEFB1. Verificaram diferenças visíveis nas frequências de alelos e haplótipos entre vários grupos raciais / étnicos. Os pesquisadores relatam que tais observações fornecem informações à complexa interação entre polimorfismos genéticos de β-defensina e susceptibilidade, ou a progressão ou gravidade, da infecção / doença pelo HIV.

Nittayananta *et al.*, (2013) objetivaram em seu estudo determinar a expressão oral de β-defensinas humanas em Infectados pelo HIV em comparação com controles não-HIV; a expressão destas β-defensinas humanas orais em doentes infectados com HIV e em terapia anti-retroviral em comparação com aqueles sem tratamento. Os mesmos autores concluíram que a imunidade inata oral é afetada pela infecção pelo HIV e pelo uso de terapia anti-retroviral.

Diamond e Ryan, (2011) realizaram uma revisão da literatura sobre a influência das β-defensinas sobre o surgimento de tumores. Juntos, tais estudos *in vitro*, *in vivo* e humanos sugeriram que estes peptídeos são importantes na homeostase da cavidade oral.

Kelly *et al.* (2013) em estudo que propunha a extensão a um modelo humano, utilizaram 94 amostras de tecidos intestinais humano e revelaram que o fator induzível por hipoxia (HIF-1α) basal é crítico para a expressão constitutiva de hBD-1 entérico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Caracterizar a presença de polimorfismos genéticos da β-defensina-1 (-52; -44; -20) em pacientes com doença periodontal crônica (GP) em comparação aos pacientes periodontalmente saudáveis (GC).

3.2 Específicos

- Detectar polimorfismos de uma única base (SNPs) da β-defensina-1;
- Verificar a existência de associação entre a presença de polimorfismo da β-defensina-1 e a extensão / severidade da periodontite crônica;

- Verificar a distribuição das frequências haplotípicas entre os grupos GP e GC;
- Analisar a associação entre os parâmetros de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e índice de sangramento a sondagem com a presença dos polimorfismos (-52, -44, -20) da β-defensina-1.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

Este estudo seguiu as normas 466/12 do CNS (Conselho Nacional de Saúde), que regulamenta a pesquisa em humanos, obtendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Hospital Agamenon Magalhães, CAAE n° 49166415.0.3001.5197 e parecer n° 1.368.830 (anexo A), e do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde / CCS-UFPE, CAAE n° 49166415.0.0000.5208 e parecer n° 1.310.208 (anexo B).

Todos os pacientes foram devidamente informados sobre o teor científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos. Após explicação dos objetivos e aceite em participar do exame clínico e coleta das amostras, todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (apêndice A).

4.2 Desenho e localização do estudo

O estudo tratou-se de uma análise clínico-laboratorial. A captação dos pacientes, realização dos exames clínicos e coleta de amostras de saliva total espontânea ocorreram nas clínicas integrais do curso de graduação em Odontologia da UFPE e nos ambulatórios do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) - Recife- PE.

4.3 População alvo e seleção da amostra

Foram convidados para participar do estudo, os pacientes que se encontravam a espera de consulta ou tratamento nos ambulatórios do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), e nas clínicas integrais do curso de graduação em Odontologia da UFPE, no período de novembro de 2015 a outubro de 2016.

A amostra foi do tipo conveniência, não probabilística e aleatória, dividida em 2 grupos: grupo periodontite (GP) - formado por pacientes diagnosticados com

periodontite crônica; e grupo controle (GC) - composto por pacientes periodontalmente saudáveis.

Os pacientes foram recrutados de acordo com a procura ao serviço, e selecionados após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão adotados (quadro 1).

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Idade: ≥ 35 anos	Realizado tratamento periodontal nos últimos 06 meses
Dentes naturais: ≥ 08 dentes *Excluindo-se os 3° molares e dentes indicados para exodontia.	Uso de antibióticos nos últimos 06 meses e Uso de anti-inflamatórios de forma crônica
Grupo Periodontite (GP): diagnóstico clínico de periodontite crônica	Uso de aparelho ortodôntico
Grupo Controle (GC): periodontalmente saudáveis	Presença de condição sistêmica que possa interferir no curso da doença periodontal: diabetes ou doenças imunologicamente mediadas
Aceitar participar do estudo	Gestantes; Lactantes
Registro no serviço do HAM ou NAPA - UFPE	Fumantes.

Quadro 1: Critérios de inclusão e exclusão adotados.

Como parâmetros utilizados para diagnóstico de periodontite crônica, foram considerados presença de profundidade de sondagem > 3 mm, presença de sangramento à sondagem e perda de inserção clínica ≥ 1 mm. Já os pacientes foram considerados periodontalmente saudáveis quando possuíam profundidade de sondagem ≤ 3 mm e perda de inserção clínica < 1mm. Os parâmetros adotados levaram em consideração algumas diretrizes adotadas pela Academia Americana de Periodontologia para diagnóstico clínico e classificação da periodontite (quadro 2) (ARMITAGE, 1999; GEURS *et al.*, 2015).

A severidade e extensão da periodontite crônica foram classificadas de acordo com os parâmetros adotados segundo Wiebe e Putnins (2000) os quais comentam sobre o sistema de classificação da doença periodontal de acordo com a Academia Americana de Periodontologia. Quanto à extensão, a periodontite crônica foi classificada como localizada ou generalizada a depender se < 30% ou > 30% dos sítios estão envolvidos. A severidade é baseada na perda de inserção clínica (PIC) e

é designada como leve (1-2 mm PIC), moderada (3-4 mm PIC) ou severa (> 5 mm PIC).

Parâmetros	Leve	Moderada	Severa
Profundidade de sondagem	>3 e < 5 mm	≥5 e <7 mm	≥ 7 mm
Sangramento à sondagem	Sim	Sim	Sim
Perda óssea radiográfica	Até 15% do comprimento da raiz ou ≥ 2 mm e ≤ 3 mm	16% a 30% ou >3 mm e ≤ 5 mm	>30% ou >5 mm
Perda de inserção clínica	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm

Quadro 2: Diretrizes para determinação da severidade da periodontite (GEURS *et al.*, 2015).

4.4 Instrumentos de pesquisa

4.4.1 Entrevista e questionário

Antes de iniciar o exame clínico, foram registrados dados sobre a idade, sexo, renda, escolaridade, estado civil, hábito de fumar e medicamentos em uso, através do preenchimento do questionário sóciodemográfico (apêndice B).

4.4.2 Exame clínico

O exame clínico foi realizado por 03 examinadores previamente calibrados, e 03 anotadores. O valor de kappa inter-examinadores foi de 0,512, considerado uma calibração de razoável a boa (Bello *et al.*, 2016).

Para cada paciente foi preenchido um periograma (apêndice C), no qual foram coletados dados sobre profundidade de sondagem (PS), a qual corresponde à distância entre a margem gengival e a porção mais coronal do epitélio juncional (fundo de sulco/bolsa); índice de sangramento à sondagem (ISS), verificada pela presença ou ausência de sangramento durante a sondagem; e nivel de inserção clínica (NIC), que corresponde ao somatório da distância entre a junção amelocementária e a margem gengival e da margem gengival até a porção mais coronal do epitélio juncional (fundo de sulco/bolsa) (GOMES FILHO *et al.*, 2006)

Para cada dente foram sondados seis sítios: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual. O exame foi

realizado sob luz artificial, proveniente de fotóforo a pilha (quando não foi possível examinar o paciente em cadeira odontológica) ou foco luminoso da cadeira odontológica, com o auxílio de odontoscópio e sonda periodontal milimetrada tipo Universidade Carolina do Norte, Trinity®; além dos equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, luvas, óculos, jaleco).

4.4.3 Coleta e armazenamento das amostras

Após a realização do exame clínico, realizou-se a coleta da saliva total espontânea utilizando-se tubos tipo Falcon estéreis, sendo o paciente orientado a depositar no mínimo 1ml desta saliva total no respectivo tubo.

As amostras coletadas foram armazenadas em freezer a – 20°C no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, para extração do material genético, ficando sob responsabilidade do pesquisador.

Todo processo de esterilização dos materiais utilizados foi executado pelo próprio pesquisador no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE.

4.4.4 Etapa laboratorial

As análises laboratoriais aconteceram no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e no Laboratório de Imunoensaio Keiso Asami – LIKA/UFPE.

4.5 Isolamento e purificação do ADN

Para isolamento e purificação de ADN foi utilizado o kit da PROMEGA Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as especificações do fabricante. Após o processo, o material obtido foi novamente armazenado a -20ºC até processamento por RCP-TR (reação em cadeia da polimerase em tempo real).

4.6 Análise dos polimorfismos da β-defensina 1

A escolha dos polimorfismos estudados está de acordo com os valores de MAF (Minim Allele Frequence / Frequência Alélica Mínima), onde esta deve ser superior a 10% nas populações caucasianas e africanas. A técnica de RCP-TR foi

utilizada para o sequenciamento genético e genotipagem da β-defensina 1, de acordo com o proposto por Polesello *et al.* (2015).

Após isolamento e purificação do ADN foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) com auxílio de termociclador. A sequência do processamento foi: amplificação do ADN, hibridização com primers de oligonucleotídeos e análise das porções amplificadas por eletroforese. Todo o processamento e análise dos polimorfismos foram realizados baseados no protocolo proposto por Jurevic *et al.* (2003) e Polesello *et al.* (2015) (Quadro 3).

SNP	Primer	Condições para RCP-TR	Extensão do amplicon
(-52) (G →A)	F – 5'-GTGCCATGTGACTGCTGACT -3' R - 5'- AGCCATCCGAGACTCACATC -3'	50°C por 2 min. 95°C por 10 min. e 40 ciclos of 95°C por 15s e 64°C por 1 min 72º C por 1 min	156pb
(-44) (C→G)	F- 5'-GACGAGGTTGTGCAATCCACCAG-3' R- 5'-GCAGAAGGTAGGAAGTTCTCATGGCG-3'		156pb
(-20) (G→A)	F- 5'-GACGAGGTTGTGCAATCCACCA-3' R – 5'-GCAGAAGGTAGGAAGTTCTCAT-3'		156pb

Quadro 3 - Polimorfismos a serem detectados, primers, condições para RCP-TR e tamanho do amplicon.

4.6.1 Genotipagem da β-defensina 1

As amostras foram genotipadas para os SNPs -52G/A (rs1799946), -44C/G (rs1800972), -20G/A (rs11362), por sequenciamento direto de polimorfismos.

Foram analisados polimorfismos nos alelos, genótipos e haplótipos do gene da β-defensina 1, para investigar possíveis modificações nessas estruturas e sua influência na predisposição à periodontite crônica.

A genotipagem foi realizada por RCP-TR utilizando sondas alelo específicas (Sistema TaqMan®). O equipamento utilizado para as reações foi o termociclador ABI 7500 (AppliedBiosystems®).

Para amplificação do ADN das amostras através da RCP-TR, utilizou-se um volume total de 5 µl, contendo aproximadamente 1µl de ADN molde por reação (com

concentração de 25ng/µl), 1,25µl de água, 2,5µl do TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems®) e 0,25µl das sondas.

O ciclo foi realizado com uma desnaturação inicial durante 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 20 seg, a temperatura de anelamento de 55°C durante 30 seg e 72°C durante 30 seg, com uma extensão final para 72°C durante 7 min.

O sucesso da amplificação do ADN e a ausência de produtos de reação não específica foram verificados por meio de uma corrida eletroforética de amplicons em gel de agarose a 2%.

4.7 Análise estatística

Os dados de PS, NIC, ISS foram categorizados e aplicados o teste de Mann Whitney. As associações entre a severidade/extensão da periodontite crônica e os genótipos dos SNPs da β-defensina 1 (-52, -44, -20) foram feitas através do teste de independência da razão de verossimilhança.

Para verificar a distribuição das freqüências alotípicas, genotípicas e haplotípicas foi aplicado o teste exato de Fisher.

Para verificar a distribuição das freqüências alotípicas, genotípicas e haplotípicas foi aplicado o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado foi de 5%, e intervalo de confiança de 95%. Os dados foram digitados no programa Microsoft Excel e o software utilizado para as análises estatísticas foi o IBM® SPSS 20.0, versão trial.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros sóciodemográficos

Participaram do estudo 164 pacientes, dos quais 95 (57,9%) pertenciam ao grupo de pacientes com periodontite crônica (GP), com média de idade de 53,0 ± 9,6 anos e 69 (42,1%) ao grupo controle (GC), com idade média de 49,6 ± 10,7 anos. A mediana de dentes por paciente nos respectivos grupos foi a seguinte: GP = 18 dentes e GC = 22 dentes, com valor de p = 0,004.

O sexo feminino representou a maioria dos participantes nos grupos GP e GC, assim como a maioria declarou-se como sendo casado, com renda salarial de até 2 salários mínimos e escolaridade de até o segundo grau completo (Tabela 1)

Tabela 1 - Descrição dos dados sociodemográficos entre os grupos GP e GC

Variáveis	Grupo				Total	
	GP		GC			
	N	%	N	%	N	%
Sexo						
Masculino	19	20,0	6	8,7	25	15,2
Feminino	76	80,0	63	91,3	139	84,8
Total	95	100,0	69	100,0	164	100,0
Estado civil						
Casado	46	48,4	31	45,6	77	47,2
Solteiro	31	32,6	19	27,9	50	30,7
Divorciado	8	8,4	14	20,6	22	13,5
Viúvo	10	10,5	4	5,9	14	8,6
Total	95	100,0	68	100,0	163	100,0
Renda						
Até 2 SM	67	75,3	38	66,7	105	71,9
De 2 a 4 SM	19	21,3	15	26,3	34	23,3
De 4 a 10 SM	3	3,4	4	7,0	7	4,8
Total	89	100,0	57	100,0	146	100,0
Escolaridade						
Não sabe ler ou escrever	1	1,1	1	1,4	2	1,2
1º grau incompleto	16	17,0	5	7,2	21	12,9
1º grau completo	12	12,8	5	7,2	17	10,4
2º grau incompleto	6	6,4	8	11,6	14	8,6
2º grau completo	40	42,6	26	37,7	66	40,5
Superior incompleto	5	5,3	3	4,3	8	4,9
Universidade completa	7	7,4	11	15,9	18	11,0
Não sabe	7	7,4	10	14,5	17	10,4
Total	94	100,0	69	100,0	163	100,0

GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle; SM = Salário mínimo

5.2 Parâmetros periodontais

A média do índice de sangramento à sondagem (ISS) foi de 15,4 ± 14,0 % e 5,1± 6,7%, a média de profundidade de sondagem (PS) foi de 2,3 ± 0,6 mm e 1,9 ± 0,3 mm e média do nível de inserção clínica (NIC) de 3,5 ± 1,7 mm e 2,1 ± 0,4 mm para os grupos GP e GC, respectivamente, apresentando diferenças significativas para todas essas variáveis ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Medidas das variáveis PS, NIC e ISS em relação aos grupos GP e GC

Variável	Grupo	N	Média	dp	p-valor[1]
PS	GP	95	2,3	0,6	0,000
	GC	69	1,9	0,3	
NIC	GP	95	3,5	1,7	0,000
	GC	69	2,1	0,4	
ISS	GP	95	15,4	14,0	0,000
	GC	69	5,1	6,7	

1- Teste de Mann Whitney; dp = Desvio padrão; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

5.3 Análise alotípica, genotípica e haplotípica segundo os SNPs

Relacionando à distribuição dos alelos e genótipos de cada polimorfismo, entre os grupos GP e GC, apenas o SNP (-20) apresentou diferença significativas, sendo o alelo A observado em 61,0% dos pacientes do GP e o alelo G em 73,1% nos pacientes do GC. O genótipo AA foi observado em 38,9% no GP, enquanto que o genótipo de referência GG foi verificado em 55,1% dos pacientes no GC. Os pacientes do GP apresentaram uma chance de 14,15 vezes de apresentar o genótipo AA em relação aos pacientes do GC (Tabela 3).

Analisando a freqüência haplotípica dos SNPs entre os grupos GP e GC, a maior freqüência para haplótipos observada foi GCA (31,1%) no grupo GP, seguido de ACA (17,4%), diferindo estatisticamente em relação ao GC (p=0,000). A chance de um paciente com periodontite crônica apresentar o haplótipo GCA é de 4,54 vezes em relação a um paciente periodontalmente saudável. Esta probabilidade é aumentada para 5,89 vezes quando o alelo G deste haplótipo é trocado por um alelo A na posição do SNP (–52) (tabela 4).

Tabela 3 - Distribuição dos alelos e genótipos (SNPs: -20, -44 e -52) nos grupos GP e GC.

SNPs/ Alelos/ Genótipos	**GP N / (%)**	**GC N / (%)**	**GP x GC p-valor[1]; OR (IC95%)**
SNP (-52)			
G	111 (58,4)	72 (52,2)	Referência
A	79 (41,6)	66 (47,8)	0,311; 0,78 (0,49-1,24)
GG	31 (32,6)	22 (31,9)	Referência
AG	49 (51,6)	28 (40,6)	0,586; 1,24 (0,57-2,70)
AA	15 (15,8)	19 (27,5)	0,271; 0,56 (0,21-1,46)
SNP (-44)		#	
C	155 (81,6)	115 (83,3)	Referência
G	35 (18,4)	23 (16,7)	0,770; 1,13 (0,61-2,12)
CC	65 (68,4)	51 (73,9)	Referência
CG	25 (26,3)	13 (18,8)	0,345; 1,50 (0,66-3,54)
GG	5 (5,3)	5 (7,2)	0,750; 0,79 (0,17-3,62)
SNP (-20)			
G	74 (39,0)	101 (73,1)	Referência
A	116 (61,0)	37 (26,8)	**0,000*;** 4,26 (2,59-7,10)
GG	16 (16,8)	38 (55,1)	Referência
AG	42 (44,2)	25 (36,2)	**0,0004*;** 3,94 (1,74-9,26)
AA	37 (38,9)	6 (8,7)	**0,000*;** 14,15 (4,74-49,48)

1 – Teste exato de Fisher; *p-valor significativo (<0.05); # Fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

Tabela 4 - Distribuição das frequências haplotípicas entre os grupos GP e GC

Haplótipos			GP	GC	GP x GC
SNP (-52)	SNP (-44)	SNP (-20)	N / (%)	N / (%)	p-valor[1]; OR; (IC95%)
A	C	G	30 (15,8)	49 (35,5)	**Referência**
G	C	G	33 (17,4)	36 (26,1)	0,247; 1,49 (0,74-3,04)
G	C	A	59 (31,1)	21 (15,2)	**0,000*;** 4,54 (2,22-9,54)
A	C	A	33 (17,4)	9 (6,5)	**0,000*;** 5,89 (2,36-16,05)
G	G	G	10 (5,3)	8 (5,8)	0,193; 2,03 (0,64-6,64)
A	G	G	1 (0,5)	8 (5,8)	0,151; 0,21 (0,004-1,67)
G	G	A	9 (4,7)	7 (5,1)	0,265; 2,08 (0,62-7,34)
A	G	A	15 (7,9)	0 (0,0)	nc

1-Teste exato de Fisher; *p-valor significativo (<0.05); nc=não calculado; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

Correlacionando os três SNPs e seus respectivos genótipos com a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica, nenhum destes genótipos apresentou diferenças significativas para as variáveis analisadas (p>0,05) (tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos genótipos dos 3 SNPs, segundo a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica.

Periodontite crônica	SNP (-52)			p-valor	SNP (-44)			p-valor	SNP (-20)			p-valor
	GG	AG	AA		CC	CG	GG		GG	AG	AA	
	n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)	
SEVERIDADE												
Leve	7(22,6)	8(16,3)	1(6,7)	0,722	10(15,4)	6(24)	-(-)	0,406	4(25)	6(14,3)	6(16,2)	0,777
Moderada	9(29)	15(30,6)	5(33,3)		19(29,2)	7(28)	3(60)		3(18,8)	14(33,3)	12(32,4)	
Severa	15(48,4)	26(53,1)	9(60)		36(55,4)	12(48)	2(40)		9(56,3)	22(52,4)	19(51,4)	
EXTENSÃO												
Localizada	7(22,6)	13(26,5)	4(26,7)	0,915	18(27,7)	6(24)	-(-)	0,209	4(25)	8(19)	12(32,4)	0,393
Generalizada	24(77,4)	36(73,5)	11(73,3)		47(72,3)	19(76)	5(100)		12(75)	34(81)	25(67,6)	
CLASSIFICAÇÃO												
Leve Localizada	5(16,1)	5(10,2)	1(6,7)	0,688	8(12,3)	3(12)	-(-)	0,615	3(18,8)	4(9,5)	4(10,8)	0,729
Leve Generalizada	2(6,5)	3(6,1)	-(-)		2(3,1)	3(12)	-(-)		1(6,3)	2(4,8)	2(5,4)	
Moderada Localizada	2(6,5)	4(8,2)	2(13,3)		6(9,2)	2(8)	-(-)		1(6,3)	2(4,8)	5(13,5)	
Moderada Generalizada	7(22,6)	11(22,4)	3(20)		13(20)	5(20)	3(60)		2(12,5)	12(28,6)	7(18,9)	
Severa Localizada	-(-)	4(8,2)	1(6,7)		4(6,2)	1(4)	-(-)		-(-)	2(4,8)	3(8,1)	
Severa Generalizada	15(48,4)	22(44,9)	8(53,3)		32(49,2)	11(44)	2(40)		9(56,3)	20(47,6)	16(43,2)	

Todos os p-valores foram do teste da razão de verossimilhança

Relacionando os genótipos da SNPs (-52), (-44) e (-20), com as variáveis PS, NIC e ISS, no grupo GP, apenas o genótipo GG apresentou resultado significativo para a variável NIC (p<0,05) (tabela 6).

Tabela 6 - Medidas de PS, NIC e ISS no grupo GP, segundo os SNPs (-52; -44; -20)

SNP	Variáveis	Genótipos	N	Média	Dp	p-valor[1]
(-52)	PS	GG	31	2,20	0,53	Referência
		AG	49	2,28	0,49	0,364
		AA	15	2,58	0,78	0,149
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	GG	31	3,68	1,88	Referência
		AG	49	3,16	1,12	0,230
		AA	15	4,37	2,48	0,392
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	GG	31	17,06	14,05	Referência
		AG	49	13,96	13,83	0,287
		AA	15	16,73	15,20	0,814
		Total	95	15,41	14,05	
(-44)	PS	CC	65	2,34	0,56	Referência
		CG	25	2,20	0,59	0,224
		GG	5	2,27	0,66	0,927
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	CC	65	3,56	1,63	Referência
		CG	25	3,17	1,90	0,069
		GG	5	4,77	0,96	0,017
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	CC	65	13,19	12,65	Referência
		CG	25	19,04	14,87	0,080
		GG	5	26,04	21,17	0,134
		Total	95	15,41	14,05	
(-20)	PS	GG	16	2,23	0,28	Referência
		AG	42	2,25	0,60	0,756
		AA	37	2,38	0,62	0,608
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	GG	16	3,40	1,06	Referência
		AG	42	3,58	2,06	0,066
		AA	37	3,50	1,49	0,824
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	GG	16	15,59	11,14	Referência
		AG	42	12,66	13,36	0,744
		AA	37	18,45	15,56	0,844
		Total	95	15,41	14,05	

1-Teste de Mann Whitney; N= número de pacientes; Dp=Desvio padrão

6 DISCUSSÃO

Este trabalho analisou a presença de polimorfismos genéticos da β-defensina-1 (-52, -44, -20) em pacientes com periodontite crônica comparado a indivíduos periodontalmente saudáveis, assim como verificou a associação entre os parâmetros periodontais (PS, NIC e IS) com a presença desses polimorfismos.

A presença de polimorfismos no gene que os codifica pode gerar peptídeos defeituosos com nenhuma ação biológica, o que favoreceria a ação dos microorganismos na geração de processos infecciosos (KELLY *et al.*, 2013; MEHLOTRA *et al.*, 2013). A literatura associando a presença de polimorfismos da β-defensina-1 com a periodontite crônica ainda é bastante escassa, demonstrando a importância deste estudo para auxiliar na elucidação de alguns aspectos genéticos na predisposição de indivíduos à doença periodontal.

Dos polimorfismos analisados no presente estudo, apenas o SNP (-20) apresentou resultado significativo, sendo a presença do alelo A mais frequente em pacientes diagnosticado com periodontite crônica e o alelo G no grupo controle. Tal achado sugere que o alelo G poderia possuir uma ação “protetota” quando comparado ao alelo A, que estaria associado à presença de periodontite crônica.

Quanto aos genótipos do SNP (-20), mostrou-se que o genótipo AA teve uma maior frequência no GP em relação ao genótipo de referência GG que foi verificado na maioria dos pacientes no GC. Diante deste panorama, os pacientes portadores de periodontite crônica apresentaram uma chance maior de apresentar o genótipo AA em relação aos pacientes periodontalmente saudáveis. Isto significa que a presença do genótipo AA no SNP (-20) pode possuir uma forte relação com a susceptibilidade de indivíduos portadores deste genótipo à periodontite crônica.

Condição semelhante também foi observada por Navarra *et al.* (2016), ao analisar a relação dos polimorfismos da β-defensina 1, dentre eles o (-52 G/A), (-44 C/G) e (-20 G/A), com o risco de desenvolver cárie em adultos do nordeste da Itália. Eles observaram uma forte associação da prevalência de cárie dentária para indivíduos com o SNP (-20). No entanto, diferentemente do presente estudo, os indivíduos homozigóticos G/G apresentaram um índice de CPOD mais elevado, sugerindo que a presença deste genótipo no SNP (-20) ser um forte indicador de susceptibilidade à cárie. Esta condição observada em ambos estudos, permite inferir que o SNP (-20) pode estar relacionado ao favorecimento da colonização

bacteriana, permitindo o desenvolvimento tanto da cárie dentária quanto da doença periodontal.

Esta hipótese é também levantada por Wang *et al.* (2015) ao analisar as relações entre β-defensinas humanas, bactérias subgingivais totais e periodontopatógenos em indivíduos saudáveis e em pacientes com periodontite crônica. Os achados indicaram que as β-defensina, especialmente a β-defensina 2, podem desempenhar um papel importante limitando o aumento da carga bacteriana na fase inicial da periodontite.

No entanto, Sarkisyan *et al.* (2016) estudando a associação de polimorfismos em genes da β-defensina 1 (-44G/C e -20A/G), com desenvolvimento de periodontite crônica generalizada em representantes da região Ural (raça caucasiana), não observaram resultados sugestivos de relação do SNP (-20 A/G) com a doença periodontal. Ao contrário dos nossos achados, os autores ainda observaram resultados significativos, para o SNP (-44G/C) sugerindo que ele seja um marcador de risco para desenvolvimento da periodontite crônica. Esta associação do SNP (-44 G/C) com a doença periodontal também foi sugerida por Cimões *et al.* (2014) avaliando polimorfismos β-defensina 1 SNP (-44 G/C) em pacientes diabéticos.

Esta mesma condição também foi verificada por Ikuta *et al.* (2015) estudando a relação entre SNPs e periodontite em japoneses. Foram recrutados pacientes com periodontite agressiva, severa, moderada e leve, e controles saudáveis, todos pareados por idade. Investigaram genótipos dos SNPs da β-defensina 1 (-52, -44 e -20) de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival. As concentrações de β-defensina 1 no fluido crevicular gengival foram significativamente menores em indivíduos com o genótipo -44 C/C, sugerindo que o mesmo pode estar associado com a susceptibilidade à periodontite crônica nessa população japonesa.

Estas diferenças nos resultados genéticos encontrados na literatura podem ser explicados primeiramente pela diferença metodológica adotada pelos estudos, mas também, principalmente, pela diferenças das características das populações investigadas, as quais apresentam perfis genéticos distintos. Além disso, vale ressaltar à dificuldade da realização de estudos populacionais no Brasil tendo em vista a miscigenação populacional a qual o país está sujeito.

Correlacionando os três SNPs e seus respectivos genótipos com a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica, neste estudo, nenhum destes genótipos apresentou resultado significativo para as variáveis analisadas, o

que leva a crer que a presença destes polimorfismos não está relacionada a severidade e extensão da doença. Também não foi possível verificar dentro do grupo GP uma forte influência dos genótipos frente às variávies clínicas PS, NIC e ISS.

Apesar dos resultados do presente estudo terem fornecido informações importantes com relação aos genes estudados, estes devem ser considerados com prudência devido à existência de algumas limitações, tais como amostragem, desenho do estudo e variabilidade genética da população brasileira.

Novos estudos abordando outros polimorfismos e outros grupos populacionais devem ser realizados a fim de estabelecer uma relação mais forte entre a presença destes SNPs em defensinas e a presença e severidade da doença periodontal, em particular, a periodontite crônica.

A importância deste estudo vem, portanto, aumentar o conhecimento a cerca das funções da β-defensina 1 na cavidade oral, na promoção da homeostase da mesma e combate a microorganismos periodontopatogênicos, para tentar auxiliar na determinação da susceptibilidade de alguns indivíduos à periodontite crônica e, futuramente, torná-la um importante marcador diagnóstico para esta doença.

7 CONCLUSÃO

Diante do nosso estudo é possível concluir que:

- Para o genótipo, apenas o SNP (-20 G/A) parece influenciar na predisposição da periodontite crônica, sendo o genótipo AA mais presente nos indivíduos com periodontite crônica;
- Quanto aos haplótipos, apenas GCA e ACA foram os mais presentes em pacientes com periodontite comparados aos periodontalmente saudáveis;
- Não foi verificada a associação da severidade e extensão da periodontite crônica com a presença dos polimorfismos (-52; -44 e -20) da β-defensina 1.

REFERÊNCIAS

Abiko, Y; Mitamura, J; Nishimura, M; Muramatsub, T; Inoue, T; Shimono, M; Kaku, T. Pattern of expression of beta-defensins in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v.143, p.37-43, 1999

Alves, RD; Godoy, GP; Figueiredo, CRLV; Pinto, LP. Mecanismos imunológicos e auto-imunidade na doença periodontal. **Revista Odonto Ciência**, v.18, n.40, p.138-142, 2003

Azuma, M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. **Journal of Periodontal Research**, v.41, p.361-373, 2006

Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-6, 1999

Armitage, GC. Periodontal infections and cardiovascular disease - how strong is the association? **Oral Diseases**, v.6, p335-50, 2000

Bello, DMA; Araújo, NC; Siqueira, RAC; Souza, PRE; Cimões, R. Comparação de critérios de diagnóstico clínico de periodontite em diabéticos. **Brazilian Journal of Periodontology**, v.26, n.3, set. 2016

Bissel, J; Joly, S; Johnson, GK; Dawson. D; McCray Jr, PB; Guthmiller, JM. Expression of β-defensisns in gingival health and in periodontal disease. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.33, p.278-285, 2004

Bogefors, J; Kvarnhammar, AM; Höckerfelt, U; Cardell, L-O. Reduced tonsillar expression of human b-defensin 1, 2 and 3 in allergic rhinitis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.65, p.431–8, 2012

Brissette, CA; Lukehart, SA. Mechanisms of Decreased Susceptibility to β-Defensins by *Treponema denticola.* **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p.2307–2315, 2007

Cagliani, R; Fumagalli, M; Riva, S; Pozzoli, U; Comi, GP; Menozzi, G; Bresolin, N; Sironi, M. The signature of long-standing balancing selection at the human defensin β-1 promoter. **Genome Biology**, v.9, n.9, R143, 2008

Christgau, M; Männer, T; Beuer, S; Hiller, K; Schmalz, G. Periodontal healing after non-surgical therapy with a modified sonic scaler: a controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.33, p.749-58, 2006

Cimões, R; Siqueira, RAC; Crovella, S; Souza, PRE; Donos, N. A Fast Method for DEFB1-44C/G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. **Acta stomatologica Croatica**, v.48, n.3, p.208-15, 2014

Corson MA, Postlethwaite KP, Seymour RA. Are dental infections a cause of brain abscess? Case report and review of the literature. **Oral Diseases**, v.7, p.61-5, 2001.

Cunnion, KM; Wagner, E; Frank, MM. Complemento e Cinina. In: Parslow TG *et al.* Imunologia médica. **Guanabara Koogan,** Rio de Janeiro, 10. ed., 684 p., 2004

Dale, BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. **Periodontology 2000**, v.30, n.1, p.70–78, October 2002

Diamond, G; Ryan, LK. Beta-defensins: what are they REALLY doing in the oral cavity? **Oral Diseases**, v.17, n.7, p.628–635, out. 2011

Dommisch, H; Chung, WO; Rohani, MG; Williams, D; Rangarajan, M; Curtis, MA; Dale, BA. Protease-activated receptor 2 mediates human beta-defensin 2 and cc chemokine ligand 20 mrna expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis.* **Infection and Immunity**, v.75, n.9, p.4326-4333, 2007

Dörk, T; Stuhrmann, M. Polymorphisms of the human b-defensin-1 gene. **Molecular Cellular Probes**, v.12, p.171–173, 1998

Fode, P; Jespersgaard, C; Hardwick, RJ; Bogle, H; Theisen, M; Dodoo, D; Lenicek, M; Vitek, L; Vieira, A; Freitas, J; Andersen, PS; Hollox, EJ. Determination of Beta-

Defensin Genomic Copy Number in Different Populations: A Comparison of Three Methods. **PLoS ONE**., v.6, n.2, e16768, fev. 2011

Flemmig, TF. Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, p.32-7, 1999

Geurs, N; Lacono, V; Krayer, J; Mealey, B; Paquette, D; Pearson, B; Rosen, P; Sabatini, R; Schweinebraten, M. American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. **Journal of Periodontology**, v.86, n.7, p.835-38, 2015

Gomes Filho, IS; Macedo, TCN; Cruz, SS; Soledade, KR; Trindade, SC; Sarmento, VA. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. **Revista Odonto Ciência** – Faculdade de Odontologia/PUCRS, v.21, n.51, jan./mar. 2006

Greer, A; Zenobia, C; Darveau, RP. Defensins and LL-37: A review of function in the gingival epithelium. **Periodontology 2000**, v.63, n.1, p.67–79, out., 2013

Griffiths, AJF; Wessler, SR; Lewontin, RC; Carroll, SB. Introdução à genética. **Guanabara Koogan**, 9°ed., 766p., 2008

Hugo, AA; Tymczyszyn, EE; Gómez-Zavaglia, A; Pérez, PF. Effect of human defensins on lactobacilli and liposomes. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p.1491-97, 2012

Ikuta, T; Inagaki, Y; Tanaka, K; Saito, T; Nakajima, Y; Bando, M; Kido, J; Nagata, T. Gene polymorphism of β-defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. **Odontology**, v.103, n.1, p.66-74, Jan. 2015

Ioannou, I; Dimitriadis, N; Papadimitriadis, N; Papadimitriou, K; Sakellari, D; Vouros, I; Konstantinidis, A. Hand instrimentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.36, p.132-41, 2009

Jung, S; Mysliwy, J; Spudy,B; Lorenzen, I; Reiss, K; Gelhaus, C; Podschun,R; Leippe, M; and Joachim Grötzinger, J. Human β-Defensin 2 and β-Defensin 3 Chimeric Peptides Reveal the Structural Basis of the Pathogen Specificity of Their Parent Molecules. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.3, p.954–60, Mar. 2011

Jurevic, RJ; Bai, M; Chadwick, RB; White, TC; Dale, BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, 2003

Jurevic, RJ; Chrisman, P; Mancl, L; Livingston, R; Dale, BA. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. **GeneticTesting**, v.6, 2002

Kelly, CJ; Glover, LE; Campbell, EL; Kominsky, DJ; Ehrentraut, SF; Bowers, BE; Bayless, AJ; Saeedi, BJ; Colgan, SP. Fundamental role for HIF-1a in constitutive expression of human b defensin-1. **Mucosal Immunology**, v.6, n.6, p.1110-1118, nov. 2013

Kruglyak, L. The use of genetic map of biallelic markers in linkage studies. **Nature Genetics**, v.17, p.21–24, 1997

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.547-558, 2000

Lindhe, J; Ranney, R; Lamster, I; Charles, A; Chung, CP; Flemmig, T; *et al*. Consensus report: chronic periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, p.38, 1999

Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader, HB, editor. **Biologia celular e molecular**, Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 255- 93p

Loo, WTY; Bai, L-J; Fan, C-B; Yue, Y; Dou, Y-D; Wang, M; Liang, H; Cheung, MNB; Chow, LWC; Li, J-L; Tian, Y; Qing, L. Clinical application of human β-defensin and CD14 gene polymorphism in evaluating the status of chronic inflammation. **Journal of Translational Medicine**, v.10, Suppl 1, S9, 2012

Mahanonda, R; Sa-Ard-Iam, N; Rerkyen, P; Thitithanyanont, A; Subbalekha, K; Pichyangkul, S. MxA expression induced by α-defensin in healthy human periodontal tissue. **European Journal of Immunology**, v.42, p.946–56, 2012.

Marshall, RI. Gingival defensins: linking the innate and adaptative imune responses dental plaque. **Periodontology 2000**, v.35, p.14-20, 2004

Mehlotra, RK; Zimmerman, PA; Weinberg, A; Jurevic, RJ. Variation in human β-defensin genes: new insights from a multipopulation study. **International Journal of Immunogenetics**, v.40, n.4, p.261–9, ago. 2013

Mombelli, A; Muhle, T; Frigg, R. Depth-force patterns of periodontal probing. Attachment-gain in relation to probing force. **Jounal of Clinical Periodontology**, v.19, p.295–300, 1992

Navarra, CO; Robino, A; Pirastu, N; Bevilacqua, L; Gasparini, P; Di Lenarda, R; Crovella S. Caries and Innate Immunity: DEFB1 Gene Polymorphisms and Caries Susceptibility in Genetic Isolates from North-Eastern Italy. **Caries Research**, v.50, n.6, p.589-94, nov. 2016

Nittayananta, W; Kemapunmanus, M; Amornthatree, K; Talungchit, S; Sriplung, H. Oral human β-defensin 2 in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.42, n.1, p.53–60, jan. 2013

Nuto, SAS; Nations, MK ; Costa, ICC. Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.681-90, mar. 2007

Oca, EPM; Villalobos, HR; Gallegos-Arreola, MP; Sandoval, L; Figuera, LE. SNPs in human β-defensin 1 gene (DEFB1): frenquencies in a Mexican population and new PCR-RFLPs assays. **International Journal of Immunogenetics**,, v.33, p.339-342, 2006

Pace, E; Ferraro, M; Minervini, M; Vitulo, P; Pipitone, L; Chiaparra, G; Siena, L; Montalbano, AM; Johnson, M; Gjomarkaj, M. Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. **Plos ONE**, v.7, q.3, e33601, mar.2012

Page, RC; Offenbacher, S; Schroeder, HE; Seymour, GJ; Kornman, KS. Advances in the pathogenesis of periodontites: Summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v.14, p.216-248, 1997

Pereira, AL; Holzhausen, M; Franco, GCN; Cortelli, SC; Cortelli, JR. Human b-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. **Archives of oral biology**, v.57, p.1609-14, 2012

Polesello, V; Zupin, L; Di Lenarda, R; Biasotto, M; Ottaviani, G; Gobbo, M; Cecco, L; Alberi, G; Pozzato, G; Crovella, S; Segat, L. Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. **Archives of oral biology**, v.60 p.1054-58, 2015

Raj, PA; Dentino, AR. Current status of defensin and their role in innate and adaptative immunity. **Microbiology Letters**, v.206, p.9-18, 2002

Salzano, MF; Bortolini, MC. The evolution an genetics fo latin american population. **Cambrige**, p.215-27, 2002.

Sarkisyan, NG; Gankovskaya, LV; Tuzankina, IA; Svitich, OA; Ron, GI; Shershnev, VN; Kolyadina, ON; Dolgikh, MA. Association of polymorphic markers in genes of innate immunity in patients with periodontitis and inflammatory diseases of upper respiratory tract. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii [journal].**, n.1, p.67-71, jan-fev, 2016

Scannapieco FA and members of the Comittee of American Academy of Periodontology. Periodontal Disease as a Potential risk factor for systemic diseases. **Journal of Periodontology**, v.69, p.841- 50,1998.

Schmidtchen A. The Multiple Faces of Host Defence Peptides and Proteins. **Journal of Innate Immunity**, v.4, p.325–6, mai.2012

Semple, F; Dorin, JR. β -Defensins: Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More? **Journal of Innate Immunity**, v.4, p.337–48, 2012

Van Hemert, JR; Recker, EN; Dietrich, D; Progulske-Fox, A; Kurago, ZB; Walters, KS; Cavanaugh, JE; Brogden, KA. Human β-defensin-3 alters, but does not inhibit, the binding of *Porphyromonas gingivalis* haemagglutinin B to the surface of human dendritic cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.40, n.1, p.75–9, jul.2012

Vieira, TR; Péret, ACA; Péret Filho, LA. Alterações periodontais associadas às doenças sistêmicas em crianças e adolescentes. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.2, p.237-43, 2010

Wang, P; Duan, D; Zhou, X; Li, X; Yang, J; Deng, M; Xu, Y. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. **Journal of Periodontal Research.**, v.50, n.1, p.113-22, fev. 2015

Wiebe, CB; Putnins, EE. The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology — An Update. **Journal of the Canadian Dental Association**, V. 66, n. 11, p.594-97, dez. 2000

Wu, X; Remy Mimms, R; Lima, R; Peters-Hall, J; Rose, MC; Peña, MT. Localization of Inflammatory Mediators in Pediatric Sinus Mucosa. **Archives Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.138, n.4, p.389–97, abr.2012

Zina, LG; Moimaz, SAS; Saliba, NA; Garbin, CAS. Periodontite materna e parto prematuro: aspectos biológicos, epidemiológicos e preventivos. **Periodontia**, v.15, p.10-15, 2005

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E CIRURGIA BUCO-FACIAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa"**ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE CRÔNICA COM A QUALIDADE DE VIDA, A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**"que está sob a responsabilidade da pesquisadora Renata Cimões Jovino Silveira (Professora da Pós-Graduação em odontologia da UFPE); Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da UFPE – Avenida Professor Moraes Rego, 1235 – Recife – PE, CEP: 50670-901; telefone: (81)21268817; e-mail: renata.cimoes@globo.com Telefone para contato: 21268817.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o (a) senhor (a) não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte a pessoa que está lhe entrevistando, para que o (a) senhor (a) seja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a associação entre a periodontite crônica, a deficiência da vitamina D e a presença de alterações genéticas que estão ligadas ao sistema de defesa do nosso corpo em pacientes diabéticos tipo 2, bem como a percepção de qualidade de vida dos mesmos. Será avaliado através de um exame clínico, onde serão coletados os índices de placa bacteriana, de sangramento, profundidade de sondagem e perda de inserção óssea. Posteriormente, serão coletadas amostras de saliva e de células da mucosa da boca (esfregando levemente a parte interna da bochecha com uma escova. Os pacientes também responderão a um questionário para avaliação da percepção de qualidade de vida.

Para realização da pesquisa o paciente será examinado uma única vez; nesse momento serão também coletadas as amostras, os dados pessoais e a aplicação do questionário.

Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de, durante o exame clínico, ficar constrangido, ocorrer sangramento gengival e desconforto, esses sintomas serão minimizados com a realização do exame em local reservado e por profissional qualificado.

Entre os benefícios, os participantes receberão orientações de higiene oral e informações de como tratar a doença gengival presente e prevenir seu avanço. Receberão também orientações de como e onde procurar serviços de odontologia.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital Agamenon Magalhães no endereço: Estrada do Arraial, 2723 - Casa Amarela, Recife - PE, CEP: 52070-230 (2º andar do Prédio do Laboratório) ou pelo telefone: (81) 30480117 e o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS no endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS - Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50.740-600 ou pelo telefone (81)2126-8588.

_____

(Pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo"**ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE CRÔNICA COM A QUALIDADE DE VIDA, A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**", como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre o desenvolvimentoda pesquisa, os procedimentos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

QUESTIONÁRIO SÓCIODEMOGRÁFICO - FICHA CLÍNICA

Nº do paciente: _____Prontuário:_____

1. Nome: _____
2. Nacionalidade:_____
3. Sexo:_____
4. Idade:_____
5. Estado civil:_____
6. Fone: _____cel: _____
7. Renda (salários): _____
8. Hábito de fumar:
   ( ) nunca fumou
   ( ) ex-fumante: _____(anos que parou)
   ( ) fumante: _____(quantos por dia)

9. Escolaridade:
   I. ( ) Não sabe ler ou escrever
   II. ( )1º grau incompleto
   III. ( ) 1º grau completo
   IV. ( ) 2º grau incompleto
   V. ( ) 2º grau completo
   VI. ( )Universidade incompleta
   VII. ( )Universidade completa
   VIII. ( )Pós-graduação
   IX. ( ) Não sei

10. Medicamentos que utiliza:
    _____
    _____

APÊNDICE C

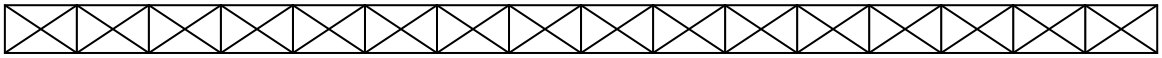
FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____ DATA:_____

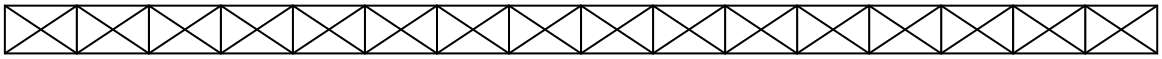
Dente	Sondagem (mm)						Recessão Gengival (mm)						Furca			Mob
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina						
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	D	P	
18																
17																
16																
15																
14																
13																
12																
11																
21																
22																
23																
24																
25																
26																
27																
28																
38																
37																
36																
35																
34																
33																
32																
31																
41																
42																
43																
44																
45																
46																

47																
48																

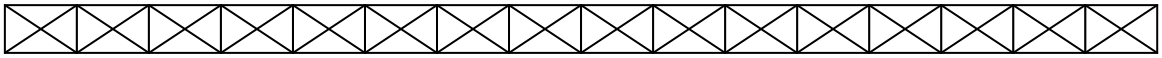
SANGRAMENTO: Faces_____ %_____



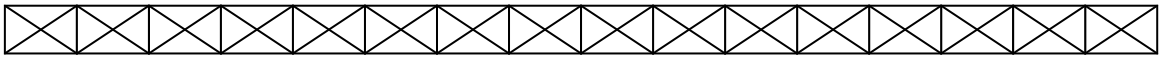
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



PLACA: Faces_____%_____



18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



Associação dos polimorfismos da β-defensina 1 (-52; -44; -20) com a periodontite crônica

Felipe Rodrigues de Almeida; Renata Cimões; Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Prótese e Cirurgia Bucofacial, Curso de Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondência do Autor: Felipe Rodrigues de Almeida - Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – Recife – PE, Brasil, 50670-901. Email: almeidabiomed@gmail.com

Telefone: +55 8121268817

RESUMO

Variações genéticas do gene que codifica as β-defensinas podem influenciar a susceptibilidade à periodontite crônica. Este estudo teve como objetivo, verificar a associação de polimorfismos genéticos da β-defensina 1 (-52; -44; -20) em pacientes portadores de periodontite crônica em comparação com pacientes considerados periodontalmente saudáveis. Nesta análise clínico-laboratorial participaram 164 pacientes divididos em 02 grupos: portadores de periodontite crônica (GP=95) e periodontalmente saudáveis (GC=69). As coletas se deram nas clínicas integrais do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco e nos ambulatórios do Hospital Agamenon Magalhães, no período de novembro de 2015 à outubro de 2016. Atendidos aos critérios de elegibilidade, foram coletados dados sóciodemográficos e os pacientes foram submetidos a exame clínico com preenchimento de periograma, para obtenção de parâmetros periodontais de profunidade de sondagem, nível de inserção clínica e índice de sangramento à sondagem, e coletadas amostras de saliva total espontânea, as quais foram posteriormente submetidas ao isolamento e purificação do DNA e genotipagem por PCR em tempo real para verificação da presença de polimorfismos de única base da β-defensina 1(-52; -44; -20). O nível de significância adotado foi de 5% e intervalo de confiança de 95%. Ambos polimorfismos da β-defensina 1 (-52, -44 e -20) foram observados em pacientes com periodontite crônica, contudo, apenas o SNP (-20) apresentou diferença significativa entre os grupos GP e GC ($p<0,05$). O alelo A apresentou-se em mais da metade do GP ($p<0,000$) e o genótipo AA foi o mais frequente neste grupo ($p<0,000$). Verificou-se que a razão de chances de um paciente com periodontite crônica apresentar o genótipo AA foi

14,15 vezes maior do que em indivíduos periodontalmente saudáveis. Quanto à freqüência haplotípica, a maior freqüência foi de GCA (p<0,000), seguido de ACA no grupo GP (p<0,000). Não foi possível verificar associação da severidade e extensão da periodontite crônica com a presença dos polimorfismos estudados da β-defensina 1. Diante do nosso estudo foi possível concluir que o SNP (-20 G/A) parece influenciar na predisposição da periodontite crônica, sendo o genótipo AA mais presente nos indivíduos com periodontite crônica, assim como os haplótipos GCA e ACA. No entanto, a severidade e extensão da periodontite crônica parece não ter influência com a presença dos polimorfismos da β-defensina 1 estudados.

Palavras-Chaves: Doença periodontal. Periodontite crônica. Polimorfismo de nucleotídeo único. Beta-defensinas.

ABSTRACT

Genetic variations of the gene that encoding β-defensins may influence the susceptibility to chronic periodontitis. This study aimed to verify the association of genetic polymorphisms of β-defensin 1 (-52; -44; -20) in patients with chronic periodontitis compared to patients considered periodontally healthy. In this clinical-laboratorial analysis, 164 patients were divided into 02 groups: patients with chronic periodontitis (PG = 95) and periodontally healthy (CG = 69). The collections were given at the dental clinics of the Federal University of Pernambuco and in the outpatient clinics of Agamenon Magalhães Hospital, from november 2015 to october 2016. According to the eligibility criteria, socio-demographic data were collected and the patients were submitted a clinical examination with periogram filling, to obtain periodontal parameters of probing depth, clinical insertion level and bleeding index to the probing, and samples of spontaneous total saliva were collected, which were later submitted to DNA isolation and purification and genotyping by real-time PCR to verify the presence of single-base polymorphisms (-52; -44; -20) of β-defensin 1. The significance level was 5% and 95% confidence interval. Both polymorphisms of β-defensin 1 (-52, -44 and -20) were observed in patients with chronic periodontitis, however, only the SNP (-20) presented a significant difference between the PG and CG groups (p <0.05). The A allele was present in more than half of the PG (p <0.000) and the AA genotype was the most frequent in this group (p <0.000). It was verified that the odds ratio of a patient with chronic periodontitis presenting the AA genotype was 14.15 times higher than in periodontally healthy subjects. As to the haplotype frequency, the highest frequency was GCA (p <0.000), followed by ACA in the PG group (p <0.000). It was not possible to verify the association of the severity and extent of

chronic periodontitis with the presence of polymorphisms studied in β-defensin 1. In our study, it was possible to conclude that the SNP (-20 G/A) seems to influence the predisposition of chronic periodontitis, with the AA genotype being more present in individuals with chronic periodontitis, as well as the GCA and ACA haplotypes. However, the severity and extent of chronic periodontitis does not seem to influence the presence of β-defensin 1 polymorphisms studied.

Key words: Periodontal disease. Chronic periodontitis. Single nucleotide polymorphism. Beta-defensins.

Introdução

A periodontite crônica constitui-se de um processo inflamatório infeccioso progressivo, de etiologia multifatorial, que acomete os tecidos de proteção e suporte do dente, ocasionando uma destruição irreversível de forma aleatória e em sítios específicos. É caracterizada clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsas periodontais) e perda de inserção clínica. As características variáveis incluem hiperplasia ou recessão gengival, exposição da furca, mobilidade, inclinações dentárias aumentadas e esfoliação dos dentes se não controlada (NUTO, NATIONS, COSTA, 2007).

A presença de micro-organismos no biofilme dentário é necessária, mas não é suficiente para o desenvolvimento de periodontite. A severidade da periodontite está relacionada à má higiene bucal, à susceptibilidade genética do hospedeiro, e ainda a fatores de risco ambiental e adquirido, tais como fumo, estresse, idade avançada, alterações hormonais e doenças sistêmicas, como por exemplo, doenças imunologicamente mediadas e diabetes mellitus. Além disso, o aspecto clínico da doença é determinado pela resposta do hospedeiro frente ao estímulo bacteriano (PAGE *et al.*, 1997; IKUTA *et al.*, 2015).

Essa resposta do organismo do hospedeiro aos micro-organismos pode ser tanto protetora, no que diz respeito à produção de moléculas que teriam a capacidade de combater estes micro-organismos; quanto destrutiva, quando o sistema imunológico é ativado de forma exacerbada causando danos aos tecidos próprios do organismo; ou ambas. A ativação da resposta imune permite a eliminação dos antígenos bacterianos, promovendo assim a resolução do processo inflamatório e infeccioso. Este mesmo sistema imunológico é organizado em termos de células e moléculas que têm papéis especializados para defender-se contra infecções (ALVES *et al.*, 2003; AZUMA, 2006).

Diante da perspectiva da resposta do organismo mediado pelo sistema imune e possível susceptibilidade orgânica do hospedeiro a certas condições infecciosas, como a periodontite crônica, surge uma família de peptídeos antimicrobianos que podem ser produzidas por diversas células e tecidos do organismo, as β-defensinas, as quais apresentam amplo espectro de ação com atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, espécies de fungos e vírus. Além desta atividade antimicrobiana, estas β-defensinas apresentam ações que providenciam a ligação entre as respostas imune inata e adaptativa, agindo como fator quimiotático das células dendríticas e células T memória (BISSEL *et al.*, 2004; OCA *et al.*, 2006; DIAMOND, RYAN, 2011; SEMPLE, DORIN, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013).

As β-defensinas são reguladas em resposta ao estímulo inflamatório, e podem ser encontradas tanto na saliva quanto no fluido crevicular, sendo expressas pelo epitélio oral, língua e glândulas salivares. Acredita-se, ainda, que as mesmas possam estar envolvidas na manutenção da homeostase na cavidade oral (DIAMOND, RYAN, 2011; LOO *et al*., 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; VAN HEMERT *et al.*, 2012; GREER, ZENOBIA, DARVEAU, 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013).

Supõe-se que as variações do gene que codifica as β-defensinas possam influenciar a susceptibilidade a certas infecções, tais como a periodontite, (DÖRK; STUHRMANN, 1998); infecções de vias aéreas superiores e inferiores, (BOGERFORS *et al.*, 2012; PACE *et al.*, 2012); susceptibilidade ao HIV, assim como, progressão e severidade da doença AIDS (MEHLOTRA *et al.*, 2013; NITTAYANANTA *et al.*, 2013); carcinomas, inclusive o oral (DIAMOND, RYAN, 2011); e doenças gastrointestinais (KELLY *et al.*, 2013).

Pesquisas sobre alterações genéticas do tipo polimorfismo de única base (SNP), que são variações na sequência de DNA que podem provocar alterações no produto protéico do gene levando à produção de proteínas defeituosas (LODISH *et al*., 2002), têm sido pouco desenvolvida por grupos de pesquisa em Odontologia no Brasil e no mundo. O estudo dos polimorfismos das β-defensinas em pacientes com periodontite crônica pode conseguir uma maior elucidação da susceptibilidade de certos indivíduos à doença periodontal diante da presença de variações genéticas.

Diante disso, o presente estudo teve por objetivo verificar a presença de polimorfismos genéticos da β-defensina 1 (-52, -44, -20) em pacientes com periodontite crônica em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis.

Materiais e Métodos

Considerações éticas

Este estudo trata-se de uma análise clínico-laboratorial, tendo seguido as normas 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa em humanos, obtendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), parecer n° 1.368.830, e da Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde / CCS-UFPE, parecer n° 1.310.208.

Todos os pacientes foram devidamente informados sobre o teor científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos. Após explicação dos objetivos da pesquisa e aceite em participar do exame clínico e coleta das amostras, todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Desenho e localização do estudo

As etapas de entrevista, exames clínicos e coleta de amostras de saliva total espontânea ocorreram nas clínicas integrais odontológicas da UFPE e no Hospital Agamenon Magalhães (HAM)/Recife- PE, no período de de novembro de 2015 à outubro de 2016. As amostras foram armazenadas em freezer a – 20°C no laboratório de biologia molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE. As análises laboratoriais aconteceram no laboratório de biologia molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e no laboratório de imunoensaio Keiso Asami – LIKA/UFPE.

População alvo e seleção da amostra

Os pacientes foram recrutados de acordo com a procura ao serviço, e selecionados após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão adotados (quadro 01). Os pacientes que puderam participar do estudo responderam ao questionário sóciodemográfico e foram examinados clinicamente.

A amostra foi do tipo conveniência, não probabilística e aleatória dividida em 2 grupos: grupo caso (GP) - formado por pacientes diagnosticados com periodontite crônica, e grupo controle (GC) - por pacientes considerados periodontalmente saudáveis.

Como parâmetros utilizados para diagnóstico de periodontite crônica, foram considerados presença de profundidade de sondagem > 3 mm, presença de sangramento à sondagem e perda de inserção clínica ≥ 1 mm. Os parâmetros adotados levaram em consideração algumas diretrizes adotadas pela Academia Americana de Periodontologia para diagnóstico clínico e classificação da periodontite (quadro 2). Já os pacientes foram

considerados periodontalmente saudáveis quando possuíam profundidade de sondagem ≤ 3 mm e perda de inserção clínica <1mm (ARMITAGE, 1999; GEURS et al., 2015).

A severidade e extensão da periodontite crônica foram classificadas de acordo com os parâmetros adotados pelo sistema de classificação da doença periodontal de acordo com a Academia Americana de Periodontologia. Quanto à extensão, a periodontite crônica foi classificada como localizada ou generalizada a depender se < 30% ou > 30% dos sítios estão envolvidos. A severidade é baseada na perda de inserção clínica (PIC) e é designada como leve (1-2 mm PIC), moderada (3-4 mm PIC) ou severa (> 5 mm PIC) (WIEBE, PUTNINS, 2000).

Critérios de Inclusão	**Critérios de Exclusão**
Idade: ≥ 35 anos	Realizado tratamento periodontal nos últimos 06 meses
Dentes naturais: ≥ 08 dentes *Excluindo-se os 3° molares e dentes indicados para exodontia.	Uso de antibióticos nos últimos 06 meses e Uso de anti-inflamatórios de forma crônica
Grupo Periodontite (GP): diagnóstico clínico de periodontite crônica	Uso de aparelho ortodôntico
Grupo Controle (GC): periodontalmente saudáveis	Presença de condição sistêmica que possa interferir no curso da doença periodontal: diabetes ou doenças imunologicamente mediadas
Aceitar participar do estudo	Gestantes; Lactantes

Quadro 01 Critérios de inclusão e exclusão adotados

Parâmetros	Leve	Moderada	Severa
Profundidade de sondagem	>3 e < 5 mm	≥5 e <7 mm	≥ 7 mm
Sangramento à sondagem	Sim	Sim	Sim
Perda óssea radiográfica	Até 15% do comprimento da raiz ou ≥ 2 mm e ≤ 3 mm	16% a 30% ou >3 mm e ≤ 5 mm	>30% ou >5 mm
Perda de inserção clínica	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm

Quadro 2: Diretrizes para determinação da severidade da periodontite (GEURS *et al.*, 2015).

Questionário e exame clínico

Os pacientes participantes responderam a um questionário sóciodemográfico, para obtenção de dados como: idade, sexo, renda, escolaridade, estado civil, hábito de fumar e medicamentos em uso. Em seguida, os mesmos foram submetidos ao exame clínico, realizado por 03 examinadores previamente calibrados, e 03 anotadores. O valor de kappa inter-examinadores foi de 0,512. Para cada paciente foi preenchido um periograma, no qual foram coletados dados sobre profundidade de sondagem (PS), a qual corresponde à distância entre a margem gengival e a porção mais coronal do epitélio juncional (fundo de sulco/bolsa); índice de sangramento à sondagem (ISS), verificada pela presença ou ausência de sangramento durante a sondagem; e nível de inserção clínica (NIC), que corresponde ao somatório da distância entre a junção amelocementária e a margem gengival e da margem gengival até a porção mais coronal do epitélio juncional (fundo de sulco/bolsa).

Para cada dente foram sondados seis sítios: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual. O exame clínico foi realizado com luz artificial, proveniente de fotóforo a pilha (quando não possível examinar o paciente em cadeira odontológica) ou foco luminoso da cadeira odontológica e utilizados os seguintes instrumentos: odontoscópio e sonda periodontal milimetrada tipo Universidade Carolina do Norte, marca Trinity®.

Coleta, armazenamento e processamento das amostras

Após o exame clínico, foram realizadas as coleta de saliva total espontânea utilizando-se tubos tipo Falcon estéreis, sendo o paciente orientado a depositar no mínimo 1ml de saliva no respectivo tubo. As amostras coletadas foram armazenadas em freezer a –

20° C no laboratório de biologia molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, para isolamento e purificação do DNA.

Para isolamento e purificação do DNA foi utilizado o kit da PROMEGA Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as especificações do fabricante. Após esse processo, o material obtido foi novamente armazenado a -20ºC até processamento por reação em cadeia da polimerase em tempo real.

As análises genéticas para pesquisa dos polimorfismos da β-defensina 1 foram realizadas no laboratório de imunoensaio Keiso Asami – UFPE, de acordo com a metodologia utilizada para a genotipagem proposta por Polesello *et al.* (2015).

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) com auxílio de termociclador. A sequência do processamento foi: amplificação do DNA, hibridização com primers de oligonucleotídeos e análise das porções amplificadas por eletroforese. Todo o processamento e análise dos polimorfismos foram realizados baseados no protocolo proposto por Jurevic *et al.* (2003) e Polesello *et al.* (2015).

As amostras foram genotipadas para os SNPs -52G/A (rs1799946), -44C/G (rs1800972), -20G/A (rs11362), por sequenciamento direto de polimorfismos utilizando sondas alelo específicas (Sistema TaqMan®). O equipamento utilizado para as reações foi o termociclador ABI 7500 (AppliedBiosystems®).

Para amplificação do DNA das amostras, um volume total de 5 µl foi utilizado, contendo aproximadamente 1µl de DNA molde por reação (com concentração de 25ng/µl) mais 1,25µl de água, 2,5µl do TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems®) e 0,25µl das sondas.

O ciclo foi realizado com uma desnaturação inicial durante 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 20 seg, à temperatura de anelamento de 55°C durante 30 seg e 72°C durante 30 seg com uma extensão final para 72°C durante 7 min.

O sucesso da amplificação do DNA e a ausência de produtos de reação não específica foram verificados por meio de corrida eletroforética de amplicons em gel de agarose a 2%.

Análise Estatística

Os dados de PS, NIC, ISS foram categorizados e aplicados o teste de Mann Whitney. As associações entre a severidade/extensão da periodontite crônica e os genótipos dos SNPs da β-defensina 1 (-52, -44, -20) foram feitas através do teste de independência da razão de verossimilhança.

Para verificar a distribuição das freqüências alotípicas, genotípicas e haplotípicas foi aplicado o teste exato de Fisher.

O nível de significância adotado foi de 5%, e intervalo de confiança de 95%. Os dados foram digitados no programa Microsoft Excel e o software utilizado para as análises estatísticas foi o IBM® SPSS 20.0, versão trial.

Resultados

Participaram do estudo 164 pacientes, dos quais 95 (57,9%) pertenciam ao grupo de pacientes com periodontite crônica (GP), com média de idade de 53,0 ± 9,6 anos e 69 (42,1%) ao grupo controle (GC), com idade média de 49,6 ± 10,7 anos. O sexo feminino representou a maioria dos participantes nos dois grupos, com 80,0% e 91,3% nos grupos GP e GC, respectivamente.

Parâmetros periodontais

A média do índice de sangramento à sondagem (ISS) foi de 15,4 ± 14,0 % e 5,1± 6,7%, a média de profundidade de sondagem (PS) foi de 2,3 ± 0,6 mm e 1,9 ± 0,3 mm e média do nível de inserção clínica (NIC) de 3,5 ± 1,7 mm e 2,1 ± 0,4 mm para os grupos GP e GC, respectivamente, apresentando diferenças significativas para todas as essas variáveis ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Medidas das variáveis PS, NIC e ISS em relação aos grupos GP e GC

Variável	Grupo	N	Média	dp	p-valor[1]
PS	GP	95	2,3	0,6	0,000
	GC	69	1,9	0,3	
NIC	GP	95	3,5	1,7	0,000
	GC	69	2,1	0,4	
ISS	GP	95	15,4	14,0	0,000
	GC	69	5,1	6,7	

1- Teste de Mann Whitney; dp = Desvio padrão; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

Análise alotípica, genotípica e haplotípica segundo os SNPs

Relacionando à distribuição dos alelos e genótipos de cada polimorfismo, entre os grupos GP e GC, apenas o SNP (-20) apresentou diferença significativas, sendo o alelo A observado em 61,0% dos pacientes do GP e o alelo G em 73,1% nos pacientes do GC. O genótipo AA foi observado em 38,9% no GP, enquanto que o genótipo de referência GG foi verificado em 55,1% dos pacientes no GC. Os pacientes do GP apresentaram uma chance de 14,15 vezes de apresentar o genótipo AA em relação aos pacientes do GC (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos alelos e genótipos (SNPs: -20, -44 e -52) nos grupos GP e GC.

SNPs/ Alelos/ Genótipos	**GP N / (%)**	**GC N / (%)**	**GP x GC p-valor[1]; OR (IC95%)**
SNP (-52)			
G	111 (58,4)	72 (52,2)	Referência
A	79 (41,6)	66 (47,8)	0,311; 0,78 (0,49-1,24)
GG	31 (32,6)	22 (31,9)	Referência
AG	49 (51,6)	28 (40,6)	0,586; 1,24 (0,57-2,70)
AA	15 (15,8)	19 (27,5)	0,271; 0,56 (0,21-1,46)
SNP (-44)		#	
C	155 (81,6)	115 (83,3)	Referência
G	35 (18,4)	23 (16,7)	0,770; 1,13 (0,61-2,12)
CC	65 (68,4)	51 (73,9)	Referência
CG	25 (26,3)	13 (18,8)	0,345; 1,50 (0,66-3,54)
GG	5 (5,3)	5 (7,2)	0,750; 0,79 (0,17-3,62)
SNP (-20)			
G	74 (39,0)	101 (73,1)	Referência
A	116 (61,0)	37 (26,8)	**0,000*;** 4,26 (2,59-7,10)
GG	16 (16,8)	38 (55,1)	Referência
AG	42 (44,2)	25 (36,2)	**0,0004*;** 3,94 (1,74-9,26)
AA	37 (38,9)	6 (8,7)	**0,000*;** 14,15 (4,74-49,48)

1 – Teste exato de Fisher; *p-valor significativo (<0.05); # Fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

Analisando a freqüência haplotípica dos SNPs entre os grupos GP e GC, a maior freqüência para haplótipos observada foi GCA (31,1%) no grupo GP, seguido de ACA (17,4%), diferindo estatisticamente em relação ao GC (p=0,000). A chance de um paciente com periodontite crônica apresentar o haplótipo GCA é de 4,54 vezes em relação a um paciente periodontalmente saudável. Esta probabilidade é aumentada para 5,89 vezes quando o alelo G deste haplótipo é trocado por um alelo A na posição do SNP (–52) (tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das frequências haplotípicas entre os grupos GP e GC

Haplótipos			**GP**	**GC**	**GP x GC**
SNP (-52)	**SNP (-44)**	**SNP (-20)**	**N / (%)**	**N / (%)**	**p-valor[1]; OR; (IC95%)**
A	C	G	30 (15,8)	49 (35,5)	**Referência**
G	C	G	33 (17,4)	36 (26,1)	0,247; 1,49 (0,74-3,04)
G	C	A	59 (31,1)	21 (15,2)	0,000*; 4,54 (2,22-9,54)
A	C	A	33 (17,4)	9 (6,5)	0,000*; 5,89 (2,36-16,05)
G	G	G	10 (5,3)	8 (5,8)	0,193; 2,03 (0,64-6,64)
A	G	G	1 (0,5)	8 (5,8)	0,151; 0,21 (0,004-1,67)
G	G	A	9 (4,7)	7 (5,1)	0,265; 2,08 (0,62-7,34)
A	G	A	15 (7,9)	0 (0,0)	nc

1-Teste exato de Fisher; *p-valor significativo (<0.05); nc=não calculado; GP= grupo periodontite crônica; GC = grupo controle

Correlacionando os três SNPs e seus respectivos genótipos com a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica, nenhum destes genótipos apresentou diferenças significativas para as variáveis analisadas (p>0,05) (tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos genótipos dos 3 SNPs, segundo a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica.

Periodontite crônica	SNP (-52)			p-valor	SNP (-44)			p-valor	SNP (-20)			p-valor
	GG	AG	AA		CC	CG	GG		GG	AG	AA	
	n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)	
SEVERIDADE												
Leve	7(22,6)	8(16,3)	1(6,7)	0,722	10(15,4)	6(24)	-(-)	0,406	4(25)	6(14,3)	6(16,2)	0,777
Moderada	9(29)	15(30,6)	5(33,3)		19(29,2)	7(28)	3(60)		3(18,8)	14(33,3)	12(32,4)	
Severa	15(48,4)	26(53,1)	9(60)		36(55,4)	12(48)	2(40)		9(56,3)	22(52,4)	19(51,4)	
EXTENSÃO												
Localizada	7(22,6)	13(26,5)	4(26,7)	0,915	18(27,7)	6(24)	-(-)	0,209	4(25)	8(19)	12(32,4)	0,393
Generalizada	24(77,4)	36(73,5)	11(73,3)		47(72,3)	19(76)	5(100)		12(75)	34(81)	25(67,6)	
CLASSIFICAÇÃO												
Leve Localizada	5(16,1)	5(10,2)	1(6,7)	0,688	8(12,3)	3(12)	-(-)	0,615	3(18,8)	4(9,5)	4(10,8)	0,729
Leve Generalizada	2(6,5)	3(6,1)	-(-)		2(3,1)	3(12)	-(-)		1(6,3)	2(4,8)	2(5,4)	
Moderada Localizada	2(6,5)	4(8,2)	2(13,3)		6(9,2)	2(8)	-(-)		1(6,3)	2(4,8)	5(13,5)	
Moderada Generalizada	7(22,6)	11(22,4)	3(20)		13(20)	5(20)	3(60)		2(12,5)	12(28,6)	7(18,9)	
Severa Localizada	-(-)	4(8,2)	1(6,7)		4(6,2)	1(4)	-(-)		-(-)	2(4,8)	3(8,1)	
Severa Generalizada	15(48,4)	22(44,9)	8(53,3)		32(49,2)	11(44)	2(40)		9(56,3)	20(47,6)	16(43,2)	

Todos os p-valores foram do teste da razão de verossimilhança

Relacionando os genótipos dos SNPs (-52), (-44) e (-20), com as variáveis PS, NIC e ISS, no GP, apenas o genótipo GG apresentou resultado significativo para a variável NIC (p<0,05) (tabela 5).

Tabela 5 - Medidas de PS, NIC e ISS no grupo GP, segundo os SNPs (-52; -44; -20)

SNP	Variáveis	Genótipos	N	Média	Dp	p-valor[1]
(-52)	PS	GG	31	2,20	0,53	Referência
		AG	49	2,28	0,49	0,364
		AA	15	2,58	0,78	0,149
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	GG	31	3,68	1,88	Referência
		AG	49	3,16	1,12	0,230
		AA	15	4,37	2,48	0,392
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	GG	31	17,06	14,05	Referência
		AG	49	13,96	13,83	0,287
		AA	15	16,73	15,20	0,814
		Total	95	15,41	14,05	
(-44)	PS	CC	65	2,34	0,56	Referência
		CG	25	2,20	0,59	0,224
		GG	5	2,27	0,66	0,927
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	CC	65	3,56	1,63	Referência
		CG	25	3,17	1,90	0,069
		GG	5	4,77	0,96	0,017
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	CC	65	13,19	12,65	Referência
		CG	25	19,04	14,87	0,080
		GG	5	26,04	21,17	0,134
		Total	95	15,41	14,05	
(-20)	PS	GG	16	2,23	0,28	Referência
		AG	42	2,25	0,60	0,756
		AA	37	2,38	0,62	0,608
		Total	95	2,30	0,57	
	NIC	GG	16	3,40	1,06	Referência
		AG	42	3,58	2,06	0,066
		AA	37	3,50	1,49	0,824
		Total	95	3,52	1,70	
	ISS	GG	16	15,59	11,14	Referência
		AG	42	12,66	13,36	0,744
		AA	37	18,45	15,56	0,844
		Total	95	15,41	14,05	

1-Teste de Mann Whitney; N= número de pacientes; Dp=Desvio padrão

Discussão

Este trabalho analisou a presença de polimorfismos genéticos da β-defensina-1 (-52, -44, -20) em pacientes com periodontite crônica comparado a indivíduos periodontalmente saudáveis, assim como verificou a associação entre os parâmetros periodontais (PS, NIC e IS) com a presença desses polimorfismos.

A presença de polimorfismos no gene que os codifica pode gerar peptídeos defeituosos com nenhuma ação biológica, o que favoreceria a ação dos microorganismos na geração de processos infecciosos (KELLY *et al.*, 2013; MEHLOTRA *et al.*, 2013). A literatura associando a presença de polimorfismos da β-defensina-1 com a periodontite crônica ainda é bastante escassa, demonstrando a importância deste estudo para auxiliar na elucidação de alguns aspectos genéticos na predisposição de indivíduos à doença periodontal.

Dos polimorfismos analisados no presente estudo, apenas o SNP (-20) apresentou resultado significativo, sendo a presença do alelo A mais frequente em pacientes diagnosticado com periodontite crônica e o alelo G no grupo controle. Tal achado sugere que o alelo G poderia possuir uma ação "protetota" quando comparado ao alelo A, que estaria associado à presença de periodontite crônica.

Quanto aos genótipos do SNP (-20), mostrou-se que o genótipo AA teve uma maior frequência no GP em relação ao genótipo de referência GG que foi verificado na maioria dos pacientes no GC. Diante deste panorama, os pacientes portadores de periodontite crônica apresentaram uma chance maior de apresentar o genótipo AA em relação aos pacientes periodontalmente saudáveis. Isto significa que a presença do genótipo AA no SNP (-20) pode possuir uma forte relação com a susceptibilidade de indivíduos portadores deste genótipo à periodontite crônica.

Condição semelhante também foi observada por Navarra *et al.* (2016), ao analisar a relação dos polimorfismos da β-defensina 1, dentre eles o (-52 G/A), (-44 C/G) e (-20 G/A), com o risco de desenvolver cárie em adultos do nordeste da Itália. Eles observaram uma forte associação da prevalência de cárie dentária para indivíduos com o SNP (-20). No entanto, diferentemente do presente estudo, os indivíduos homozigóticos G/G apresentaram um índice de CPOD mais elevado, sugerindo que a presença deste genótipo no SNP (-20) ser um forte indicador de susceptibilidade à cárie. Esta condição observada em ambos estudos, permite inferir que o SNP (-20) pode estar relacionado ao favorecimento da colonização bacteriana, permitindo o desenvolvimento tanto da cárie dentária quanto da doença periodontal.

Esta hipótese é também levantada por Wang *et al.* (2015) ao analisar as relações entre β-defensinas humanas, bactérias subgingivais totais e periodontopatógenos em indivíduos

saudáveis e em pacientes com periodontite crônica. Os achados indicaram que as β-defensina, especialmente a β-defensina 2, podem desempenhar um papel importante limitando o aumento da carga bacteriana na fase inicial da periodontite.

No entanto, Sarkisyan *et al.* (2016) estudando a associação de polimorfismos em genes da β-defensina 1 (-44G/C e -20A/G), com desenvolvimento de periodontite crônica generalizada em representantes da região Ural (raça caucasiana), não observaram resultados sugestivos de relação do SNP (-20 A/G) com a doença periodontal. Ao contrário dos nossos achados, os autores ainda observaram resultados significativos, para o SNP (-44G/C) sugerindo que ele seja um marcador de risco para desenvolvimento da periodontite crônica. Esta associação do SNP (-44 G/C) com a doença periodontal também foi sugerida por Cimões *et al.* (2014) avaliando polimorfismos β-defensina 1 SNP (-44 G/C) em pacientes diabéticos.

Esta mesma condição também foi verificada por Ikuta *et al.* (2015) estudando a relação entre SNPs e periodontite em japoneses. Foram recrutados pacientes com periodontite agressiva, severa, moderada e leve, e controles saudáveis, todos pareados por idade. Investigaram genótipos dos SNPs da β-defensina 1 (-52, -44 e -20) de peptídeos antimicrobianos no fluido crevicular gengival. As concentrações de β-defensina 1 no fluido crevicular gengival foram significativamente menores em indivíduos com o genótipo -44 C/C, sugerindo que o mesmo pode estar associado com a susceptibilidade à periodontite crônica nessa população japonesa.

Estas diferenças nos resultados genéticos encontrados na literatura podem ser explicados primeiramente pela diferença metodológica adotada pelos estudos, mas também, principalmente, pela diferenças das características das populações investigadas, as quais apresentam perfis genéticos distintos. Além disso, vale ressaltar à dificuldade da realização de estudos populacionais no Brasil tendo em vista a miscigenação populacional a qual o país está sujeito.

Correlacionando os três SNPs e seus respectivos genótipos com a severidade, extensão e classificação da periodontite crônica, neste estudo, nenhum destes genótipos apresentou resultado significativo para as variáveis analisadas, o que leva a crer que a presença destes polimorfismos não está relacionada a severidade e extensão da doença. Também não foi possível verificar dentro do grupo GP uma forte influência dos genótipos frente às variávies clínicas PS, NIC e ISS.

Apesar dos resultados do presente estudo terem fornecido informações importantes com relação aos genes estudados, estes devem ser considerados com prudência devido à

existência de algumas limitações, tais como amostragem, desenho do estudo e variabilidade genética da população brasileira.

Novos estudos abordando outros polimorfismos e outros grupos populacionais devem ser realizados a fim de estabelecer uma relação mais forte entre a presença destes SNPs em defensinas e a presença e severidade da doença periodontal, em particular, a periodontite crônica.

A importância deste estudo vem, portanto, aumentar o conhecimento a cerca das funções da β-defensina 1 na cavidade oral, na promoção da homeostase da mesma e combate a microorganismos periodontopatogênicos, para tentar auxiliar na determinação da susceptibilidade de alguns indivíduos à periodontite crônica e, futuramente, torná-la um importante marcador diagnóstico para esta doença.

Conclusão

Diante do nosso estudo é possível concluir que:

- Para o genótipo, apenas o SNP (-20 G/A) parece influenciar na predisposição da periodontite crônica, sendo o genótipo AA mais presente nos indivíduos com periodontite crônica;
- Quanto aos haplótipos, apenas GCA e ACA foram os mais presentes em pacientes com periodontite comparados aos periodontalmente saudáveis;
- Não foi verificada a associação da severidade e extensão da periodontite crônica com a presença dos polimorfismos (-52; -44 e -20) da β-defensina 1.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

Alves, RD; Godoy, GP; Figueiredo, CRLV; Pinto, LP. Mecanismos imunológicos e auto-imunidade na doença periodontal. **Revista Odonto Ciência**, v.18, n.40, p.138-142, 2003

Armitage, GC. Periodontal infections and cardiovascular disease - how strong is the association? **Oral Diseases**, v.6, p335-50, 2000

Azuma, M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. **Journal of Periodontal Research**, v.41, p.361-373, 2006

Bissel, J; Joly, S; Johnson, GK; Dawson. D; McCray Jr, PB; Guthmiller, JM. Expression of β-defensisns in gingival health and in periodontal disease. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.33, p.278-285, 2004

Bogefors,J; Kvarnhammar, AM; Höckerfelt, U; Cardell, L-O. Reduced tonsillar expression of human b-defensin 1, 2 and 3 in allergic rhinitis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.65, p.431–8, 2012

Cimões, R; Siqueira, RAC; Crovella, S; Souza, PRE; Donos, N. A Fast Method for DEFB1-44C/G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. **Acta stomatologica Croatica**, v.48, n.3, p.208-15, 2014

Diamond, G; Ryan, LK. Beta-defensins: what are they REALLY doing in the oral cavity? **Oral Diseases**, v.17, n.7, p.628–635, out. 2011

Dörk, T; Stuhrmann, M. Polymorphisms of the human b-defensin-1 gene. **Molecular Cellular Probes**, v.12, p.171–173, 1998

Geurs, N; Lacono, V; Krayer, J; Mealey, B; Paquette, D; Pearson, B; Rosen, P; Sabatini, R; Schweinebraten, M. American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. **Journal of Periodontology**, v.86, n.7, p.835-38, 2015

Greer, A; Zenobia, C; Darveau, RP. Defensins and LL-37: A review of function in the gingival epithelium. **Periodontology 2000**, v.63, n.1, p.67–79, out., 2013

Ikuta, T; Inagaki, Y; Tanaka, K; Saito, T; Nakajima, Y; Bando, M; Kido, J; Nagata, T. Gene polymorphism of β-defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. **Odontology**, v.103, n.1, p.66-74, Jan. 2015

Jurevic, RJ; Bai, M; Chadwick, RB; White, TC; Dale, BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, 2003

Kelly, CJ; Glover, LE; Campbell, EL; Kominsky, DJ; Ehrentraut, SF; Bowers, BE; Bayless, AJ; Saeedi, BJ; Colgan, SP. Fundamental role for HIF-1a in constitutive expression of human b defensin-1. **Mucosal Immunology**, v.6, n.6, p.1110-1118, nov. 2013

Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader, HB, editor. **Biologia celular e molecular**, Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 255- 93p

Loo, WTY; Bai, L-J; Fan, C-B; Yue, Y; Dou, Y-D; Wang, M; Liang, H; Cheung, MNB; Chow, LWC; Li, J-L; Tian, Y; Qing, L. Clinical application of human β-defensin and CD14 gene polymorphism in evaluating the status of chronic inflammation. **Journal of Translational Medicine**, v.10, Suppl 1, S9, 2012

Mehlotra, RK; Zimmerman, PA; Weinberg, A; Jurevic, RJ. Variation in human β-defensin genes: new insights from a multipopulation study. **International Journal of Immunogenetics**, v.40, n.4, p.261–9, ago. 2013

Mombelli, A; Muhle, T; Frigg, R. Depth-force patterns of periodontal probing. Attachment-gain in relation to probing force. **Jounal of Clinical Periodontology**, v.19, p.295–300, 1992

Navarra, CO; Robino, A; Pirastu, N; Bevilacqua, L; Gasparini, P; Di Lenarda, R; Crovella S. Caries and Innate Immunity: DEFB1 Gene Polymorphisms and Caries Susceptibility in Genetic Isolates from North-Eastern Italy. **Caries Research**, v.50, n.6, p.589-94, nov.2016

Nittayananta, W; Kemapunmanus, M; Amornthatree, K; Talungchit, S; Sriplung, H. Oral human β-defensin 2 in HIV-infected subjects with long-term use of antiretroviral therapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.42, n.1, p.53–60, jan. 2013

Nuto, SAS; Nations, MK ; Costa, ICC. Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.681-90, mar. 2007

Oca, EPM; Villalobos, HR; Gallegos-Arreola, MP; Sandoval, L; Figuera, LE. SNPs in human β-defensin 1 gene (DEFB1): frenquencies in a Mexican population and new PCR-RFLPs assays. **International Journal of Immunogenetics**,, v.33, p.339-342, 2006

Pace, E; Ferraro, M; Minervini, M; Vitulo, P; Pipitone, L; Chiaparra, G; Siena, L; Montalbano, AM; Johnson, M; Gjomarkaj, M. Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. **Plos ONE**, v.7, q.3, e33601, mar.2012

Page, RC; Offenbacher, S; Schroeder, HE; Seymour, GJ; Kornman, KS. Advances in the pathogenesis of periodontites: Summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v.14, p.216-248, 1997

Pereira, AL; Holzhausen, M; Franco, GCN; Cortelli, SC; Cortelli, JR. Human b-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. **Archives of oral biology**, v.57, p.1609-14, 2012

Polesello, V; Zupin, L; Di Lenarda, R; Biasotto, M; Ottaviani, G; Gobbo, M; Cecco, L; Alberi, G; Pozzato, G; Crovella, S; Segat, L. Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. **Archives of oral biology**, v.60 p.1054-58, 2015

Sarkisyan, NG; Gankovskaya, LV; Tuzankina, IA; Svitich, OA; Ron, GI; Shershnev, VN; Kolyadina, ON; Dolgikh, MA. Association of polymorphic markers in genes of innate immunity in patients with periodontitis and inflammatory diseases of upper respiratory tract. **Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii [journal].**, n.1, p.67-71, jan-fev, 2016

Semple, F; Dorin, JR. β -Defensins: Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More? **Journal of Innate Immunity**, v.4, p.337–48, 2012

Van Hemert, JR; Recker, EN; Dietrich, D; Progulske-Fox, A; Kurago, ZB; Walters, KS; Cavanaugh, JE; Brogden, KA. Human β-defensin-3 alters, but does not inhibit, the binding of *Porphyromonas gingivalis* haemagglutinin B to the surface of human dendritic cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.40, n.1, p.75–9, jul.2012

Wiebe, CB; Putnins, EE. The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology — An Update. **Journal of the Canadian Dental Association**, V. 66, n. 11, p.594-97, dez. 2000

Wang, P; Duan, D; Zhou, X; Li, X; Yang, J; Deng, M; Xu, Y. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. **Journal of Periodontal Research.**, v.50, n.1, p.113-22, fev. 2015

ANEXO A

HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE CRÔNICA COM A QUALIDADE DE VIDA, A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49166415.0.3001.5197

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.368.830

Apresentação do Projeto:

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento do nível de glicose na corrente sangüínea devido a secreção ou atividade defeituosa do hormônio insulina. Dos fatores de risco sistêmicos dessa doença, está bem estabelecido que pacientes com diabetes têm pelo menos um pequeno aumento na severidade da doença periodontal quando comparados com não diabéticos.A presença de microorganismos no biofilme dentário é necessário, mas não é suficiente para o desenvolvimento de periodontite, porém a imunidade do hospedeiro e fatores genéticos e ambientais irão determinar parte da susceptibilidade e severidade da doença. A pesquisa das alterações genéticas do tipo polimorfismo de única base (SNP) tem sido pouco desenvolvido por grupos de pesquisa em Odontologia no Brasil; diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a condição periodontal de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, a presença de polimorfismos celulares (B-defensina-1, IL-6 e VDR) e os níveis séricos de vitamina D, bem como a implicação dessas condições crônicas na percepção da qualidade de vida desses pacientes. Os exames clínicos e as coletas de saliva e de células de descamação da mucosa oral serão realizadas na Clínica de Periodontia do Curso de Graduação em Odontologia da UFPE e no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) - Recife- PE. A análise laboratorial acontecerá no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE.

Endereço: Estrada do Arraial, 2723
Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral **CEP:** 52.051-380
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1760 **Fax:** (81)3048-0117 **E-mail:** cepham@hotmail.com.br

HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM

Plataforma Brasil

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar se há associação entre a condição periodontal de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e a presença de polimorfismos celulares (B-defensina-1, IL-6 e VDR) e os níveis séricos de vitamina D, bem como a influência dessas condições crônicas na percepção da qualidade de vida desses pacientes, através de um estudo tipo caso-controle. Objetivo Secundário: - Verificar a condição periodontal de pacientes diabéticos tipo 2; - Detectar a presença de polimorfismos de uma única base (SNPs) da betadefensina-1;- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético da beta-defensina-1 e a severidade da periodontite em diabéticos tipo 2;- Detectar polimorfismos da IL-6 na posição -174 nos pacientes pesquisados;- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético da IL-6 e a severidade de periodontite em pacientes portadores de periodontite e diabetes mellitus tipo 2;- Verificar os níveis séricos de vitamina D de pacientes diabéticos tipo 2; - Verificar se existe associação entre a condição periodontal dos pacientes e a deficiência de vitamina D;- Detectar polimorfismos do VDR na posição FokI nos pacientes pesquisados;- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético do VDR e a severidade de periodontite em pacientes portadores de periodontite e diabetes mellitus tipo 2;- Avaliar se a condição periodontal de diabéticos tipo 2 interfere na percepção da qualidade de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de, durante o exame clínico e/ou ao responder ao questionário de 14 perguntas sobre qualidade de vida, ficar constrangido e ocorrer sangramento gengival e/ou desconforto leve (esses dois últimos no caso do exame clínico). Esses sintomas e o constrangimento serão minimizados com a realização do exame e do questionário em local reservado, por profissional qualificado e respeitando a individualidade de cada paciente. Benefícios: Entre os benefícios, os participantes receberão orientações de higiene oral e informações de como tratar a doença gengival presente e prevenir seu avanço. Receberão também orientações de como e onde procurar serviços de odontologia quando for necessário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Preenche as exigências.

Endereço: Estrada do Arraial, 2723
Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral **CEP:** 52.051-380
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1769 **Fax:** (81)3048-0117 **E-mail:** cepham@hotmail.com.br

HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM

Recomendações:

Não

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em condições de ser implementado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado de acordo com a Resolução 466/2012

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/10/2015 17:29:13		Aceito
Outros	carta_resposta.docx	09/10/2015 17:26:00	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/10/2015 17:12:55	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/10/2015 17:12:19	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	14/09/2015 13:01:32		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/09/2015 21:53:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/09/2015 21:52:22	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	09/09/2015 21:51:45	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/09/2015 21:51:04	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	02/09/2015 15:29:02		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	02/09/2015 15:27:31	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Roberto.pdf	22/08/2015 15:10:56	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Renata.pdf	22/08/2015 15:10:15	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 1.368.830

Outros	Lattes_Rayanne.pdf	22/08/2015 15:09:06	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Francisco.pdf	22/08/2015 15:08:42	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Felipe.pdf	22/08/2015 15:07:40	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Questionario_qualidade_vida_ANEXO_A.docx	22/08/2015 14:48:31	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Ficha_clinica_APENDICE_B.docx	22/08/2015 14:48:05	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	22/08/2015 14:45:02	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade.pdf	22/08/2015 14:43:25	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_POS_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:43:01	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HAM.pdf	22/08/2015 14:42:33	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_DPTO_de_clinica_e_preventiva_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:42:08	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 15 de Dezembro de 2015

Assinado por:
CARLOS ALBERTO SÁ MARQUES
(Coordenador)

Endereço: Estrada do Arraial, 2723
Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral **CEP:** 52.051-380
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1769 **Fax:** (81)3048-0117 **E-mail:** cepham@hotmail.com.br

ANEXO B

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CEP-CCS-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE CRÔNICA COM A QUALIDADE DE VIDA, A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49166415.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.310.208

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa da Profa. Dra. Renatas Cimões Jovino Silveira, que contará com a participação da seguinte equipe: Felipe Rodrigues de Almeida,Rayanne Sorala Aguiar de Melo Dias e Roberto Carlos Mourão Pinho, alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia, e do médico Dr.Francisco Alfredo Bandeira e Farias, chefe da divisão de diabetes do Hospital Agamenon Magalhães.Que buscarão investigar e fornecer mais informações da correlação entre a periodontite crônica e o diabetes tipo 2.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar se há associação entre a condição periodontal de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e a presença de polimorfismos celulares e os níveis séricos de vitamina D, bem como a influência dessas condições crônicas na percepção da qualidade de vida
desses pacientes, através de um estudo tipo caso-controle.

Objetivos Específicos:

- Verificar a condição periodontal de pacientes diabéticos tipo 2;
- Detectar a presença de polimorfismos de uma única base (SNPs) da betadefensina-1;

- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético da beta-defensina-1 e a severidade da periodontite em diabéticos tipo 2;
- Detectar polimorfismos da IL-6 na posição -174 nos pacientes pesquisados;
- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético da IL-6 e a severidade de periodontite em pacientes portadores de periodontite e diabetes mellitus tipo 2;
- Verificar os níveis séricos de vitamina D de pacientes diabéticos tipo 2;
- Verificar se existe associação entre a condição periodontal dos pacientes e a deficiência de vitamina D;
-Detectar polimorfismos do VDR na posição FokI nos pacientes pesquisados;
- Verificar se existe associação entre a presença de polimorfismo genético do VDR e a severidade de periodontite em pacientes portadores de periodontite e diabetes mellitus tipo 2;
- Avaliar se a condição periodontal de diabéticos tipo 2 interfere na percepção da qualidade de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão adequados para a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A população a ser estudada será proveniente de pacientes diagnosticados com Periodontite Crônica na Clínica de Periodontia do Curso de Graduação da UFPE e os diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 atendidos no Hospital Agamenon Magalhães (HAM) - Recife. Nesses mesmos locais também serão coletadas amostras em pessoas saudáveis para formação do grupo controle. Será uma amostra de conveniência constituída por 300 pessoas, divididos em 3 grupos de 100: um grupo formado por diabéticos e que apresentem a periodontite crônica, o segundo grupo formado por pessoas com periodontite crônica e sem diabetes e o terceiro grupo será o controle, formado por pessoas saudáveis para essas condições estudadas. Após explicação dos objetivos da pesquisa, se o participante aceitar, será solicitado que ele assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Antes de iniciar o exame clínico, serão registrados dados sobre a idade, o sexo, renda, escolaridade, estado civil, hábito de fumar, tipo de diabetes, uso de insulina e outros medicamentos, tempo de tratamento para o diabetes e resultados de exames laboratoriais (Hemoglobina glicada, glicemia em jejum, níveis séricos de vitamina D e calcemia), que estiverem com ele. Estes também responderão a um questionário de qualidade de vida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável obedecendo a Resolução CNS Nº466/12 anexou os seguintes documentos que atendem a resolução:

1-Os curriculos de todos os pesquisadores estão anexados;

2- Folha de Rosto devidamente preenchida e carimbada;

3- O cronograma e orçamento estão adequadas a proposta;

4- A Carta de Anuência do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães, permitindo a coleta do material biológico nos Diabéticos.

5- Carta de anuência do Laboratório de Biologia Molecular, no Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, onde serão processados os materias;

6- Carta de anuência da Clínica da Pós-graduação em odontologia-UFPE;

7-Carta de Anuência do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva;

8- O TCLE em linguagem clara e acessível aos participantes.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho preenche os critérios éticos necessários para a sua aprovação, e poderá ser executado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da

Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/10/2015 17:29:13		Aceito
Outros	carta_resposta.docx	09/10/2015 17:28:00	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/10/2015 17:12:55	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/10/2015 17:12:19	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	09/09/2015 21:51:45	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	02/09/2015 15:27:31	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Roberto.pdf	22/08/2015 15:10:56	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Renata.pdf	22/08/2015 15:10:15	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Rayanne.pdf	22/08/2015 15:09:06	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Francisco.pdf	22/08/2015 15:08:42	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Felipe.pdf	22/08/2015 15:07:40	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Questionario_qualidade_vida_ANEXO_A.docx	22/08/2015 14:46:31	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Ficha_clinica_APENDICE_B.docx	22/08/2015 14:46:05	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	22/08/2015 14:45:02	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade.pdf	22/08/2015 14:43:25	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_POS_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:43:01	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HAM.pdf	22/08/2015 14:42:33	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_DPTO_de_clinica_e_preventiva_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:42:08	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

REVISTA JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH: NORMAS PARA AUTORES

Journal of Periodontal Research

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Edited By: Dr. Shinya Murakami

Impact Factor: 2.474

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 16/89 (Dentistry Oral Surgery & Medicine)

Online ISSN: 1600-0765

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Journal of Periodontal Research guarantees an effective review and publication process. Rapid review processing: on average 32 days from submission to first decision Rapid publication: on average 55 days from acceptance to online availability and Medline indexing

Useful Websites: Submission Site, Author Services, Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

The *Journal of Periodontal Research* is an international research periodical the purpose of which is to publish original clinical and basic investigations and review articles concerned with every aspect of periodontology and related sciences. Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Periodontal Research*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell's Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisiation of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

2.2. Ethical Approvals

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Photographs of People

The *Journal of Periodontal Research* follows current HIPAA guidelines for the protection of patients/subject privacy. If an individual pictured in a digital image or photograph can be identified, his or her permission is required to publish the image. The corresponding author may submit a letter signed by the patient authorizing the *Journal of Periodontal Research* to publish the image/photo. Or, a form provided by the *Journal of Periodontal Research* (available by clicking the “Instructions and Forms” link in Manuscript Central) may be downloaded for your use. This approval must be received by the Editorial Office prior to final acceptance of the manuscript for publication. Otherwise, the image/photo must be altered such that the individual cannot be identified (black bars over eyes, tattoos, scars, etc.). The *Journal of Periodontal Research* will not publish patient photographs that will in any way allow the patient to be identified, unless the patient has given their express consent.

2.4 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

The *Journal of Periodontal Research* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/, http://isrctn.org/. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Please disclose information concerning sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest under Acknowledgements

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7. Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login to Author Services; where via the WIley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign.The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQS below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Agreements (OAA):

Creative Commons License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open acess agreements, please visit the Copyright FAQ hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)], you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit

http://www.wiley.com/go/funderstatement

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site http://mc.manuscriptcentral.com/jre.The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further assistance, please contact the editorial office at jreedoffice@wiley.com

3.1. Getting Started

• Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: http://mc.manuscriptcentral.com/jre
• Log-in or, if you are a new user, click “register here”.

• If you are registering as a new user.

- After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

• If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system http://mc.manuscriptcentral.com/jre and enter your email address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

• Log-in and select “Corresponding Author Center”

3.2. Submitting Your Manuscript

• After you have logged into your “Corresponding Author Center”, submit your manuscript by clicking the submission link under “Author Resources”.

• Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.

• Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
• You are required to upload your files.

- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

• Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, figure legends and tables but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research will be reviewed by two experts in the field. The Journal of Periodontal Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

The Journal of Periodontal Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of 2 potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. Email Confirmation of Submission

After submission you will receive an email to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your email address carefully in the system. If the email address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your email server. Also, the emails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre'. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles: are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors´ own previous work, so extensive citation of the authors´ own publications is discouraged.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Short Communications: Short communications, limited to 1-3 pages, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a full-length paper. Short communications need not follow the usual divisions.

Meeting Reports: Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations and symbols: Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster 's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps* .for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

5.3. Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript

and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating ‘Both the authors have contributed equally to the work’.The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract: The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Main Text of Original Research Articles

Introduction: Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods: Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion: Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

5.4. References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: http://refman.com/downloads/styles

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt 2): 316- 324. Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response* , 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972.* Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease* . Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp.

Check your electronic artwork before submitting it: http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

5.6. Supporting Material

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect

reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early Online Publication Prior to Print

The Journal of Periodontal Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Production Tracking

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production.