

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA β -DEFENSINA-1 EM DIABÉTICOS TIPO 2
COM PERIODONTITE CRÔNICA**

RECIFE

2017

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA β -DEFENSINA-1 EM DIABÉTICOS TIPO 2
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 parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira.

Co-orientadores: Prof. Dr. Sergio Crovella e Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva.

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

D541a Dias, Rayanne Soraia Aguiar de Melo.
Análise dos polimorfismos da β -defensina-1 em diabéticos tipo 2 com
periodontite crônica / Rayanne Soraia Aguiar de Melo Dias. – 2017.
70 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Periodontite crônica. 3. Polimorfismo de
nucleotídeo único. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (Orientadora).
II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-179)

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA β -DEFENSINA-1 EM DIABÉTICOS TIPO 2
COM PERIODONTITE CRÔNICA**

Aprovada em 08 de fevereiro de 2017.

Orientadora: Profa. Dra. RENATA CIMÕES JOVINO SILVEIRA.

BANCA EXAMINADORA

3º _____
Prof. Dr. GUSTAVO PINA GODOY (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

2º _____
Prof. Dr. ANDRÉ VAJGEL FERNANDES (Examinador Externo)
UNINASSAU

1º _____
Prof. Dr. LEOGENES MAIA SANTIAGO (Examinador Externo)
ASCES – CARUARU- PE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Alessandra A. T. Carvalho

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra A. T. Carvalho

Profa. Dra. Flávia Maria de M. R. Perez

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Profa. Dra. Andrea Cruz Camara

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Andrea dos Anjos Pontual

Profa. Dra. Jurema F. L. de Castro

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Profa.Dra. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dra. Maria Luiza dos A. Pontual

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Profa. Dra. Renata Cimões J. Silveira

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

SECRETÁRIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico esse trabalho à Deus e a Nossa Senhora, fontes inesgotáveis de amor, sabedoria e misericórdia. São Eles a força que me impulsionou a chegar até aqui!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a *Deus* por mais uma vitória e mais uma graça alcançada, pois sei que sem Ele e sem minha fé, nada até aqui teria sido possível.

Aos meus pais Sandra e Ronaldo, por não medirem esforços para me oferecer a melhor educação e pelo exemplo de caráter.

Ao meu maravilhoso esposo Saulo, companheiro de todas as horas, agradeço pela paciência e pelo amor a mim dedicados. Sem ele talvez eu nem acreditasse em mim mesma e dificilmente estaria escrevendo esses agradecimentos.

A toda minha família, representada aqui pela minha irmã Rayne, que me deu um dos melhores presentes nos últimos tempos (minha sobrinha Marina), obrigada pelo apoio e pela torcida. Vocês são “show”!

Agradecer à UFPE e, principalmente, à Pós-Graduação em Odontologia dessa instituição, em nome de todos os professores, pelas oportunidades, direcionamento e dedicação nesses últimos 2 anos.

À minha estimada orientadora, Prof^a. Renata Cimões, obrigada pela confiança e paciência, mas também pelo belo exemplo de mãe, mulher e profissional.

Por falar em exemplo, não posso deixar de agradecer também a Prof^a Bruna Vajgel por todas as dúvidas sanadas, correções dos textos; enfim, pela disponibilidade e amizade.

Aos meus co-orientadores, Prof. Sergio Crovella e Prof. Ronaldo Celerino, pessoas simples, aos quais tive a honra de conhecer, obrigada por permitirem que eu pudesse aprender um pouquinho do grandioso mundo da genética.

Aos colegas de turma, obrigada pela convivência, risadas e troca de saberes. Foi enriquecedor estar com cada um de vocês. Aqui destaco duas amizades que construí e que valem ouro: *Roberto Mourão e Camila Agra*, obrigada por tudo.

Todo o meu carinho às funcionárias da Pós-Graduação Oziclere, Tamires e Dona Tânia, que sempre atenciosamente me atenderam. Obrigada!

Ao Hospital Agamenon Magalhães e, principalmente, ao Prof. Dr. Francisco Bandeira, pela oportunidade e parceria no desenvolvimento desse trabalho.

Minha gratidão eterna *aos pacientes*, que prontamente se disponibilizaram a participar dessa pesquisa com todo zelo e preocupação. Muito obrigada!

Aos alunos de PIBIC que estiveram comigo, obrigada pela grandiosa participação de vocês. A você, *Gabriela Luna*, a pioneira, obrigada pelo carinho e pelo compromisso.

E por fim, mas não menos importante, obrigada a todos que de alguma forma se fizeram presentes; amigos de perto e de longe, amigos de trabalho, amigos da igreja; cada um foi e é muito importante para mim. Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A íntima relação entre Diabetes Mellitus (DM) e Periodontite Crônica (PC) é foco de várias investigações na literatura. Alguns mecanismos fisiopatológicos explicam essa relação; porém, o papel de variações genéticas em genes relacionados a resposta imune inata, neste contexto, ainda não é claro e se mostra como um caminho para trazer novas informações. Considerando a importância do gene da β -defensina-1 na imunidade inata, primeira linha de defesa do organismo contra infecções, e supondo que polimorfismos de única base (SNPs) neste podem influenciar a susceptibilidade às infecções, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição de SNPs funcionais do gene *DEFB1* em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) com PC e indivíduos saudáveis (controles), além da sua possível associação com o desenvolvimento de PC em portadores de DM2. Ao todo, 185 indivíduos participaram do estudo, sendo 116 com DM2 e PC e 69 indivíduos saudáveis para essas duas condições (grupo controle). Três SNPs funcionais (-52 G>A [rs1799946], -44 C>G [rs1800972] e -20 G>A [rs11362]) foram genotipados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, usando sondas alelo específicas (TaqMan®). As distribuições dos genótipos nos SNPs de *DEFB1* estavam condizentes com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para o SNP rs1800972 nos indivíduos controles. Os resultados mostraram uma associação significativa para o SNP na posição -20 G>A de *DEFB1*. O alelo G e os genótipos GA e GG foram significativamente ($p < 0.05$) mais frequentes entre indivíduos DM2 com PC (59,5%, 50% e 34,5%, respectivamente) que indivíduos saudáveis (26,8%, 36,2% e 8,7%, respectivamente). Quanto aos haplótipos, observou-se que as combinações GCG e ACG (-52,-44,-20) também foram mais frequentes entre os indivíduos DM2 com PC (28% e 23,3%, respectivamente) que em indivíduos controles (15,2% e 6,5%, respectivamente). Adicionalmente, também verificou-se associações significativas da distribuição dos genótipos do SNP na posição -20 em relação a severidade ($p = 0.021$) e a classificação da PC (0.046). Diante disso, sugere-se que o alelo G, os genótipos GA e GG no SNP -20 G>A e os haplótipos GCG e ACG podem estar associados com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de PC em diabéticos tipo 2 em uma população do nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 2. Periodontite Crônica. Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

ABSTRACT

The close relation between Diabetes Mellitus (DM) and Chronic Periodontitis (CP) is the focus of several investigations in the literature. Some pathophysiological mechanisms explain this relation; nevertheless, the role of genetic variations in genes related to innate the immune response, in this context, is still not clear and has shown to be a way to bring new information. Considering the importance of the β -defensin-1 gene in the innate immunity, the first line of defence against infections, and assuming that single base polymorphisms (SNPs) in this gene could influence on the susceptibility to infections, the current study aimed evaluate the distribution of functional SNPs of DEFB1 gene in DM type 2 individuals with CP and healthy individuals (controls) and their possible association with the development of CP in type 2 DM carriers. Altogether, 185 individuals participated in this study, of which 116 were type 2 DM and CP carriers, and 69 were healthy individuals in what regards both conditions studied (control group). Three functional SNPs (-52 G>A [rs1799946], -44 C>G [rs1800972] e -20 G>A [rs11362]) were genotyped by the real-time polymerase reaction (PCR) technique using specific allele probes (TaqMan®). The distributions of the genotypes in the DEFB1 SNPs were consistent with the Hardy-Weinberg Equilibrium, except for the SNP rs1800972 in the control individuals. Results showed a significant association for the SNP at the -20 G>A position of *DEFB1*. The G allele and GA and GG genotypes were significantly ($p<0.05$) more frequent among DM2 individuals with CP (59.5%, 50% and 34.5%, respectively) than healthy individuals (26.8%, 36.2% and 8.7%, respectively). Regarding the haplotypes, it was observed that the GCG and ACG combinations (-52, -44, -20) were also more frequent among PC type 2 DM patients with PC (28% and 23.3%, respectively) than in controls (15.2% and 6.5%, respectively). In addition, we also found significant associations of the distribution of the SNP genotypes at position -20 in relation to severity alone ($p=0.021$) and PC severity / extension ($p=0.046$). Therefore, it is suggested that the G allele, the GA and GG genotypes in the -20 G>A SNP and the GCG and ACG haplotypes may be associated with a greater susceptibility to the development of PC in type 2 diabetics in a population in the northeast of Brazil.

Key words: Diabetes Mellitus, Type 2. Chronic periodontitis. Polymorphism, Single Nucleotide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Associação Americana de Periodontia
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	Utah residents with northern and western European ancestry (Residentes de Utah com descendência do norte e ocidente europeus)
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPO-d	Cariados, perdidos e obturados (dentes)
<i>DEFB1</i>	Gene da beta defensina-1
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
hBD-1	human Beta defensina-1 (β -defensina humana- 1)
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
MAF	Minim Allele Frequency (Frequência alélica mínima)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)
NIC	Nível de inserção clínica
PC	Periodontite Crônica
PCR	Polymerase Chain Reation (Reação em Cadeia da polimerase)
PPV	Presença de placa visível
PS	Profundidade de sondagem
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de único nucleotídeo)

SS	Sangramento à sondagem
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTR	Untranslated region (Região não traduzida)
YRI	Yoruba residents in Ibadan, Nigeria (Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	METODOLOGIA	17
2.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	17
2.2	TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO	17
2.3	POPULAÇÃO ALVO	18
2.4	TAMANHO DA AMOSTRA	18
2.5	SELEÇÃO DA AMOSTRA	18
2.6	INSTRUMENTO DA PESQUISA	19
2.6.1	Entrevista	19
2.6.2	Exame Clínico	19
2.7	ISOLAMENTO DO DNA	20
2.8	GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL	21
2.9	ANÁLISE DOS DADOS	22
3	RESULTADOS	23
4	ARTIGO CIENTÍFICO	26
5	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS (Introdução e Metodologia)	42
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	44
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA	47
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	50
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO	59

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento do nível de glicose na corrente sanguínea devido à secreção ou atividade defeituosa do hormônio insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a vários danos a longo prazo, como a disfunção e a falha de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. No DM tipo 1, autoimune, há destruição de células do pâncreas responsáveis pela secreção de insulina (1). Também são conhecidas a DM gestacional e DM por outras causas específicas, além do diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

O DM2 surge a partir de uma interação entre fatores ambientais (obesidade, sedentarismo e ingestão de alimentos com alto teor calórico) e fatores genéticos, resultando em defeitos na secreção de insulina e na resistência à ela (2). A prevalência do DM2 vem aumentando no mundo inteiro e representa um encargo significativo para a saúde humana, trazendo numerosas complicações sistêmicas ao longo do tempo (3), que resultam também do retardo para o diagnóstico e tratamento da doença, seja por ausência de sintomas iniciais por parte dos pacientes, ou mesmo, por deficiências dos sistemas de saúde.

Fortes evidências apontam que a periodontite crônica (PC) deve ser listada com uma das complicações clássicas do DM2, pois os mecanismos biológicos e fisiopatológicos que explicam essa inter-relação são muito semelhantes àqueles envolvidos na neuropatia, nefropatia e nas doenças macrovasculares associadas ao DM2. Esses mecanismos estão particularmente ligados a alterações na resposta imune inflamatória, que se tornam mais evidentes nos portadores de DM 2 (4).

A PC é uma doença infecciosa resultante da inflamação dos tecidos de suporte dos dentes e progressiva perda óssea alveolar. É caracterizada por formação de bolsas periodontais e/ ou recessão gengival, sendo classificada em relação a extensão e a severidade (5).

É sabido que as doenças periodontais mostram um progresso rápido em indivíduos diagnosticados com DM2 em comparação com os indivíduos sem diabetes. Isso é explicado pelo fato da hiperglicemia ter um efeito prejudicial sobre as funções

celulares dos tecidos periodontais desses indivíduos, tais como na quimiotaxia, fagocitose e na produção e secreção de citocinas. Além disso, o indivíduo com DM2 também desenvolve um espessamento da membrana basal dos vasos sanguíneos com consequente alteração da vascularização nos tecidos periodontais, o que afeta a distribuição de nutrientes e a migração de leucócitos. Em alguns casos pode também diminuir a eliminação de resíduos metabólicos e a difusão de oxigênio, aumentando a severidade da doença periodontal e diminuindo a capacidade de cicatrização do tecido (6).

A infecção bacteriana, na doença periodontal, não é unicamente suficiente para induzir a iniciação ou progressão da doença. A presença desses microorganismos estimulam uma reação inflamatória local e a ativação do sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra as infecções (7). Portanto, alterações nesse sistema de defesa podem influenciar na susceptibilidade à doença periodontal.

Defensinas são um grupo de peptídeos antimicrobianos encontrados em diferentes organismos vivos e envolvidos na resposta imune inata. Eles desempenham um papel importante e precoce contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias, fungos e vírus (8).

A beta-defensina humana-1 (hBD-1), codificada pelo gene *DEFB1* (cromossomo 8p23.1), é reconhecida como o mais importante antimicrobiano humano em células epiteliais, sendo expressada em vários sítios do corpo humano, entre eles na mucosa jugal, língua e gengiva. Polimorfismos nesse gene têm sido associados a diversas doenças crônicas (8). No entanto, o papel dos fatores genéticos no gene *DEFB1* e suas implicações no contexto da PC ainda não é bem compreendido. Estudos visando esclarecer o possível mecanismo desses fatores e sua interação com fatores microbianos, ambientais e imunológicos são necessários (9).

O nível de expressão das defensinas varia entre os indivíduos, e tem sido sugerido que esta variação é relacionada às diferenças genéticas nos genes que as codificam (10). Já foi demonstrado anteriormente que os níveis de hBD-1 foram significativamente maiores no fluido crevicular gengival de diabéticos com gengivite em relação a não diabéticos com gengivite ou periodontite; como também, níveis elevados de defensinas foram observados em indivíduos com periodontite em relação aos com gengivite (6), sugerindo que realmente essas variações acontecem.

Os polimorfismos de única base (SNPs) são o tipo mais comum de variação genética, e consistem em alterações de um único par de bases em um *locus* específico. Estão presentes, aproximadamente, a cada 300 pares de bases através do genoma humano e podem alterar a sequência de aminoácidos e conseqüentemente a estrutura ou função da proteína. Em regiões regulatórias, podem estar envolvidos na modulação da expressão gênica e podem ser utilizados como marcadores para estudos genéticos em humanos para comparar a variação entre as populações, para analisar haplótipos e como marcadores para associação com doenças (11).

Tendo em vista a importância da imunidade inata na primeira linha de defesa do organismo contra infecções e supondo que as variações genéticas no gene da β -defensina-1 (*DEFB1*) possam alterar a expressão da hBD-1, e conseqüentemente, a susceptibilidade às infecções; o presente trabalho teve como objetivo avaliar se SNPs na região 5'UTR de *DEFB1*, variantes funcionais, estão associados ao desenvolvimento de PC em indivíduos com DM2.

2 METODOLOGIA

2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Assim como todos os estudos envolvendo seres humanos devem seguir a norma 466/12 do CNS (Conselho Nacional de Saúde), que regulamenta a pesquisa em humanos, esse também o fez. Os indivíduos foram informados sobre o teor científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos que teriam em participar da mesma. E, mediante aceitação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, concordando em participar do estudo (Apêndice A).

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE e só iniciou após a aprovação desse órgão. Os números dos pareceres de aprovação do CEP/ CCS/ UFPE e CEP/ HAM (Instituição Coparticipante – Hospital Agamenon Magalhães) foram respectivamente: 1310208 e 1368830 (ANEXO A).

2.2 TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

Esse trabalho trata-se de um estudo caso-controle, composto por uma etapa clínica e outra laboratorial. As avaliações clínicas dos indivíduos, assim como a coleta de material biológico para estudo dos polimorfismos, aconteceram no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), Recife – PE, referência no atendimento de pacientes diabéticos, e na Clínica da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) de novembro/2015 a setembro/2016. A análise laboratorial aconteceu no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE.

2.3 POPULAÇÃO ALVO

A população estudada foi formada por indivíduos diagnosticados com DM2 e PC (grupo caso) e indivíduos saudáveis para essas duas condições (grupo controle) atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do HAM e na Clínica da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE. Todos os indivíduos envolvidos eram provenientes do Estado de Pernambuco.

2.4 TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra aleatória e, inicialmente, não-probabilística, totalizou 185 indivíduos, sendo 116 com DM2 e PC, e 69 indivíduos no grupo controle.

Após encontrar as frequências genóticas da amostra foi realizado cálculo amostral para verificar se o número de indivíduos era suficiente para obtenção das associações. Foi utilizado o SNP -20 como o “fator de risco” para o cálculo amostral (estudo caso-controle), com um poder β de 80%. Assim, verificou-se que seria necessária uma amostra de 66 indivíduos, sendo 47 no grupo caso e 19 no controle, o que se mostrou condizente com nosso número amostral. Para os demais SNPs, o número de indivíduos necessários era superior a 500 indivíduos.

2.5 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Inicialmente foi realizado o convite aos indivíduos para participar do estudo, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos, conforme a seguir:

- ✓ Critérios de inclusão para o grupo com DM2 e PC: ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de PC (5,12); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (13).

- ✓ Critérios de exclusão para o grupo com DM2 e PC: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante e usar aparelho ortodôntico.
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo controle: ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (13).
- ✓ Critérios de exclusão para o grupo controle: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante; usar aparelho ortodôntico e ser portador de DM e ou PC.

Segundo a Associação Americana de Periodontia (AAP) (2015), que reorganizou a classificação proposta em 1999, o diagnóstico da PC baseia-se em vários parâmetros clínicos e radiográficos, onde nem sempre todos estarão presentes; classificando a PC em leve, moderada ou severa (quanto à severidade) e em localizada ou generalizada (quanto à extensão). Neste trabalho, a doença foi caracterizada pela presença de inflamação (sangramento à sondagem), aumento da profundidade de sondagem e perda de inserção clínica.

2.6 INSTRUMENTO DE PESQUISA

2.6.1 Entrevista

Após explicação dos objetivos da pesquisa e aceite do indivíduo em participar, foi solicitado que o mesmo assinasse o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Antes de iniciar o exame clínico, foram registrados dados sobre a idade, sexo, renda e escolaridade, conforme ficha clínica (Apêndice B).

2.6.2 Exame clínico

Para cada indivíduo foi preenchido um periograma (Apêndice B), no qual

constaram dados sobre: presença de placa visível (PPV), profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS), perda de inserção clínica (ou nível de inserção clínica – NIC), mobilidade e presença de envolvimento de furca. Para cada dente foram sondados seis sítios: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual. O exame foi realizado com luz artificial e usando odontoscópio e sonda periodontal milimetrada tipo Carolina do Norte (Trinity®), além dos equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, luvas, óculos, jaleco). Durante todo o processo, três examinadores e anotador calibrados fizeram os exames clínicos e o registro nas fichas dos indivíduos (valores de concordância Kappa $0,40 < k < 0,75$) (14).

Após o exame clínico foi realizada a coleta de saliva em tubos do tipo Falcon (15 ml) estéreis, solicitando ao indivíduo cuspir por 3 minutos (15). Esse material era armazenado em isopor com gelo e transportado, devidamente identificado, ainda no turno da manhã (no qual eram realizadas as coletas) para o Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, onde eram condicionados no freezer a -20° C para posterior isolamento do material genético.

Todo material coletado ficou sob responsabilidade da pesquisadora.

2.7 ISOLAMENTO DO DNA

Para purificação de DNA foi utilizado o kit de purificação de DNA genômico da PROMEGA (Wizard®), seguindo o protocolo do fabricante para amostras de sangue. O material foi quantificado utilizando nanodrop (Thermo Fischer®), e mantido a -20° até a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Inicialmente foram isolados DNA das amostras de saliva e das células de descamação da mucosa, porém a primeira apresentou concentrações superiores de material genético quando quantificadas e, portanto, foram selecionadas as amostras de saliva para a condução do estudo.

2.8 GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL

Os polimorfismos estudados estão localizados na região 5'UTR do gene da β -defensina-1 (*DEFB1*), no cromossomo 8p23.1(16), nas seguintes posições: -52 G>A (rs1799946), -44 C>G (rs1800972) e -20 G>A (rs11362). Os “rs” são numerações que identificam o polimorfismo para acesso no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e também para pesquisa em outras bases de dados internacionalmente.

A escolha dos polimorfismos foi baseada nos valores de MAF (Minim Allele Frequency) superiores a 0,1 (10%) nas populações caucasiana (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry - CEU) e africana (Yoruba in Ibadan, Nigeria -YRI), de acordo com as bases de dados NCBI, HapMap (17) e 1000genomes (18). Além disso, considerou-se a importância funcional dos SNPs, como alterações na expressão de hBD1 na saliva (15) e associações já descritas com a periodontite e o DM, em outras populações (6,10,13,19). É importante destacar que nenhum estudo já publicado possui o desenho e as características deste numa população do nordeste brasileiro.

A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®) (Quadro 1) e o termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®) (20). Para detecção dos genótipos de cada SNPs do gene *DEFB1*, foi utilizada uma reação com volume total de 5 μ l para cada variante, contendo aproximadamente 1 μ l de DNA molde por reação (com concentração de 25ng/ μ l), 1.25 μ l de água, 2.5 μ l do TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 0.25 μ l de cada sonda diluídas a 20x (Applied Biosystems®). Foi incluído um controle negativo (água) em cada análise e o termociclador foi programado para realizar 50 ciclos.

SNPs ID	Sequência das sondas
rs1799946 (-52)	TTCAGGAACTGGGGAGACGCTGGCT[C/T]CTTTGGAGGCT GAGCTGACAGAGGC
rs1800972 (-44)	CCCAGGATTTTCAGGAACTGGGGAGA[C/G]GCTGGCTCCTT TGGAGGCTGAGCTG
rs11362 (-20)	TCTCATGGCGACTGGCAGGCAACAC[C/T]CAGGATTTTCAG GAACTGGGGAGACG

Quadro 1. Sequência das sondas alelo-específicas para os SNPs estudados no gene *DEFB-1*.

2.9 ANÁLISE DE DADOS

As frequências alélicas e genotípicas, para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer (21). A distribuição dos genótipos e sua aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada grupo e para cada SNP foi verificada através do teste Qui-Quadrado usando o programa R project (22). O desequilíbrio de ligação entre os variantes e possíveis haplótipos foram estimados por meio do programa Haploview (23).

As possíveis associações entre os grupos e as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram realizados através do teste Exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência (Programa R project). O teste de independência da Razão de Verossimilhança foi aplicado para verificar associações com o genótipo quando não houve possibilidade de aplicar o teste Qui-quadrado de Pearson (IBM SPSS Statistics 20.0 trial version -IBM, Armonk, NY, EUA).

Para as análises, considerou-se o intervalo de confiança (IC) de 95% e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram digitados no Microsoft Excel. Além disso, o poder do estudo para cada SNP foi verificado através do software G*power 3.1.9.2 (24).

3 RESULTADOS

Nesta sessão serão apresentados os resultados descritivos para caracterização da amostra estudada, afim de estabelecer melhor compreensão do trabalho como um todo. Posteriormente, no artigo científico, serão escritos os resultados inferenciais da pesquisa, conforme perfil e normas da revista científica a que será submetido (Archives of Oral Biology – Impact Factor 2015: 1.733).

Cento e oitenta e cinco (185) indivíduos participaram do estudo, dos quais 116 (62,7%) eram DM2 com PC, com média de idade de $58,5 \pm 9,0$ anos (variando de 38 a 80 anos) e 69 (37,3%) indivíduos pertenciam ao grupo controle, com idade média de $49,6 \pm 10,7$ (variando de 35 a 77 anos).

O sexo feminino foi predominante nos dois grupos, com 74,1% no grupo dos diabéticos e 91,3% no controle. Quanto a renda, em ambos os grupos, a maioria ganha até 2 salários mínimos (81,9% e 55,1%); porém apenas 6% dos diabéticos tipo 2 estão na faixa de 2 a 4 salários mínimos, enquanto no grupo controle esse percentual sobe para 21,7% (Tabela 1).

Ao analisar os dados de escolaridade da amostra, destaca-se que a maioria dos indivíduos dos dois grupos possuem 2º grau completo (31,9% e 37,7%); entretanto, em relação ao nível de escolaridade “1º grau incompleto”, no grupo dos diabéticos observa-se um percentual de 25%, enquanto nos controles 7,2%. Outra diferença que chama atenção são valores relacionados aos indivíduos com nível superior completo, onde 15,9% dos controles se enquadram, contra 5,2% do outro grupo (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização epidemiológicas dos indivíduos estudados.

Variáveis	Grupos					
	Diabéticos tipo 2 com PC		Controles		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sexo						
Masculino	30	25,9	6	8,7	36	19,5
Feminino	86	74,1	63	91,3	149	80,5
Renda						
Até 2 SM	95	81,9	38	55,1	133	71,9
De 2 a 4 SM	7	6,0	15	21,7	22	11,9
De 4 a 10 SM	4	3,4	4	5,8	8	4,3
Não informou	10	8,6	12	17,4	22	11,9
Escolaridade						
Não sabe ler ou escrever	10	8,6	1	1,4	11	5,9
1º grau incompleto	29	25,0	5	7,2	34	18,4
1º grau completo	18	15,5	5	7,2	23	12,4
2º grau incompleto	9	7,8	8	11,6	17	9,2
2º grau completo	37	31,9	26	37,7	63	34,1
Superior incompleto	2	1,7	3	4,3	5	2,7
Universidade completa	6	5,2	11	15,9	17	9,2
Não sabe	1	0,9	0	0,0	1	0,5
Não informou	4	3,4	10	14,5	14	7,6
Total	116	100,0	69	100,0	185	100,0

Em relação aos indivíduos diabéticos tipo 2 e a PC, as severidades moderada e severa apresentaram o mesmo percentual (40,5%) e quanto a extensão da mesma doença, apresentou-se generalizada em 80,2% deles. Quanto a associação entre a severidade e extensão da PC; observou-se que 34,5% dos indivíduos apresentavam periodontite moderada generalizada e 39,7% como severa generalizada, sendo esses os maiores percentuais (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da PC entre indivíduos diabéticos tipo 2.

Variáveis	N	%
Severidade da Periodontite		
Leve	22	19,0
Moderada	47	40,5
Severa	47	40,5
Extensão da Periodontite		
Localizada	23	19,8
Generalizada	93	80,2
Classificação da periodontite		
Leve localizada	15	12,9
Leve generalizada	7	6,0
Moderada localizada	7	6,0
Moderada generalizada	40	34,5
Severa localizada	1	0,9
Severa generalizada	46	39,7
Total	116	100,0

Por fim, foi verificado o poder do estudo para cada SNP, constatando-se que os SNPs -52 e -44 apresentaram um baixo poder (0.18 e 0.22, respectivamente).

4 ARTIGO CIENTÍFICO

POLIMORFISMOS NO GENE DA β -DEFENSINA-1 E SUA RELAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE DA PERIODONTITE CRÔNICA EM DIABÉTICOS TIPO 2

RESUMO

Objetivo: Considerando a influência de polimorfismos genéticos na expressão da β -defensina-1, o importante papel desse peptídeo na resposta imune-inflamatória e a relação bidirecional entre a Periodontite Crônica (PC) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), o presente trabalho avaliou a distribuição de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região 5'UTR do gene *DEFB1* e sua relação com o desenvolvimento de PC em diabéticos tipo 2. **Materiais e métodos:** Um total de 185 indivíduos participaram do estudo, sendo 116 com DM2 e PC, e 69 controles saudáveis. Três polimorfismos funcionais conhecidos foram genotipados através de sondas alelo específicas (Sistema TaqMan®): -52 G>A (rs1799946), -44 C>G (rs1800972) e -20 G>A (rs11362). **Resultados:** Os resultados mostraram uma associação para o SNP na posição -20 G>A de *DEFB1*. O alelo G e os genótipos GA e GG foram significativamente ($p < 0.05$) mais frequentes entre indivíduos DM2 com PC (59,5%, 50% e 34,5%, respectivamente) que indivíduos saudáveis (26,8%, 36,2% e 8,7%, respectivamente). Quanto aos haplótipos, observou-se que as combinações GCG e ACG (-52,-44,-20) também foram mais frequentes entre os indivíduos DM2 com PC (28% e 23,3%, respectivamente) que em indivíduos controles (15,2% e 6,5%, respectivamente). Adicionalmente, verificou-se associações significativas da distribuição dos genótipos do SNP -20 em relação a severidade separadamente ($p = 0.021$) e a severidade /extensão da PC ($p = 0.046$). **Conclusão:** O SNP rs 11362 (-20) G>A de *DEFB1* e os haplótipos GCG e ACG (-52,-44,-20) podem estar associados com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de PC em diabéticos tipo 2, em uma população do nordeste do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes Mellitus tipo 2, Periodontite Crônica, Polimorfismo de Nucleotídeo Único, *DEFB1*

INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica e multifatorial caracterizada por defeitos na secreção e na ação do hormônio insulina, cuja interação complexa leva a hiperglicemia. É uma doença de início silencioso, sendo associada a fatores ambientais (dieta, obesidade e/ou sobrepeso, aumento da circunferência abdominal) e genéticos (Bascones-Martínez, González-Febles, & Sanz-Esporrín, 2014; Scheen, 2003).

A hiperglicemia crônica pode levar à deterioração, disfunção e falha de vários órgãos e tecidos, incluindo: olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (Bascones-Martínez, González-Febles, & Sanz-Esporrín, 2014; Scheen, 2003). Dentre as complicações apresentadas por indivíduos diabéticos, encontra-se a periodontite crônica (PC) (Lim, Tay, Sum, & Thai, 2007).

A PC é uma forma destrutiva da doença periodontal, mediada por resposta imune-inflamatória, que afeta aproximadamente 50% de todos os adultos e 60% daqueles com 65 anos de idade ou mais (Artese, Longo, Gomes, Mayer, & Romito, 2015). Os indivíduos diabéticos, que apresentam pobre controle glicêmico, estão mais propensos a ter uma periodontite severa e generalizada (Aemaimanan, Amimanan, & Taweechaisupapong, 2013). A prevalência de DM2 e PC é alta e a associação dessas duas condições, uma influenciando a outra, é reconhecida e documentada (Acharya, Thakur, & Muddapur, 2015).

Um elevado estado de inflamação sistêmica crônica pode ser induzido ou perpetuado pela PC em indivíduos diabéticos, resultando no aumento da resistência à insulina e um controle glicêmico ineficiente. A redução da inflamação periodontal pode restaurar a sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, um melhor controle metabólico (Acharya et al., 2015). Neste contexto, a imunidade inata do hospedeiro e seus peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, são de grande importância.

As β -defensinas humanas (hBDs) pertencem a uma família de pequenos peptídeos, codificados pelo cluster gênico localizado no cromossomo 8p22-23 (Linzmeier & Ganz, 2005), com amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e vírus. As hBDs atuam na resposta imune inata e também na sinalização para a resposta adaptativa (Bedi, Mahendra, & Ambalavanan, 2015). Existem 28 β -defensinas humanas (hBDs), no

entanto, as características de expressão foram demonstradas apenas em quatro delas (Arslan, Babakurban, Erbek, Sahin, & Terzi, 2015), das quais, a β -defensina-1 (hBD-1).

As hBD-1 são peptídeos antimicrobianos, responsáveis pela manutenção de um estado saudável nos epitélios das mucosas antes da infecção com bactérias patogênicas (Schaefer et al., 2010). Encontra-se presente no epitélio de defesa de vários tecidos e na saliva (Polesello et al., 2015), desempenhando importante papel na inflamação (Oppenheim, Biragyn, Kwak, & Yang, 2003). Apesar de apresentar expressão constitutiva, é sabido que patógenos microbianos e citocinas estimulam sua expressão em células epiteliais orais durante a inflamação (Arslan et al., 2015).

Variações em *DEFB1*, gene codificante da hBD-1, tem sido relacionadas com a modulação da expressão gênica e a produção da proteína (Polesello et al., 2015). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), localizados na região 5' não-traduzida (5' UTR) de *DEFB1* nas posições -52 G>A (rs1799946), -44 C>G (rs1800972) e -20 G>A (rs11362), são conhecidamente relacionados a modulação da expressão gênica e associados com algumas doenças de caráter infeccioso e ou inflamatório, como: periodontite e diabetes (Ikuta et al., 2015), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Braidia et al., 2004), aumento dos níveis de *Candida albicans* na boca (Jurevic, Bai, Chadwick, White, & Dale, 2003), lúpus (Sandrin-Garcia et al., 2012) e doença intestinais inflamatórias (Zanin et al., 2012).

Neste sentido, o presente trabalho se propõe a avaliar a distribuição de SNPs na região 5'UTR de *DEFB1* em indivíduos com DM2 e PC e indivíduos saudáveis, além da sua relação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da PC em diabéticos tipo 2.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

A população de estudo foi composta por uma amostra aleatória e não-probabilística de indivíduos oriundos da região metropolitana do Recife e cidades do interior de Estado de Pernambuco. No total a população foi composta de 185 indivíduos, sendo 116 diabéticos tipo 2 com PC e 69 indivíduos saudáveis, que

formaram o grupo controle. O recrutamento dos indivíduos foi realizado no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e na Clínica da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os indivíduos foram avaliados e separados em grupos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos:

✓ Grupo de indivíduos DM2 e PC:

Critérios de inclusão: ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de PC (American Academy of Periodontology, 2015; Armitage, 1999); ter, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) e idade mínima de 35 anos.

Critérios de exclusão: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante e usar aparelho ortodôntico.

✓ Grupo de indivíduos saudáveis (controles saudáveis):

Critérios de inclusão: ter, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) e idade mínima de 35 anos.

Critérios de exclusão: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante; usar aparelho ortodôntico; ser portador de DM e ou PC.

Para cada indivíduo foi preenchido um periograma, no qual constaram dados sobre: índice de placa visível (Ainamo & Bay, 1975), índice de sangramento (Ainamo & Bay, 1975), profundidade de sondagem (6 sítios por dente), perda de inserção clínica, mobilidade e presença de envolvimento de furca.

O diagnóstico de PC foi estabelecido segundo Associação Americana de Periodontia (American Academy of Periodontology, 2015; Armitage, 1999). Durante todo o processo, 3 (três) examinadores e anotador calibrados fizeram os exames clínicos e o registro nas fichas dos pacientes (valores de concordância Kappa >0,40).

Todos os procedimentos utilizados no estudo foram apreciados e aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (nº1310208) e da instituição coparticipante HAM (nº1368830).

Isolamento do DNA, escolha dos SNPs e genotipagem

Para a análise dos polimorfismos foram realizadas as coletas de saliva em tubos do tipo Falcon (15 ml) estéreis, solicitando ao paciente cuspir por 3 minutos. O material coletado foi armazenado no freezer a -20° C para posterior isolamento do material genético (Polesello et al., 2015).

Para isolamento do DNA foi utilizado o kit de Purificação de DNA genômico da PROMEGA (Wizard®), seguindo o protocolo do fabricante para amostras de sangue, pois o mesmo não apresenta protocolo específico para saliva. O material foi quantificado utilizando nanodrop (Thermo Fischer®), e mantido a -20° até a genotipagem. O isolamento do DNA e a genotipagem aconteceram, respectivamente, no Laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA-UFPE.

Foram escolhidos os seguintes SNPs da 5'UTR de *DEFB1*: -52 G>A (rs1799946), -44 C>G (rs1800972) e -20 G>A (rs11362), baseados no impacto das variantes na expressão gênica, em associações prévias em outras populações e nas frequências alélicas mínimas (MAF); as quais deveriam ser superiores a 0,1 (10%) nas populações caucasiana (CEU) e africana (YRI). A verificação da MAF foi realizada de acordo com as bases de dados NCBI e HapMap (The International HapMap Consortium, 2005) e 1000 gemonas (Consortium, 2015).

Todos os SNPs foram genotipados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, usando sondas alelo específicas (TaqMan®) e termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®) (Segat et al., 2010).

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer (Cox & Canzian, 2001). A distribuição dos genótipos e sua aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

(importante para avaliar se a distribuição genotípica está acontecendo ao acaso) para cada grupo e para cada SNP, foi verificada através do teste Qui-Quadrado usando o programa R (R Development Core Team, 2013). O desequilíbrio de ligação (força de associação não-aleatória entre os alelos) entre os variantes e possíveis haplótipos foram estimados por meio do programa Haploview 4.2 (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005).

As possíveis associações entre os grupos e as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram realizados através do teste Exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência pelo programa R. O teste de independência da Razão de Verossimilhança foi aplicado para verificar associações com o genótipo quando não houve possibilidade de aplicar o teste Qui-quadrado de Pearson pelo programa IBM SPSS Statistics 20.0 trial version (IBM, Armonk, NY, EUA).

Em todas as análises, foram considerados o intervalo de confiança (IC) de 95% e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Adicionalmente, o poder do estudo para cada SNP foi verificado através do software G*power 3.1.9.2 (Faul, Erdfelder, Lang, & Buchner, 2007).

RESULTADOS

No total, cento e oitenta e cinco (185) indivíduos foram recrutados para o estudo, dos quais 116 (62,7%) eram diabéticos tipo 2 com PC, com média de idade de $58,5 \pm 9,0$ anos (variando de 38 a 80 anos) e 69 (37,3%) eram indivíduos saudáveis (controles), com idade média de $49,6 \pm 10,7$ (variando de 35 a 77 anos). Em ambos os grupos, o sexo feminino foi predominante (74,1% dos DM2+PC e 91,3% dos controles).

Na tabela 1, observa-se a distribuição das frequências alélicas e genotípicas para os três SNPs na região 5'UTR de DEFB-1 na população estudada. Todos os SNPs estudados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, exceto o SNP rs1800972 (-44) no grupo controle.

Diferenças significativas foram observadas para o SNP rs11362 (-20 G>A). O alelo G foi mais frequente entre indivíduos DM2 com PC (59,5%), diferindo significativamente dos indivíduos controles (26,8%; OR=3.99; IC95%=2.48-6.53; p-

value=1.12e⁻⁰⁹). Similarmente, os genótipos GA e GG foram mais frequentes entre indivíduos DM2 com PC (50.0% e 34.5%, respectivamente) em relação aos controles saudáveis (36,2%; OR=4,83; IC95%=2.22-10.89; p-value=1.35e⁻⁰⁵; e 8,7%; OR=13.64; IC95%=4,66-46,80; p-value=2.35e⁻⁰⁸; respectivamente) (Tabela 1), sendo associado com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de periodontite crônica em indivíduos DM2. Os demais SNPs não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados.

Tabela 1. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para SNPs na região 5'UTR de *DEFB1* em indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica e indivíduos saudáveis (controles) de uma população do Nordeste Brasileiro.

SNPs/ Alelos/ Genótipos	Diabéticos tipo 2 com PC n=116 (%)	Controles Saudáveis n=69 (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value
rs1799946 (-52 G>A)			
G	117 (50.4)	72 (52.2)	Referência
A	115 (49.6)	66 (47.8)	1.07 (0.69-1.67), 0.748
GG	32 (27.6)	22 (31.9)	Referência
GA	53 (45.7)	28 (40.6)	1.30 (0.60-2.80), 0.474
AA	31 (26.7)	19 (27.5)	1.12 (0.47-2.66), 0.842
HWE	X ² = 0,86; p=0,353	X ² = 2,42; p=0,121	
rs1800972 (-44 C>G)			
C	197 (84.9)	115 (83.3)	Referência
G	35 (15.1)	23 (16.7)	0.89 (0.48-1.66), 0.768
CC	86 (74.1)	51 (73.9)	Referência
CG	25 (21.5)	13 (18.8)	1.14 (0.51-2.65), 0.850
GG	5 (4.3)	5 (7.2)	0.59 (0.13-2.72), 0.506
HWE	X ² = 2,93; p=0,087	X ² = 7,14; p=0,001	
rs11362 (-20 G>A)			
A	94 (40.5)	101 (73.2)	Referência
G	138 (59.5)	37 (26.8)	3.99 (2.48-6.53), 1.12e ⁻⁰⁹ *
AA	18 (15.5)	38 (55.1)	Referência
GA	58 (50.0)	25 (36.2)	4.83 (2.22-10.89), 1.35e ⁻⁰⁵ *
GG	40 (34.5)	6 (8.7)	13.64 (4.66-46.80), 2.35e ⁻⁰⁸ *
HWE	X ² = 0,16; p=0,688	X ² = 0,41; p=0,523	

*p-value significativo (<0.05); HWE= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; X²=Teste Qui-quadrado; OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; e=exponencial

Adicionalmente, observou-se que os SNPs na 5'UTR de *DEFB-1* estavam em moderado desequilíbrio de ligação ($D' > 0.7$), formando 8 haplótipos (Tabela 2). As combinações haplotípicas GCG e ACG foram mais frequentes em indivíduos DM2

com PC (28,0% e 23,3%, respectivamente) em comparação com os controles saudáveis (15,2%; OR=3,20; IC95%=1.64-6.43; p-value=0.0002; e 6,5%; OR=6.18; IC95%=2.65-15.88; p-value=1.79e^{-06*}, respectivamente), sendo associado com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de periodontite crônica em indivíduos DM2. As demais combinações não apresentaram diferenças significativas entre indivíduos DM2 com PC e controles saudáveis (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das frequências haplótípicas de SNPs na região 5'UTR de *DEFB1* em indivíduos diabéticos tipo 2 com periodontite crônica e controles saudáveis de uma população do Nordeste Brasileiro.

Haplótipos			Diabéticos tipo 2 com PC 2n (%)	Controles Saudáveis 2n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value
rs 1799946 (-52 G>A)	rs 1800972 (-44 C>G)	rs 11362 (-20 G>A)			
A	C	A	47 (20.3)	49 (35.5)	Referência
G	C	A	31 (13.4)	36 (26.1)	0.90 (0.46-1.76), 0.752
G	C	G	65 (28.0)	21 (15.2)	3.20 (1.64-6.43), 0.0002*
A	C	G	54 (23.3)	9 (6.5)	6.18 (2.65-15.88), 1.79e ^{-06*}
G	G	A	12 (5.2)	8 (5.8)	1.56 (0.53-4.82), 0.463
A	G	A	4 (1.7)	8 (5.8)	0.52 (0.11-2.12), 0.369
G	G	G	9 (3.9)	7 (5.1)	1.34 (0.40-4.60), 0.788
A	G	G	10 (4.3)	0 (0.0)	Nc

*p-value significativo (<0.05); nc=não calculado, OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; e=exponencial

A distribuição genotípica para o SNP rs11362 (-20 G>A) entre indivíduos DM2 com PC foi associada com a severidade separadamente (p-value=0.021) e com a classificação (severidade e extensão) da PC (p-value=0.046) (Tabela 3). Para os outros SNPs não foram observadas associações significativas.

Tabela 3. Distribuição genotípica do SNP rs11362 (-20) G>A segundo a severidade e a severidade/extensão da periodontite crônica nos pacientes diabéticos tipo 2.

PERIODONTITE CRÔNICA (PC)	rs11362 (-20 G>A)			p-value ¹
	GG n(%)	GA n(%)	AA n(%)	
Severidade				
Leve	12(30,0)	8(13,8)	2(11,1)	0,021*
Moderada	19(47,5)	19(32,8)	9(50,0)	
Severa	9(22,5)	31(53,4)	7(38,9)	
Classificação da PC				
Leve localizada	8(20)	6(10,3)	1(5,6)	0,046*
Leve generalizada	4(10)	2(3,4)	1(5,6)	
Moderada localizada	1(2,5)	4(6,9)	2(11,1)	
Moderada generalizada	18(45)	15(25,9)	7(38,9)	
Severa localizada	0 (0,0)	0 (0,0)	1(5,6)	
Severa generalizada	9(22,5)	31(53,4)	6(33,3)	

1 - Teste da Razão de Verossimilhança, * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

Em relação as demais variáveis clínicas da PC (profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, sangramento à sondagem e índice de placa visível), não foram observadas associações com a distribuição genotípica para os SNPs estudados.

Por fim, foi verificado o poder do estudo para cada SNP, constatando-se que os SNPs -52 e -44 apresentaram um baixo poder (0.18 e 0.22, respectivamente).

DISCUSSÃO

Altos níveis de mediadores inflamatórios podem estar relacionados à destruição periodontal e serem capazes de aumentar a resposta inflamatória, provocando maiores danos ao tecido periodontal, característicos da periodontite severa. Foi sugerido que este padrão de resposta aos estímulos ambientais pode ser geneticamente determinado e pode predispor a algumas doenças inflamatórias crônicas (Franch-Chillida, Nibali, Madden, Donos, & Brett, 2010).

A β -defensina-1, um dos peptídeos antimicrobianos presente na saliva, é responsável pela manutenção da saúde dos epitélios das mucosas, bem como

desempenha importante papel na inflamação (Arslan et al., 2015; Oppenheim et al., 2003; Polesello et al., 2015; Schaefer et al., 2010). Sabe-se que variações genéticas em seu gene codificador *DEFB1* pode alterar a expressão da proteína. Adicionalmente, a periodontite, uma forma destrutiva de doença periodontal mediada pela resposta imune-inflamatória, é considerada a sexta complicação mais frequente entre indivíduos com DM2 (Lim et al., 2007). Neste sentido, o presente estudo se propôs a avaliar a distribuição de SNPs da região 5'UTR (-52, -44 e -20) do gene *DEFB-1* em indivíduos DM2 com PC e indivíduos saudáveis, e a relação destes com o desenvolvimento de PC em indivíduos DM2.

Os resultados sugeriram que o SNP rs11362 (-20) encontra-se relacionado com o desenvolvimento de PC em indivíduos DM2. O alelo G, os genótipos GA e GG, e os haplótipos GCG e ACG apresentaram-se mais frequentes em indivíduos DM2 com PC, sendo associado com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da PC.

Embora as bactérias sejam essenciais, mas não o único fator, para a iniciação e progressão da PC, estudos em gêmeos indicam que cerca de 50-60% da variação observada na expressão da doença clínica, em adultos, é geneticamente determinada (Wu et al., 2015). Polimorfismos funcionais relacionados à inflamação e à imunidade, que alteram a quantidade ou qualidade das proteínas produzidas, já foram demonstrados por possuir associações significativas com as periodontites crônica e agressiva (Brett et al., 2005).

Neste trabalho, a escolha das três variantes na região 5'UTR de *DEFB1* foi encorajada devido ao possível impacto na expressão gênica (Fabris et al., 2009; Milanese, Segat, & Crovella, 2007; Polesello et al., 2015). Estudos recentes tem associado variantes nesta região com aumento da susceptibilidade a infecção pelo HIV-1 (Milanese et al., 2006), ao lúpus eritematoso sistêmico (Sandrin-Garcia et al., 2012), ao risco de desenvolvimento de cárie (Navarra et al., 2016; Ozturk, Famili, & Vieira, 2010) e também ao aumento concentração de hBD-1 na saliva de indivíduos saudáveis (Polesello et al., 2015); por outro lado, outros estudos não obtiveram associações significativas com susceptibilidade a tuberculose (Celerino et al., 2016), a doença inflamatória intestinal (Zanin et al., 2012), a periodontite de início precoce (Boniotto et al., 2004) e a PC em indivíduos DM2 (Cimões et al., 2014).

Apesar da ausência de uma avaliação funcional do impacto de cada genótipo dos diferentes SNPs da região 5'UTR de *DEFB1* em indivíduos DM2 com PC na população analisada, o que seria muito interessante para identificar o papel da hBD-1 no contexto da PC, os presentes resultados apontam um caminho para isso.

Um estudo recente, avaliou a concentração do peptídeo hBD-1 na saliva de 40 indivíduos saudáveis, encontrando associações significativas entre os níveis desse antimicrobiano e variantes nas posições -52 e -44 da região 5'UTR da *DEFB-1*. Além disso, análises haplotípicas mostraram que essas variantes podem atuar sinergicamente na modulação dos níveis proteicos (Polesello et al., 2015), o que corrobora com esse estudo, visto que na presente população os SNPs estudados estão em desequilíbrio de ligação.

Em relação às mais prevalentes doenças bucais, doença periodontal e cárie, os SNPs -20 e -52 da *DEFB-1* foram associados, respectivamente, com o aumento e a diminuição do risco (Ozturk et al., 2010). Adicionalmente, SNPs -20 e -52 em *DEFB1* foram associados com o índice CPO-d (dentes cariados, perdidos e obturados) em adultos italianos (Navarra et al., 2016). No presente estudo, também verificou-se associação da distribuição genotípica com a severidade e a severidade/extensão da PC. No entanto, tal associação não foi verificada para PC severa generalizada na população norte-americana (Wohlfahrt, Wu, Hodges, Hinrichs, & Michalowicz, 2006), possivelmente devido às diferenças étnicas entre as populações estudadas.

Embora não se tenha identificado uma associação significativa entre *DEFB1* e PC em diabéticos tipo 2 para os SNPs -44 e -52, vale salientar que um efeito mínimo desses polimorfismos pode ter sido perdido devido ao tamanho da amostra. Assim, não pode-se descartar o envolvimento de tais variantes no desenvolvimento da PC; visto que as mesmas, funcionalmente, alteram a expressão da hDB-1 na saliva (Polesello et al., 2015) e pelo fato do número de indivíduos em ambos os grupos estudados serem baixos, conforme foi evidenciado pela análise de poder do estudo ($\text{power} < 0.3$). O baixo número amostral pode estar relacionado aos rigorosos critérios de inclusão e exclusão utilizados no estudo, que apesar de caracterizar bem os grupos, evitando viés na pesquisa e permitindo comparações mais fidedignas, dificultaram a formação de grupos mais numerosos, principalmente em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. O baixo número de indivíduos saudáveis (controle)

também pode explicar a falta de aderência do SNP -44 ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Além disso, a realização do cálculo amostral, para verificar se o tamanho da amostra era suficiente para obtenção de associações significativas, revelou que, nas frequências genótípicas encontradas para o SNP -20, como o “fator de risco”, com um poder β de 80%, seria necessária uma amostra de 66 indivíduos, sendo 47 no grupo caso e 19 no controle, o que se mostrou condizentes com nosso número amostral. Para os demais SNPs, o número de indivíduos necessários era superior a 500 indivíduos.

Por fim, uma maior compreensão de como variantes genéticas em peptídeos antimicrobianos atuam nas condições de saúde, gengivite e periodontite, pode abrir novas oportunidades para identificação, prevenção e tratamento de doenças periodontais (Bedi et al., 2015), inclusive para o desenvolvimento de futuros métodos diagnósticos e terapêuticos, baseados no perfil genético de indivíduos diabéticos e portadores de PC. Isso tudo também auxiliará os profissionais de saúde a conhecer o risco genético das doenças antes do estabelecimento da mesma e, assim, fornecer ao indivíduo um acompanhamento personalizado e eficaz

CONCLUSÃO

Para a população estudada, os resultados indicam que as variações genéticas de *DEFB1* (SNP -20: alelo G e genótipos GA e GG), podem estar associadas com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de PC em diabéticos tipo 2, como também com o fenótipo da condição periodontal desses indivíduos (severidade e extensão da doença). Dois dos haplótipos formados por SNPs na 5'UTR de *DEFB1* (GCG e ACG) também podem estar envolvidos com o aumento dessa susceptibilidade. Tudo isso indica a importância da imunidade inata no contexto multifatorial da PC, sugerindo que polimorfismos em *DEFB1* podem ser considerados como potenciais marcadores de risco para a PC.

‘Esta pesquisa não recebeu qualquer concessão específica de agências de financiamento.’

REFERÊNCIAS

- Acharya, A. B., Thakur, S., & Muddapur, M. V. (2015). Effect of scaling and root planing on serum interleukin-10 levels and glycemic control in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(2), 188–93.
- Aemaimanan, Piyamas; Amimanan, Piyawan; Taweechaisupapong, S. (2013). Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe*, 22, 64–68.
- Ainamo, J., & Bay, I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal*, 25(4), 229–35.
- American Academy of Periodontology. (2015). American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 86(7), 835–838.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6.
- Arslan, F., Babakurban, S. T., Erbek, S. S., Sahin, F. I., & Terzi, Y. K. (2015). Chronic tonsillitis is not associated with beta defensin 1 gene polymorphisms in Turkish population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79(4), 557–560.
- Artese, H. P. C., Longo, P. L., Gomes, G. H., Mayer, M. P. A., & Romito, G. A. (2015). Supragingival biofilm control and systemic inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Brazilian Oral Research*, 29(1), 1–7.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263–265.
- Bascones-Martínez, A., González-Febles, J., & Sanz- Esporrín, J. (2014). Diabetes and periodontal disease. Review of the literature. *American Journal of Dentistry*, 27(April), 63–67.
- Bedi, T., Mahendra, J., & Ambalavanan, N. (2015). Defensins in periodontal health Occurrence and Distribution Role of Defensins in Immune Response Gingival Defensins. *Indian Journal of Dental Research*, 26(4), 340–344.
- Boniotto, M., Hazbón, M. H., Jordan, W. J., Lennon, G. P., Eskdale, J., Alland, D., & Gallagher, G. (2004). Novel hairpin-shaped primer assay to study the association of the -44 single-nucleotide polymorphism of the DEFB1 gene with early-onset periodontal disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4), 766–769.
- Braida, L., Boniotto, M., Pontillo, A., Tovo, P. A., Amoroso, A., & Crovella, S. (2004). A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensi 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian Children. *Journal of the International Aids Society*, 18(11), 1598–1600.
- Brett, P. M., Zygogianni, P., Griffiths, G. S., Tomaz, M., Parkar, M., D’Aiuto, F., &

- Tonetti, M. (2005). Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, *84*(12), 1149–1153.
- Celerino, R.; Da Cruz, H.; Brandão, L.; Guimarães, R.; Montenegro, L.; Schindler, H.; Segat, L.; Crovella, S. (2016). DEFB1 gene polymorphisms and tuberculosis in a Northeastern Brazilian population. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 389–393.
- Cimões, R., Siqueira, R. A. C., Souza, P. R. E. de, Crovella, S., & Donos, N. (2014). A fast method for DEFB1-44C / G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. *Acta Stomatologica Croatica*, *48*(3), 208–215.
- Consortium, T. 1000 G. P. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*, 68–73.
- Cox, D. G., & Canzian, F. (2001). Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *17*(8), 738–739.
- Fabris, A., Catamo, E., Segat, L., Morgutti, M., Arraes, L. C., De Lima-Filho, J. L., & Crovella, S. (2009). Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS*, *23*(2), 177–182.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, *39*(2), 175–91.
- Franch-Chillida, F., Nibali, L., Madden, I., Donos, N., & Brett, P. (2010). Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology*, *37*(2), 137–144.
- Ikuta, T., Inagaki, Y., Tanaka, K., Saito, T., Nakajima, Y., Bando, M., ... Nagata, T. (2015). Gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*, *103*(1), 66–74.
- Jurevic, R. J., Bai, M., Chadwick, R. B., White, T. C., & Dale, B. a. (2003). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human β -defensin 1: High-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 90–96.
- Lim, L. P., Tay, F. B. K., Sum, C. F., & Thai, A. C. (2007). Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, *34*(2), 118–23.
- Linzmeier, R. M., & Ganz, T. (2005). Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics*, *86*(4), 423–30.
- Milanese, M., Segat, L., & Crovella, S. (2007). Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Research*, *67*(12), 5997; author reply 5997.
- Milanese, M., Segat, L., Pontillo, A., Arraes, L. C., Lima Filho, J. L. de, & Crovella, S. (2006). DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *Journal of the International Aids Society*, *20*(12), 1673–1675.

- Navarra, C. O., Robino, A., Pirastu, N., Bevilacqua, L., Gasparini, P., Di Lenarda, R., & Crovella, S. (2016). Caries and Innate Immunity: DEFB1 Gene Polymorphisms and Caries Susceptibility in Genetic Isolates from North-Eastern Italy. *Caries Research*, *50*(6), 589–594.
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*, *62*(2), ii17–ii21.
- Ozturk, A., Famili, P., & Vieira, A. R. (2010). The antimicrobial peptide DEFB1 is associated with caries. *Journal of Dental Research*, *89*(6), 631–636.
- Polesello, V., Zupin, L., Di Lenarda, R., Biasotto, M., Ottaviani, G., Gobbo, M., Segat, L. (2015). Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. *Archives of Oral Biology*, *60*(7), 1054–1058.
- R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Sandrin-Garcia, P., Brandao, L., Guimaraes, R., Pancoto, J., Donadi, E., Lima-Filho, J. D., ... Crovella, S. (2012). Functional single-nucleotide polymorphisms in the DEFB1 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians. *Lupus*, *21*(6), 625–631.
- Schaefer, A. S., Richter, G. M., Nothnagel, M., Laine, M. L., Rühling, A., Schäfer, C., ... Schreiber, S. (2010). A 3' UTR transition within DEFB1 is associated with chronic and aggressive periodontitis. *Genes and Immunity*, *11*(1), 45–54.
- Scheen, A. J. (2003). Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Acta Clinica Belgica*, *58*(6), 335–341.
- Segat, L., Morgutti, M., Athanasakis, E., Trevisiol, C., Amaddeo, A., Poli, F., & Crovella, S. (2010). Analysis of DEFB1 regulatory SNPs in cystic fibrosis patients from North-Eastern Italy. *International Journal of Immunogenetics*, *37*(3), 169–175.
- The International HapMap Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, *437*, 1299–1320.
- Wohlfahrt, J. C., Wu, T., Hodges, J. S., Hinrichs, J. E., & Michalowicz, B. S. (2006). No Association Between Selected Candidate Gene Polymorphisms and Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, *77*(3), 426–436.
- Wu, X., Offenbacher, S., López, N. J., Chen, D., Wang, H. Y., Rogus, J., Kornman, K. (2015). Association of interleukin-1 gene variations with moderate to severe chronic periodontitis in multiple ethnicities. *Journal of Periodontal Research*, *50*(1), 52–61.
- Zanin, V., Segat, L., Bianco, A., Padovan, L., Tavares, N., & Crovella, S. (2012). DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Clinics*, *67*(4), 395–398.

5 CONCLUSÃO

Para a população estudada, os resultados indicam que as variações genéticas de *DEFB1* (SNP -20: alelo G e genótipos GA e GG), podem estar associadas com uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de PC em diabéticos tipo 2, como também com o fenótipo da condição periodontal desses indivíduos (severidade e extensão da doença). Dois dos haplótipos formados por SNPs na 5'UTR de *DEFB1* (GCG e ACG) também podem estar envolvidos com o aumento dessa susceptibilidade. Tudo isso indica a importância da imunidade inata no contexto multifatorial da PC, sugerindo que polimorfismos em *DEFB1* podem ser considerados como potenciais marcadores de risco para a PC.

REFERÊNCIAS (Introdução e Metodologia)

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(SUPPL.1):81–90.
2. López NJ, Quintero A, Casanova P a, Martínez B. Three-Monthly Routine Prophylaxes Improves Chronic Periodontitis Status in Type 2 Diabetes. *J Periodontol*. 2014;85(7):232–40.
3. Cortelli JR, Márcia R, Pinheiro S, De Oliveira Costa F, Aquino DR, Raslan SA, et al. Salivary and microbiological parameters of chronic periodontitis subjects with and without type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Rev Odontol UNESP Rev Odontol UNESP*. 2014;43(433):196–202.
4. Mealey BL, Oates TW. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289–303.
5. American Academy of Periodontology. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2015;86(7):835–8.
6. Ertugrul AS, Dikilitas A, Sahin H, Alpaslan N, Bozoglan A, Tekin Y. Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensins 1 and 3 in subjects with periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *J Periodontal Res*. 2013;48(4):475–82.
7. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–7.
8. Jarczak J, Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, et al. Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1069–79.
9. Banjar W, Alshammari MH. Genetic factors in pathogenesis of chronic periodontitis. *J Taibah Univ Med Sci. Elsevier Ltd*; 2014;9(3):245–7.
10. Németh BC, Várkonyi T, Somogyvári F, Lengyel C, Fehértemplomi K, Nyiraty S, et al. Relevance of α - defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9128–37.
11. Jurevic RJ, Chrisman P, Mancl L, Livingston R, Dale B a. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet Test*. 2002;6(4):261–9.
12. Armitage GC. Development of a classification system for current nursing research. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1–6.
13. Cimões R, Siqueira RAC, Souza PRE de, Crovella S, Donos N. A fast method for DEFB1-44C / G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. *Acta Stomatol Croat*. 2014;48(3):208–15.
14. Bello DMA, Araújo NC, Siqueira RAC de, Souza PRE de, Cimões R. Comparação de critérios de diagnóstico clínico de periodontite em diabéticos. *Braz J Periodontol*. 2016;26(03):14–8.

15. Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R, Biasotto M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. *Arch Oral Biol*. Elsevier Ltd; 2015;60(7):1054–8.
16. Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: Comprehensive analysis of independent variation in α - and β -defensin regions at 8p22–p23. *Genomics*. 2005;86(4):423–30.
17. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299–320.
18. Consortium T 1000 GP. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68–73.
19. Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, et al. Gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*. 2015 Jan;103(1):66–74.
20. Segat L, Morgutti M, Athanasakis E, Trevisiol C, Amaddeo A, Poli F, et al. Analysis of DEFB1 regulatory SNPs in cystic fibrosis patients from North-Eastern Italy. *Int J Immunogenet*. 2010;37(3):169–75.
21. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics*. 2001;17(8):738–9.
22. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
23. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263–5.
24. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007 May;39(2):175–91.

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

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); Secretária 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. Também participam dessa pesquisa: Rayanne Soraia Aguiar de Melo Dias (mestranda em odontologia UFPE-999495129), Felipe Rodrigues de Almeida (mestrando em odontologia UFPE - 999728554), Roberto Carlos Mourão Pinho (doutorando em odontologia UFPE - 988098147) e Professor Francisco Bandeira (Chefe do setor de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães- 31841601).

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 (chamada popularmente de piorrêia), 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. Cada paciente será avaliado através de um exame clínico, onde será medida a profundidade da gengiva ao redor dos dentes, observando se haverá algum sangramento e se há placa bacteriana visível (que se formam dos restos de comida deixados pela má escovação) e a altura do osso ao redor dos dentes. No mesmo momento serão coletadas amostras de saliva (o paciente cospe num tubinho estéril o que conseguir) e amostras de células da parte interna da bochecha da boca (esfregando levemente com uma escova pequena). 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 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.

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 principal, 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). Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(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 desenvolvimento da 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 – FICHA CLÍNICA

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

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. Tipo de diabetes: _____

11. Diabético há quanto tempo: _____

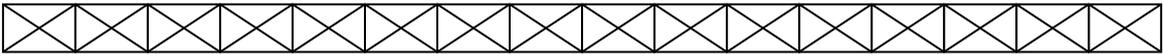
12. Medicamentos que utiliza: _____

13. Usa insulina? Tipo e dose? Há quanto

tempo? _____

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



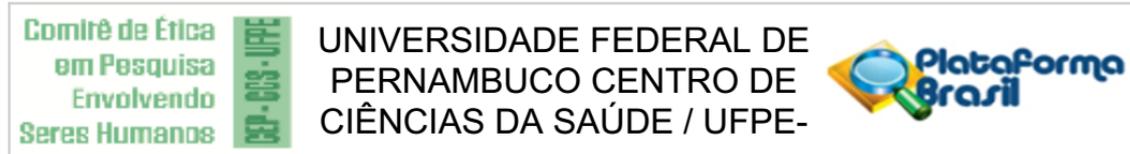
PLACA: Faces _____ % _____



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



ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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 Soraia 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:

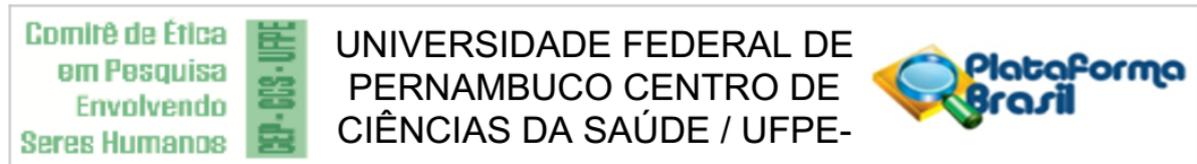
Objetivo Geral:

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;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

- 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.

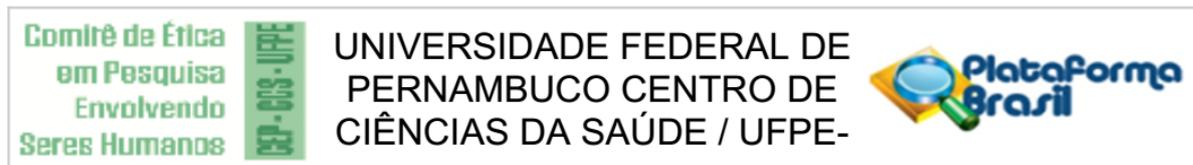
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável obedecendo a Resolução CNS N°466/12 anexou os seguintes documentos que atendem a resolução:

- 1-Os currículos 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 materiais;
- 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:

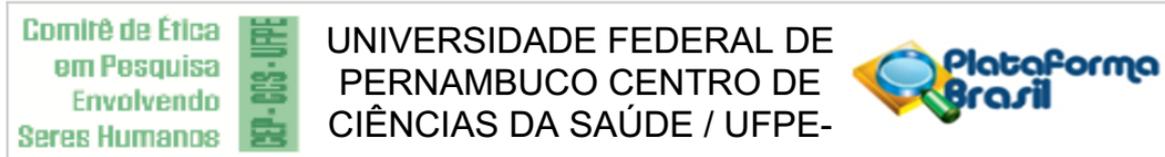
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", 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 N° 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

Endereço: Av. da Engenharia s/n° - 1° andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

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 14:48:31	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

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

Continuação do Parecer: 1.310.208

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)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM



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 sanguínea 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)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br



HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM



Continuação do Parecer: 1.368.830

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



Continuação do Parecer: 1.368.830

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 17:28:00	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
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

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



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_APPENDICE_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 – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO



ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0003-9969

DESCRIPTION

Archives of Oral Biology operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/aob> to submit a paper.

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the **oral** and **craniofacial** sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of **craniofacial development** and **disease**, including: **Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Cellular microbiology Embryology Syndromology Forensic dentistry** The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

IMPACT FACTOR

2015: 1.733 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

Abstracts in Anthropology
 Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
 Agris
 Animal Breeding Abstracts
 Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
 Arts and Humanities Citation Index
 BIOBASE
 BIOSIS
 Elsevier BIOBASE
 Cancerlit
 Chemical Abstracts
 Current Contents/BIOMED Database
 Current Contents/Life Sciences
 Current Contents/SciSearch Database
 Current Contents/Science Citation Index
 Dairy Science Abstracts
 MEDLINE®
 Index Veterinarius
 Medical and Surgical Dermatology
 GeoRef
 Nutrition Research Newsletter
 Pascal
 Research Alert
 Review of Medical and Veterinary Entomology
 SPORTDiscus
 Science Citation Index
 Scisearch
 Soils and Fertilizers
 Sugar Industry Abstracts
 Tropical Diseases Bulletin
 UnCover
 Veterinary Bulletin
 Biological Abstracts
 Current Awareness in Biological Sciences
 CABI Information
 TOXFILE
 BIOSIS Previews
 SIIC Data Bases
 Inside Conferences
 Gale Database of Publications & Broadcast Media
 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)
 Inpharma Weekly
 PharmacoEconomics and Outcomes News
 Reactions Weekly
 Scopus
 Global Health
 Vitis Viticulture and Enology Abstracts
 Nutrition Abstracts and Reviews Series
 Pig News and Information
 Zoological Record
 ISI Science Citation Index
 Abstracts of Mycology
 AgBiotech News and Information
 Maize Abstracts Online
 Postharvest News and Information
 Review of Agricultural Entomology
 Small Animals
 Soybean Abstracts (Online Edition)
 Speleological Abstracts
 BIOSIS Toxicology
 CSA/ABI Informa Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK

G.R. Holland, Department of Cariology, Restorative Sciences and Endodontics, School of Dentistry, The University of Michigan, 1011 N. University, Ann Arbor, MI 48109-1078, USA

Associate Editors:

S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

G. Murray, University of Sydney, Australia

G. N. Belibasakis, Karolinska Institute, Sweden

F. Lundy, Queen's University, Belfast

Editorial Board:

G.H. Carpenter, London, UK

M. Cole, Georgetown, USA

B. Dale-Crunk, Seattle, USA

C. Dawes, Manitoba, Canada

M.J. Dixon, Manchester, UK

C.W.I. Douglas, Sheffield, UK

X. Duan, Xi'an, Shaanxi

J.A. Garlick, Stony Brook, USA

D. Grenier, Quebec, Canada

S. Herring, Seattle, USA

T. Itota, Hyogo, Japan

M. Jontell, Göteborg, Sweden

R. Jordan, San Francisco, USA

H. Larjava, Vancouver, Canada

M. MacDougall, San Antonio, USA

S. Marshall, San Francisco, USA

J.R. Martinez, Bethesda, USA

C.P. McArthur, Kansas City, USA

C. McCulloch, Toronto, Canada

M. McCullough, Melbourne, Australia

M. McKee, Montreal, Canada

A.M. Moursi, Columbus, USA

M. Narhi, Turku, Finland

J. Richman, Vancouver, Canada

J.Y. Ro, Maryland, USA

C. Robinson, Leeds, UK

T. Salo, Oulu, Finland

L.P. Samaranayake, Queensland, Australia

B.J. Sessle, Toronto, Canada

P.T. Sharpe, London, UK

A.J. Smith, Birmingham, UK

P. Stashenko, Boston, USA

D. Steinberg, Jerusalem, Israel

H. Suda, Tokyo, Japan

A.L. Symons, Brisbane, Australia

T. Takata, Hiroshima, Japan

S. Tanase, Gifu, Japan

K. Tanne, Hiroshima, Japan

H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands

L. Villanueva, Paris, France

L.J. Walsh, Brisbane, Australia

T. Wright, North Carolina, USA

T. Zelles, Budapest, Hungary

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA
Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")

- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>