

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA**

ANA CAROLINA DE SOUZA LEITÃO ARRUDA FALCÃO

**AVALIAÇÃO PERIODONTAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 1 E POLIMORFISMOS EM LÓCUS GÊNICOS DA
IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) E TNF α (-308)**

**Recife
2018**

ANA CAROLINA DE SOUZA LEITÃO ARRUDA FALCÃO

**AVALIAÇÃO PERIODONTAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 1 E POLIMORFISMOS EM LÓCUS GÊNICOS DA
IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) E TNF α (-308)**

Tese de Doutorado 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 Doutora em Odontologia área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa.Dra.Renata Cimões Jovino
Silveira

Co-orientador: Prof.Dr.Paulo Roberto Eleutério de
Souza

Recife – PE

Recife

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

- F178a Falcão, Ana Carolina de Souza Leitão Arruda.
Avaliação periodontal de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 e polimorfismos em loci gênicos da IL 1 β (+3954), IL6 (-174), IL 10 (-1082) e TNF α (-308) / Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão. – Recife: o autor, 2018.
119 f.; 30 cm.
- Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em odontologia.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Gengivite. 3. Periodontite. 4. Polimorfismo genético. 5. Interleucinas. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (orientadora). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 092)

ANA CAROLINA DE SOUZA LEITÃO ARRUDA FALCÃO

Aprovado em 09 de fevereiro de 2018

“AVALIAÇÃO PERIODONTAL DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E POLIMORFISMOS EM LÓCUS GÊNICOS DA IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) E TNF α (-308).”

Orientadora: Profa. Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA

Banca Examinadora:

5° _____
Profa. Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador Interno)

4° _____
Prof. Dr. ARNALDO DE FRANÇA CALDAS JUNIOR
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador Interno)

3° _____
Profa. Dra. MARIA LUIZA DOS ANJOS PONTUAL
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador Interno)

2° _____
Profa. Dra. MARCIA MARIA VENDICIANO BARBOSA VASCONCELOS
Universidade Federal de Pernambuco
(Examinador Interno)

1° _____
Prof. Dr. ULLY DIAS NASCIMENTO TAVORA CAVALCANTI
UNINASSAU
(Examinador Externo)

Dedico este trabalho a minha filha Maria Clara, criança que preenche todos os meus dias com sua luz, alimentando o meu sentimento de plenitude como mulher e enternecendo-me com os desafios da maternidade. Minha companheira de todas as horas, que me ensina, que me afaga. Que com uma maturidade peculiar soube desculpar minhas ausências durante essa jornada e sempre me recebeu com seu forte abraço. Por você sempre busco ser uma profissional melhor, um ser humano melhor, para que eu possa ser exemplo para suas aspirações, com ética e retidão. Que Deus sempre nos encha de saúde e bênçãos, para que possamos continuar nossas jornadas muito amigas e bem vivenciando os frutos das sementes que agora estamos plantando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me ensinar diariamente a ter fé, pois para quem nele crê, nada faltará;

Agradeço ao amor incondicional dos meus pais, Paulo e Angela. Aqueles que sempre me ensinaram sobre o valor da educação, incentivando-me em cada capacitação, em cada conquista, sempre dispostos a ajudar nos momentos de dificuldades e a brindar por minhas alegrias;

Agradeço ao meu marido Érico, por seu companheirismo, permitindo-nos buscar melhores caminhos para uma vida em família, mas sem nos privarmos de realizar sonhos pessoais;

Agradeço a João, enteado, e à Maria Clara, filha, por deixarem a minha vida melhor, ensinando-me que independente da “genética”, a maternidade é uma bênção de Deus, que nos enche de alegrias e nos fortalece diariamente;

Agradeço aos demais familiares e amigos que emanam boas energias para mim. Num universo moderno tão repleto de discursos falaciosos, poder honestamente contar com vocês é um bem precioso, que sempre espero fazer jus;

Agradeço à Ubiracira, Bira, minha secretária, que assumiu minhas ausências, sempre com muito amor por minha família e por minha casa, permitindo que o coração de uma mãe, esposa e dona de casa trabalhasse em paz;

Agradeço aos colegas de trabalho da Prefeitura Municipal do Ipojuca e do Centro Universitário Maurício de Nassau, que permitiram minhas faltas e sempre incentivaram o meu crescimento profissional;

Agradeço aos meus alunos e pacientes, pelo carinho e torcida de sempre. Vocês me inspiram a sempre buscar mais pelo saber;

Agradeço aos colegas da Pós-graduação e do grupo de Pesquisa, que de forma mais ou menos próxima, puderam contribuir nesta caminhada. Em especial, à

Marcela Sandy, graduanda, que nas fases iniciais da pesquisa, esteve semanalmente comigo, enfrentando as dificuldades dos serviços públicos de saúde. Com grande entusiasmo, soube cumprir com dedicação e amizade, as tarefas a ela solicitadas;

Agradeço a todos os professores que me ensinaram durante o Doutorado. Cada um com seu jeito, com seu carisma ou competência, mas certamente todos, co-responsáveis por todas as contribuições que o curso me proporcionou. O meu reconhecimento, o meu respeito;

Agradeço a todos os funcionários do Programa de Pós-graduação, que com seus cafezinhos, ou oferecendo salas limpas, ou informações precisas e documentos em ordem, souberam nos receber com carinho e atenção, tornando o nosso dia a dia uma tarefa mais fácil;

Agradeço a todos os amigos que fiz no Laboratório de Genética e Sequenciamento, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Obrigada pelo carinho diário dos acadêmicos, professores e funcionários, permitindo um ambiente sempre muito amistoso e produtivo.

Agradeço ao biólogo Erinaldo Santos, quem esteve sempre ao meu lado, no laboratório de Genética. Por seus ensinamentos, por sua disponibilidade e amizade, sempre pronto a ajudar e fazer-nos sorrir, quando entre os vários géis de agarose, tudo parecia interminável;

Agradeço ao meu co-orientador, o Professor Paulo Roberto, da UFRPE, pela oportunidade de trabalharmos juntos. Um docente amigo, que com ética e sabedoria pôde nortear os meus caminhos na Genética Humana. Ao senhor, a minha admiração.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço em especial a minha orientadora, professora Renata Cimões, que sempre ativa em prol da ciência, soube ter sensibilidade ao enxergar a importância da pesquisa integrada, valorizando as diversas competências, na busca por evidências científicas. O desenvolvimento desta Tese pôde unir áreas de atuação habitualmente distantes, como a Odontopediatria, a Periodontia e a Genética, com resultados que certamente beneficiarão a comunidade acadêmica. Obrigada por seu acolhimento e pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa que tem trazido relevantes contribuições Nacionais e Internacionais. Sempre enaltecendo o valor da educação na nossa transformação, minha gratidão.

RESUMO

Avalia a condição periodontal de crianças e adolescentes com Diabetes mellitus tipo 1(DM1) e de pacientes saudáveis e pesquisar polimorfismos em loci gênicos das interleucinas IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) e TNF α (-308). Foi realizado um estudo caso-controle, com uma amostra de conveniência com 60 casos e 100 controles, com indivíduos entre 6 e 13 anos de idade. Todos os pacientes foram submetidos ao exame clínico periodontal, onde foram avaliados o Nível de Inserção Clínica (NIC), a Profundidade de Sondagem (PS), o Sangramento à Sondagem (SS) e o Índice de Placa Visível (IPV). Para a análise genética, foram coletadas amostras de saliva e após extração do DNA genômico, foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase, com primers específicos para cada locus de interesse e realizadas as genotipagens em géis de agarose. O controle glicêmico foi avaliado, a partir da coleta dos valores atualizados da hemoglobina glicada (HbA1c) dos pacientes com DM1. Nas análises estatísticas, foram empregados o teste Qui-quadrado de Pearson e o de razão de Verossimilhança e o teste de Mann Whitney. A distribuição genotípica entre os grupos, para os loci gênicos da IL1, IL6 e IL10 não apresentaram significância estatística. Para o locus do TNF α , o genótipo GG foi mais presente entre os pacientes sem DM1. Não foi diagnosticada a doença periodontal (DP) e assim, não foi possível associar os genótipos a essa doença. Os pacientes do grupo controle apresentaram maior média de IPV (72,52 %) e PS (30,90% dos sítios), ($p < 0,05$). Os pacientes com DM1 apresentaram maior número de sítios com Sangramento à Sondagem (9,56%), com associação positiva entre SS e controle glicêmico inadequado ($p < 0,05$). Neste estudo, com base nos critérios objetivos, crianças e adolescentes não foram diagnosticadas com DP, embora tenham apresentado alto Índice de Placa Visível e baixo controle glicêmico. Na análise molecular, os genótipos não puderam ser associados à doença periodontal, mas o alelo G e o genótipo GG para o TNF α (-308) representaram fator de proteção ao desenvolvimento do DM1. Futuras pesquisas são necessárias para melhor esclarecer a etiopatogenia da DP nesses grupos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Tipo 1. Gengivite. Periodontite. Polimorfismo Genético. Interleucinas.

ABSTRACT

To assess the periodontal status of children and adolescents with DM1 and healthy patients and to investigate polymorphisms in the interleukins IL1 β (+3954), IL6 (-174), IL10 (-1082) and TNF α (-308). A case-control study was carried out, with a convenience sample, with 60 cases and 100 controls, with individuals between 6 and 13 years of age. All patients underwent periodontal clinical examination, where they were evaluated Clinica Attachment Level (CAL), Probing Depth (PD), Bleeding on Probing (BOP) and Presence of Visible Plaque (IVP). For the genetic analysis, samples of saliva were collected and after extraction of the genomic DNA, Polymerase Chain Reactions were carried out, with specific primers for each locus of interest and the genotypes were performed in agarose gels. Glycemic control was assessed from the collection of the updated values of glycated hemoglobin (HbA1c) in patients with DM1. Pearson's chi-square test and likelihood ratio test and The Mann Whitney were used for statistical analysis. The genotypic distribution for the IL1, IL6 and IL10 gene loci did not present statistical significance between the groups. For the TNF α locus, GG genotype was more present among patients without DM1. PD was not diagnosed and thus, it was not possible to associate the genotypes to this disease. Patients in the control group had a higher mean IPV (72.52%) and PS (30.90% of sites), ($p < 0,05$). Patients with DM1 had a higher number of sites with bleeding (9.56%) with a positive association between BOP and inadequate glycemic control ($p < 0,05$). In this study, based on objective criteria, children and adolescents were not diagnosed with PD, although they presented high Visible Board Index and low glycemic control. In molecular analysis, genotypes could not be associated with periodontal disease, but the G allele and the GG genotype for TNF α (-308) represented a protective factor for the development of DM1. Future research is needed to better clarify the etiopathogenesis of PD in these groups.

Key words: Diabetes Mellitus, Type 1. Gingivitis. Periodontitis. Polymorphism, Genetic. Interleukins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)	16
2.2 Doença Periodontal nas crianças e adolescentes	18
2.3 Polimorfismos genéticos e as citocinas	21
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Aspectos Éticos	25
4.2 Delineamento do Estudo	26
4.3 Calibração	29
4.4 Exame Periodontal	29
4.5 Controle Glicêmico	31
4.6 Análise Genética	31
4.6.1 Estudo Piloto	31
4.6.2 Coleta de Material Biológico	35
4.6.3 Extração de DNA	36
4.6.4 Processamento e análise dos genótipos	37
5 RESULTADOS	39
5.1 - Artigo 1: Avaliação periodontal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1: Estudo caso-controle	39
5.2 - Artigo 2: Avaliação periodontal de crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 e polimorfismos em loci gênicos da IL1 β (+3954), IL6 (-174), IL10(-1082) e TNF α (- 308)	58
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	87
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética - CCS/ UFPE	89
ANEXO B - Carta de Anuência do Hospital das Clínicas de Pernambuco	92
ANEXO C - Carta de Anuência da Prefeitura do Recife – Secretaria Municipal	

de Saúde	93
ANEXO D - Carta de Anuência do Centro Universitário Maurício de Nassau	94
ANEXO E - Ficha clínica periodontal	95
ANEXO F - Artigo Publicado com o grupo de pesquisa no Archives of Oral Biology: Evaluation of the effect of tracolimus on periodontitis induced in rats	96
ANEXO G - Normas para publicação de artigos na Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial	102
ANEXO H - Normas para publicação de artigos na Internacional Journal of Paediatric Dentistry	112

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. É um estudo caso-controle que visou comparar condições periodontais de crianças e adolescentes com e sem diabetes mellitus tipo 1(DM1) e avaliar o perfil genético dos indivíduos, para genes codificadores de interleucinas. A doença metabólica crônica representa riscos ao desenvolvimento de complicações macro e microvasculares e algumas repercussões na cavidade bucal podem levar à perda dos dentes e danos às estruturas periodontais. A ação local de microorganismos periodontopatógenos, assim como a resposta imune do indivíduo, modulada entre outros fatores, pela ação de citocinas pró- e anti-inflamatórias têm sido bastante pesquisada, contudo, entre pacientes infantis, as evidências ainda são muito baixas, justificando a pesquisa. Os exames clínicos foram realizados em serviços de Endocrinologia Pediátrica do Estado de Pernambuco, no Hospital das Clínicas e no Centro Médico Senador Ermírio de Moraes (casos) e na Clínica Odontológica de Atenção às crianças e aos adolescentes, do Centro Universitário Maurício de Nassau (controles). Os exames foram realizados em pacientes que procuraram os respectivos serviços, no período de abril de 2015 a novembro de 2016. Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, a amostra de conveniência ficou formada por 60 casos e 100 controles. Para a avaliação periodontal, foram coletados os seguintes dados: o Nível de Inserção Clínica, o Sangramento à Sondagem, o Índice de Placa Visível e a Profundidade de Sondagem. Para a avaliação da distribuição alélica e genotípica, foram inicialmente coletadas amostras de saliva dos pacientes para extração de DNA e posterior processamento e genotipagem. As análises genéticas foram desenvolvidas no laboratório de Genética e sequenciamento Tânia Falcão, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Com os resultados do estudo, foram produzidos dois Artigos: Avaliação periodontal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1: estudo caso-controle e Avaliação periodontal de crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 e polimorfismos em loci gênicos da IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) e TNF α (-308). Uma vez publicados, poderão fundamentar novos protocolos clínicos para o atendimento de crianças com DM1, assim como abrir caminhos para novas pesquisas.

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença sistêmica crônica, que desperta especial atenção pela Saúde Pública. A hiperglicemia característica está associada ao risco de danos visuais, cerebrais, renais, cardiovasculares, podendo em casos mais graves levar o paciente a óbito, quando a patologia leva à disfunção ou mesmo falência de órgãos vitais (GROSS et al., 2002). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, estima-se que população mundial apresente 387 milhões de indivíduos diagnosticados, com uma previsão de 9 bilhões no mundo, em 2040 (GURTSOVA et al, 2017). Dados brasileiros, citados nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD (2015-2016) mostram altas taxas de mortalidade, apresentando um acentuado aumento com a progressão da idade, variando de 0,50 para a faixa etária de 0-29 anos a 231,4 para a de 60 anos ou mais, por cada 100 mil habitantes.

A preocupação com os riscos associados à doença tem levado o Ministério da Saúde a unir esforços na conscientização da população. Através do Programa HIPERDIA, é possível o cadastramento e gerenciamento de ações estratégicas para os pacientes com diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica e/ou diabetes. No estado de Pernambuco, com base nos dados do Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB-DATASUS,2015), há mais de 1 milhão de indivíduos com DM, com a maior concentração de indivíduos no município de Recife, com 205.227 casos notificados, seguido, em segundo lugar, pelo município de Jaboatão dos Guararapes, com 70.099 casos.

De acordo com a sua etiopatogenia, o diabetes pode ter distintas classificações, acometendo pessoas em qualquer fase do ciclo vital. Está associado a fatores de risco, como: sedentarismo, obesidade, hipertensão arterial, período gestacional, infecções, síndromes, doenças autoimunes, entre outros (SBD - 2015-2016). Entre as crianças, o Diabetes mellitus tipo 1(DM1) é o mais comum, podendo ser classificado como de etiologia autoimune ou idiopática, com cerca de 60.000 novos casos diagnosticados no mundo, anualmente. A doença apresenta um processo lento de auto-agressão, de evolução gradual durante anos, numa fase pré-clínica. Quando o diagnóstico acontece, com quadros de hiperglicemia, o número de células β pancreáticas, produtoras da insulina, apresentam-se bastante diminuídas

ou já ausentes (SESTERHEIM, SAITOVITCH, STAUB, 2007). O diagnóstico do paciente infantil nem sempre representa uma tarefa fácil, quando os sinais da doença, como possível poliúria, polifagia, perda de peso, podem ser mascarados por falta de padrões alimentares regulares, uso de fraldas que disfarçam o volume urinário ou mesmo a irritabilidade, também associada a outras manifestações da idade. Assim, muitos casos só são diagnosticados durante infecções agudas, quando exames sanguíneos são solicitados pela equipe médica (CALLIARI; MONTE, 2008).

Na cavidade bucal do paciente infantil, algumas alterações podem ser identificadas, como: teor mais alto de peroxidase, glicose, magnésio e cálcio salivares; baixo pH, além de diminuição do fluxo e capacidade tampão, o que pode aumentar a suscetibilidade às infecções, quando comparados a indivíduos saudáveis. Nestes pacientes, a prevenção de doenças periodontais (DP) representa um aspecto de importância vital. Existe uma relação bidirecional entre as periodontopatias e o agravamento do diabetes. A presença de uma microbiota complexa e seus produtos tóxicos induzem a liberação dos moduladores anti- e pró-inflamatórios, as citocinas, capazes de induzir a resistência tecidual à insulina, aumentando, portanto, o risco de complicações sistêmicas. Por outro lado, a dificuldade de oxigenação dos tecidos, as alterações vasculares, das funções celulares, podem levar ao agravamento da DP, com comprometimento de estruturas de proteção e sustentação dos dentes (MEALEY, 2006; ALVES et al, 2007; LAMSTER et al, 2008; VIEIRA et al, 2008).

A atenção odontológica a estes pacientes, no entanto, nem sempre acontece de maneira precoce. A falta de abordagens multidisciplinares integrais, pode, portanto, comprometer a saúde de crianças, quando a saúde bucal não for também priorizada (GUEDES-PINTO, MELLO-MOURA, 2016).

Diferentes respostas humorais frente às infecções, têm despertado o interesse de pesquisadores e assim, a identificação do perfil genético dos pacientes busca respostas sobre influências étnicas, presença de polimorfismos ou heranças genéticas, associadas à suscetibilidade do hospedeiro. Na DP, a ação dos microorganismos e seus produtos tóxicos é o fator primário aos danos teciduais, contudo, é uma doença complexa e a resposta imune pode representar um fator de risco ou de proteção à doença. A presença de lócus polimórficos em genes codificantes das interleucinas podem alterar a expressão gênica, trazendo possíveis

modificações na função protéica. A maioria dos estudos, no entanto, são conduzidos em indivíduos adultos e com Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (XAVIER et al., 2009; ARAÚJO, BELLO, SOUZA, GUSMÃO; CIMÕES, 2011; BELLO, ARAÚJO, GUSMÃO, SOUZA, DONOS; CIMÕES, 2011; ARAÚJO; BELLO; CROVELLA; SOUZA; DONOS; CIMÕES, 2011; PEREZ; LUCENA; SOUZA; CIMÕES; LEÃO, 2013), com poucas ou conflitantes informações sobre crianças e adolescentes e o DM1.

A fim de pesquisar periodontopatias e realizar possíveis associações com as diversidades alélicas e genótípicas encontradas em crianças e adolescentes com e sem diabetes tipo 1, este estudo caso-controle avaliou a condição periodontal, bem como o perfil genético para os genes da Interleucina 1 β (+3953), da IL6 (-174), da IL10 (-1082) e do Fator de Necrose Tumoral alfa (-308). Os resultados podem nortear protocolos médicos e odontológicos, aumentando a efetividade de ações voltadas a esses pacientes, com base em evidências científicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

O Diabetes mellitus (DM) é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, que apresentam a hiperglicemia, como característica comum. Representa riscos a lesões orgânicas, diante da toxicidade do excesso de glicose sanguínea, que pode promover glicação de proteínas, hiperosmolaridade, além do aumento intracelular dos níveis de sorbitol. De acordo com a Associação Americana de Diabetes, apresenta quatro possíveis classificações: Diabetes mellitus tipo 1(DM1), Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), gestacional e outros tipos específicos, associados a defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas, endocrinopatias, defeitos genéticos na ação da insulina, ou induzido por medicamentos e infecções (SBD, 2015-2016).

DM1 é caracterizado pela destruição das células beta (β) das ilhotas de Langerhans pancreáticas, levando à deficiência completa de insulina (INS), por reação autoimune ou de etiologia idiopática, quando não estão presentes os marcadores de autoimunidade contra células β ou não há associação a haplótipos do sistema HLA- Antígeno Leucocitário Humano (GROSS et al., 2002; SCHNEIDER et al., 2009).

Entre os marcadores biológicos, estão os auto-anticorpos anti-insulina (anti-ICA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), antitirosina-fosfatases (anti-IA2) e antitransportador de Zinco (anti-Znt), que podem estar presentes meses ou anos, na fase pré-clínica da doença e em até 90% dos indivíduos, quando é detectada a hiperglicemia. Nem sempre é possível a classificação do DM1 em subcategorias, se a avaliação dos auto-anticorpos não fizer parte dos protocolos de diagnóstico. (PALMER et al,1983; BAEKKESKOV et al, 1990) A patologia também se apresenta associada a outras doenças, como: tireoidite de Hashimoto, doença celíaca, doença de Addison, doença de Graves, vitiligo, anemia perniciosa e miastenia gravis (BRASIL, 2006).

A taxa de destruição das células beta é variável, sendo comumente mais rápida a progressão em crianças, acontecendo de forma mais lenta em adultos (LADA – Diabetes autoimune latente do adulto). É citada como a segunda doença crônica mais frequente na infância, menos incidente apenas que a asma, com uma

prevalência que vem aumentando nas últimas décadas, especialmente nas faixas etárias menores. Assim, o controle da doença deve estar atento a um plano de tratamento que permita o crescimento e desenvolvimento infantil adequados, evitando sequelas para o indivíduo, sendo necessários acompanhamentos que envolvam mensurações e pesagens a cada consulta (KAUFMAN,1998; BURT ,2004).

Além do componente autoimune, o Diabetes mellitus tipo1 apresenta intensa associação a determinados genes do sistema HLA, com alelos específicos que podem predispor à doença ou proteger o indivíduo (TODD; BELL; McDEVIN, 1987; SILVA, 2007; ERLICH et al, 2008; AGUIAR et al, 2009).

É considerada uma doença poligênica complexa, apresentando cerca de 20 grupos de genes associados à suscetibilidade. A maior contribuição estatisticamente significativa vem da região onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), situados no cromossomo 6p21, contribuindo em cerca de 40%, na predisposição à doença. A alta incidência familiar, principalmente entre parentes de primeiro grau, indica a relevância dos fatores genéticos na etiopatogenia. Estudos realizados em gêmeos monozigóticos, no entanto, revelaram a semelhança para o desenvolvimento da doença em apenas 50% dos casos, sugerindo que fatores ambientais e imunológicos também estejam presentes na etiopatogenia (FERNANDES et al., 2005). Representa 90% dos casos de diabetes na infância, com uma incidência variável entre populações e áreas geográficas (SBD-2015-2016).

Alguns sinais e sintomas são utilizados como critérios de diagnóstico: a poliúria, a polidipsia, a polifagia e a perda de peso, associados a alterações glicêmicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, é considerado com diabetes, um indivíduo com glicemia casual ≥ 200 mg/dl (SBD, 2015-2016). A análise da hemoglobina glicada (HbA1c) também foi proposta como critério de diagnóstico, quando $\geq 6,5\%$. Capaz de identificar o grau de exposição médio do paciente à glicemia, considerando o tempo médio de vida dos eritrócitos, de aproximadamente 120 dias. Assim, consegue-se avaliar o controle glicêmico médio dos últimos 4 meses (Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada, 2004; The International Expert Committee, 2009; SBD, 2015-2016). Os pacientes com os níveis da HbA1c entre 6 e 6,4% são considerados de alto risco para o desenvolvimento da doença (OMS, 2013). Todos estes referenciais, no entanto, podem sofrer

alterações, por influência de etnias ou diante de hipóteses de hemoglobinopatias, anemias hemolíticas e ferroprivas; quando a glicemia em jejum e casual, testes de tolerância à glicose, além do exame clínico podem concluir o diagnóstico (JOHN, 2012).

No tratamento da DM1, a insulinoterapia é essencial, com indicação de três ou mais doses diárias do hormônio, a fim de evitar complicações macro e microangiopáticas. É capaz de reduzir os riscos em até 76% dos casos de retinopatia, 60% dos casos de neuropatia e 39% dos casos de nefropatia, permitindo um melhor controle metabólico, que visa manter níveis de hemoglobina glicada < 7%. Os padrões e dosagens individualizados e bem monitorados são essenciais, evitando-se sequelas decorrentes de uma hiperglicemia ou de uma hipoglicemia, que pode ocorrer nos momentos de flutuação: nos picos de ação da insulina; durante a noite; diante de quadros infecciosos e após exercício físico intenso, o que pode levar a prejuízos da função cerebral (SBD, 2015-2016).

O controle glicêmico inadequado também pode trazer manifestações na cavidade bucal: queiloses, fissuras, ressecamento de mucosas, diminuição do fluxo salivar, hálito cetônico, síndrome da ardência bucal, dificuldades de cicatrização e alterações na microbiota, além de gengivites e periodontites. A presença da glicose na saliva e no fluido gengival, pode alterar a microbiota do biofilme, influenciando no desenvolvimento das infecções (MEALEY, 1998; ZAITTER, FERENCZ, TOMAZINHO, 2006; PERRINO, 2007; SILVA, 2007; REWERS, PIHOKER, DONAGHUE, HANAS, SWIFT, KLINGENSMITH, 2009). Estudos indicam, no entanto, que o risco cariogênico pode variar entre esses pacientes, quando ora pode diminuir, diante do controle da ingestão de açúcares na dieta; ora pode aumentar, quando os pacientes infantis são especialmente orientados a dispor de fontes de carboidratos de absorção rápida para consumo imediato (tabletes de glicose; sopa de açúcar ou mel; 150 ml de suco de laranja ou 150 ml de refrigerante comum), diante dos episódios de hipoglicemia (MEALEY, 1998; REWERS et al, 2009).

2.2 Doença Periodontal nas crianças e adolescentes

As doenças periodontais compreendem um grupo de condições inflamatórias induzidas por microorganismos que podem levar desde a inflamação gengival, destruição tecidual à perda óssea alveolar. O biofilme dental é considerado

o principal agente etiológico, associado a grupos específicos de anaeróbios gram-negativos. A resposta imune do hospedeiro, no entanto, tem sido associada à maior responsável pelo dano tecidual (VAN DYKE; LESTER, 1993).

De acordo com a Academia Americana de Periodontia, em 1999, o fator “idade” foi abolido como critério de classificação das doenças periodontais, quando em crianças e adolescentes puderam ser diagnosticadas todas as periodontopatias (DIAS, 2006).

Estudos epidemiológicos constataram uma alta incidência de gengivite na infância, afirmando ser uma doença de distribuição universal na população (KIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). A porcentagem de crianças afetadas, no entanto, aumenta com a diferença da idade, sendo mais encontrada dos 5 aos 7 anos e com um pico a partir dos 11 anos. Geralmente mais precoce em meninas, aos 12 anos que em meninos, aos 14 (AAP, 1996; ROSING, OPPERMANN, 2001).

No periodonto infantil, diferenças anatômicas podem estar associadas ao tipo de arco dental, como no tipo I, com diastemas entre os dentes anteriores, onde a gengiva papilar apresenta-se em forma de sela. Alterações fisiológicas também podem ser observadas durante esfoliações ou erupções dentárias, com diferenças na vascularização local e possível presença de hiperemia ou edemas nos tecidos. O sulco gengival em torno dos dentes recém-irrompidos, também se apresenta mais profundo que na dentição decídua, todos achados considerados dentro de um padrão de normalidade, que devem ser diferenciados de quadros patológicos. Assim, considera-se que o aspecto da gengiva da criança se assemelha à do adulto, após a erupção dos dentes permanentes, quando estão em oclusão. (TOLEDO et al, 2012)

Fatores podem interferir na resposta imune do paciente, alterando a progressão da doença, como: alterações hormonais, desnutrição, uso de medicamentos, o fumo, alterações sistêmicas, além da presença de polimorfismos genéticos, quando podem alterar a expressão gênica. Características locais ainda aumentam o risco, como a presença de aparelhos ortodônticos, bandas e alças, ou de restaurações defeituosas e maloclusões, que facilitam o acúmulo de biofilme (ELLIS et al, 1999; PRISANT, HERMAN, 2002; NOWZARI, RICH, 2008; TOLEDO et al, 2012).

Representando uma etapa mais avançada da gengivite, a periodontite apresenta um desenvolvimento lento e assim, é mais diagnosticada entre pacientes

jovens e adultos. Apresenta sinais clínicos de alteração de cor, edema, exsudato, sangramento ao toque ou sondagem e perda óssea. A periodontite progride à medida que fatores etiológicos da doença, como microorganismos infectantes e toxinas superam à suscetibilidade do hospedeiro. (AAP, 2003)

Na infância ou na puberdade, pode também ser observada a periodontite agressiva, com perda da inserção clínica e destruição severa do osso alveolar, sem que o paciente apresente comprometimento sistêmico. Clínica e radiograficamente, pode-se observar a perda de inserção interproximal maior que 5 mm em pelo menos dois elementos permanentes. Pode ser classificada como localizada, quando o acometimento periodontal não envolver mais de dois dentes, além do primeiro molar e do incisivo inferior e generalizada, quando a doença afetar mais de três dentes não adjacentes. (AAP,2003). O diagnóstico ainda pode ser fundamentado nas características do paciente, como: idade, histórico familiar, assim como na análise microbiológica, quando espécies microbianas como: *Tannarella forsythenis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* são comumente encontradas nesta patologia, assim como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, considerado o microorganismo mais importante na etiopatogenia da PA.(SHAPIRA, WILENSKY, KINANE, 2005 ; TONETTI, CLAFFEY, 2005; SCAREL-CAMINAGA et al, 2009)

A destruição periodontal em crianças e adolescentes pode ainda estar associada ao diabetes, Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), leucemia, deficiências vitamínicas, desordens leucocitárias, Síndrome de Papillon-Lefevre, Síndrome de Down e na hipofosfatasia. O reduzido número de imunoglobulinas; alterações neutrofílicas, que afetam na qualidade funcional das células de defesa (quimiotaxia e fagocitose), assim como na quantidade (neutropenia e agranulocitose); permitem a persistência e o crescimento de patógenos periodontais. Por outro aspecto, altas concentrações de mediadores inflamatórios podem ser encontrados no fluido gengival, refletindo na atividade inflamatória (ENGBRETSON et al, 2004; NUALART-GROLLMUS, CHAVEZ, DONAT, 2007).

Doenças necrosantes também podem ser diagnosticadas na infância, contudo, são raras, com relato de menos de 1% entre norte-americanos e europeus, sendo encontradas em maior frequência entre africanos, asiáticos e sulamericanos. Nestes casos, há presença de necrose e ulcerações proximais associadas à sintomatologia dolorosa, sangramento provocado e/ou espontâneo e estado febril, associados a altos níveis de espiroquetas e *Prevotella intermedia*. A presença de

infecções virais, desnutrição, insônia, estresse emocional, além da presença de doenças sistêmicas são citados como fatores predisponentes (LOESCHE et al, 1982; TOLEDO et al, 2012).

2.3 Polimorfismos genéticos e as citocinas

As variações fenotípicas encontradas entre os seres humanos estão associadas a *polimorfismos*, palavra grega que indica “muitas formas”. Através de ferramentas da biotecnologia é possível rastrear o DNA humano e encontrar variações na sequência nucleotídica do genoma. Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP), bastante pesquisados, consistem em uma variação da identidade de base purica ou pirimídica singular, num sítio particular do genoma, encontrados em mais de 1% dos indivíduos da espécie, resultando em mudança no código genético. A alteração no genótipo, no entanto, pode afetar ou não o fenótipo, que determinará a função protéica. Assim, polimorfismos podem influenciar na produção de substâncias, resultando na variação de respostas imunológicas individuais frente às inflamações e infecções. Apresentam frequências e distribuições variáveis entre as populações, com aplicação importante, como marcadores biológicos no diagnóstico e na identificação de riscos ao desenvolvimento de doenças, como diabetes, artrite reumatóide, lúpus eritematoso, periodontopatias, entre outras (CARVALHO et al, 2007; HOÇOYA, JARDINI, 2010).

Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) regiões específicas do DNA podem ser amplificadas e pesquisadas as variações alélicas e genotípicas dos indivíduos para os diversos genes. Os polimorfismos SNP constituem cerca de 90% das variações encontradas (SILVA, SOUSA, 2002).

Vários estudos citam a possível associação do risco e da progressão da periodontite, com modificações das expressões gênicas. Alterações no locus da região promotora de genes das interleucinas, proteínas com atividade anti- e pró-inflamatória são as mais citadas (Quadro 1). (HOÇOYA, JARDINI, 2010; ARAÚJO, BELLO, CROVELLA; SOUZA, DONOS, CIMÕES, 2011; SALAZAR-PELAÉZ et al, 2012; PEREZ, LUCENA, SOUZA, CIMÕES, LEÃO, 2013).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, que regulam a intensidade e duração da resposta imunológica, agindo de maneira autócrina, endócrina ou parácrina, exercendo as funções fisiológicas em baixas concentrações

(pico molar). Apresentam características pleiotrópicas, quando exercem distintos efeitos biológicos, em distintos tipos celulares; de redundância, quando duas citocinas desenvolvem as mesmas atividades; de sinergismo, quando desempenham atividades de maneira combinada com outra citocina ou de antagonismo, quando desempenham funções antagônicas e de indução em cascata. Assim, a homeostase da atividade das citocinas no organismo é vital, a fim de que a atividade celular e imune aconteça de forma coordenada (TONET, NOBREGA, 2012).

A interleucina 1 (IL1) é uma citocina pró-inflamatória, envolvida no início e na progressão da inflamação do tecido conjuntivo e ósseo, sendo um potente estimulador de reabsorções ósseas. Resultados indicam alterações na frequência de genótipos e alelos, sugerindo que o polimorfismo no locus +3954 da IL-1 β (C/T) pode ser fator de risco para a periodontite crônica em pacientes com diabetes. (HOÇOYA; JARDINI, 2010)

A IL-6 é outra citocina pró-inflamatória, que atua na diferenciação das células β e na proliferação das células T, na diferenciação e/ou ativação de macrófagos, além de acelerar a reabsorção e inibir neoformações ósseas. Polimorfismos na região promotora deste gene, locus -174 (G/C) pode modular a expressão da IL-10, diminuindo a ação anti-inflamatória desta citocina, levando a uma deficiência na resposta do sistema de defesa (HOÇOYA, JARDINI, 2010; ARAÚJO, BELLO, CROVELLA, SOUZA, DONOS, CIMÕES, 2011; PEREZ, LUCENA, SOUZA, CIMÕES, LEÃO, 2013).

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), citocina pró-inflamatória, também é um importante modulador da cascata inflamatória. A liberação desta proteína favorece a iniciação e a perpetuação de respostas inflamatórias e autoimunes. Polimorfismos no locus -308, alterando o alelo selvagem A para G, podem modificar esta expressão gênica (RAKIE, PETCKOVIC-CURCIN, STRUILLLOU, MATIC, STAMATOVIC, VOJVODIC, 2014).

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, é produzida principalmente por monócitos, com propriedades pleiotrópicas de imunorregulação e inflamação. Inibem a síntese de interleucinas inflamatórias. Polimorfismos no locus -1082, com a modificação do alelo selvagem G pelo A, no entanto, podem induzir alterações no fenótipo (IDE et al., 2002).

Tabela 1 - Polimorfismos associados à doença periodontal

CITOCINA	ATIVIDADE	LÓCUS	POLIMORFISMO
IL-1	Pró-inflamatória	+3954	C/T
IL-6	Pró-inflamatória	-174	G/C
TNF- α	Pró-inflamatória	-308	A/G
IL-10	Anti-inflamatória	-1082	G/A

Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018) com base nos dados desta pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a condição periodontal de crianças e adolescentes com e sem Diabetes mellitus tipo 1(DM1) e polimorfismos nos locos gênicos de interleucinas pró- e anti-inflamatórias, associados a periodontopatias.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a condição clínica periodontal dos pacientes com DM1 e sem diabetes;
2. Verificar se há diferença entre o risco de desenvolver DP, entre casos e controles;
2. Pesquisar a presença de polimorfismos SNP nos genes da IL-1 β (+3954), IL-6 (-174), IL-10 (-1082) e TNF- α (- 308);
3. Verificar se há associação entre os genótipos e possíveis alterações na condição periodontal das crianças.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Considerando o respeito pela dignidade humana e pela especial proteção devida aos participantes da pesquisa científica envolvendo seres humanos, foram seguidas as orientações da Resolução No. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O Projeto de Pesquisa foi inicialmente submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o Parecer de número 912.145. Todos os pais ou responsáveis pelos pacientes infantis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), cientes dos Riscos e Benefícios da pesquisa:

RISCOS:

Os exames geraram pequeno desconforto nos pacientes, em virtude do contato dos instrumentos com os tecidos bucais. A fim de minimizar os riscos, todos os procedimentos foram realizados com o uso de instrumentos específicos e executados por profissional qualificado.

BENEFÍCIOS:

AOS PACIENTES E FAMILIARES: Todas as crianças atendidas e seus respectivos responsáveis receberam orientações sobre a importância da saúde bucal e os riscos à cárie e às doenças periodontais. Após o exame físico e coleta de materiais biológicos, receberam escovas dentais e aplicação tópica de flúor, além do encaminhamento a serviços odontológicos.

AOS ENDOCRINOLOGISTAS E SERVIÇOS DE SAÚDE: Durante os meses de pesquisa, os endocrinologistas pediátricos receberam orientações, através de discussões e palestras sobre a importância da abordagem odontológica aos pacientes com DM1.

PRIVACIDADE: Os dados dos pacientes estão preservados em sigilo e armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador.

4.2 Delineamento do Estudo

O estudo caso-controle foi desenvolvido no período de abril de 2015 a novembro de 2016. Nos serviços de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas de Pernambuco (Figura 1) e do Centro Médico Senador Ermírio de Moraes (Figura 2) foi formado o grupo caso, de crianças com diabetes mellitus tipo 1. Os estabelecimentos de saúde foram identificados como referência na especialidade, de acordo com o cadastro da Central de Regulação do Estado – Central de Leitos – Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. O grupo controle (crianças sem diabetes) foi formado na Clínica de Atenção à Criança e ao Adolescente do Centro Universitário Maurício de Nassau (Figura 3). As análises genéticas foram desenvolvidas no Laboratório de Genética e Sequenciamento Tânia Falcão, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Figura 4).

Figura 1- Hospital das Clínicas de Pernambuco



Fonte: Disponível em: <<http://www.cbnrecife.com/noticia/hospital-das-clinicas-da-ufpe-promove-mutirao-para-detectar-retinopatia-diabetica>>. Acesso em: 10 set. 2017.

Figura 2 - Centro Médico Senador Ermírio de Moraes



Fonte: Disponível em:
<https://lh5.googleusercontent.com/p/AF1QipMuR2xuXqmbzaL3uqKR6AKTHTiEh_PGqxr1TOu3>.
Acesso em: 10 set. 2017.

Figura 3 - Clínica de Atenção à Criança e ao Adolescente - UNINASSAU



Fonte: Disponível em: <<https://www.uninassau.edu.br/estrutura-fisica/bloco-d>>. Acesso em: 10 set. 2017.

Figura 4 - UFRPE



Fonte:Disponível em: <<http://plataforma9.com/upload/2016/06/urfpe3.jpg>>. Acesso em: 10 set. 2017.

Seleção da amostra:

As crianças e os adolescentes foram selecionadas por conveniência. Ao chegarem nos serviços médicos e odontológicos, eram avaliados sob os critérios de inclusão e exclusão, para então serem incluídos nos grupos da amostra, quando possível.

1 Grupo caso:

Critérios de Inclusão: pacientes com idade entre 06 a 13 anos; presença de pelo menos dois dentes permanentes em oclusão entre si; diagnóstico do DM1, de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (SBD, 2015-2016): Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual ≥ 200 mg/dl; Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dl e Glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75g de glicose > 200 mg/dl; Hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$.

Critérios de Exclusão: apresentar outro comprometimento sistêmico (síndromes, hipertensão arterial, imunodeficiência, cardiopatias, hepatopatias, asma, ou outra condição que de forma direta ou indireta pudesse trazer algum tipo de comprometimento na condição periodontal); fazer uso de aparelho ortodôntico.

2 Grupo controle:

CrITÉRIOS de Inclusão: pacientes com idade entre 06 a 13 anos; presença de pelo menos dois dentes permanentes em oclusão entre si; estar no primeiro dia de consulta odontológica na Clínica.

CrITÉRIOS de Exclusão: apresentar diagnóstico de algum comprometimento sistêmico (diabetes, síndromes, hipertensão arterial, imunodeficiência, cardiopatias, hepatopatias, asma, ou outra condição que de forma direta ou indireta pudesse trazer algum tipo de comprometimento na condição periodontal); fazer uso de aparelho ortodôntico.

Amostra do Estudo:

Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, foram definidos 60 pacientes para o grupo caso e 100 pacientes para o grupo controle.

4.3 Calibração

A pesquisadora realizou todos os exames clínicos periodontais nos pacientes do estudo. Previamente, foi calibrada por uma especialista em periodontia, quando crianças foram submetidas ao exame periodontal por ambas profissionais. Foram comparados os dados coletados (NIC, PS, SS e IPV dos dentes permanentes em oclusão entre si). O Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) apresentou resultados satisfatórios para todas as análises.

4.4 Exame Periodontal

Todas as crianças foram submetidas ao exame clínico periodontal (Figura 5), realizado com a utilização de odontoscópios e sondas manuais milimetradas (PC15, Universidade Carolina do Norte). A avaliação clínica periodontal foi realizada através de exames objetivos, com base nos dentes permanentes em oclusão (XAVIER et al, 2009).

Os seguintes dados foram coletados e registrados:

- 1) Nível de Inserção Clínica (NIC): medido como a distância da junção amelocementária (JAC) até a gengiva marginal, medida em milímetros (superfícies vestibular e lingual/ palatina) (AAP, 2000).
- 2) Profundidade à Sondagem (PS): a distância entre a margem da gengiva e a porção mais apical da bolsa ou sulco. Medida com sonda milimetrada, de forma circunferencial nas superfícies central, mésio e disto-vestibular / central, mésio e disto lingual/ palatina. O registro na ficha periodontal foi feito para valores a partir de 4 mm de forma ordinal em escala de 1 mm (AAP, 2000).
- 3) Sangramento à sondagem (SS): foi registrada a presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 30 segundos transcorridos da profundidade de sondagem (AINAMO, BAY,1975).
- 4) Índice de Placa Visível (IPV): foi registrada presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa bacteriana, sem utilização de sonda (AINAMO, BAY,1975). Para o cálculo do índice, o número de faces com presença de placa foi dividido pelo número de faces presentes e o resultado, multiplicado pelo número 100, a fim de obter o valor em percentual.

Figura 5 - Exame clínico



Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018).

Diagnóstico:

A Doença periodontal foi diagnosticada como: Gengivite, quando caracterizada pela presença de 25% ou mais de sítios com sangramento à sondagem e nenhum sítio com Nível de Inserção Clínica $> 2\text{mm}$ (Lopes NJ, 2005) e Periodontite, quando caracterizada pelo achado de pelo menos um sítio apresentando simultaneamente: PS $\geq 4\text{mm}$ e NIC $\geq 3\text{ mm}$ (XAVIER et al., 2009).

4.5 Controle Glicêmico:

A fim de avaliar o controle médio glicêmico dos pacientes do grupo caso, foram identificados nos prontuários individuais dos serviços de endocrinologia, os valores atualizados das hemoglobinas glicadas. Pacientes com valores de hemoglobina glicada $\geq 7\%$ foram consideradas como mau controle glicêmico (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013)

4.6 Análise Genética

4.6.1 Estudo Piloto

JUSTIFICATIVA:

Pesquisas envolvendo análises genéticas apresentam a coleta de sangue periférico como padrão ouro, para fins de extração de DNA. No presente estudo, com crianças e adolescentes, no entanto, as amostras biológicas coletadas foram de saliva e de células da mucosa jugal (procedimentos minimamente invasivos). A técnica para a obtenção de sangue representava um fator limitante, quando restrições éticas pressupunham a exposição desses pacientes a exames estritamente necessários. Além do exposto, as crianças com diabetes tipo 1 já chegavam às Unidades de Saúde, com resultados atualizados dos exames de sangue (hemograma e hemoglobina glicada), solicitados pelos médicos, em consultas periódicas anteriores. Assim, nem para o grupo Caso, nem para o Controle estava indicada a coleta de amostras sanguíneas. A fim de identificar entre a saliva e células da mucosa jugal, portanto, o material biológico que permitisse uma

melhor fonte para a extração de DNA, com maior quantidade e melhor qualidade; assim como testar o protocolo do Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da Promega, para a extração de DNA de secreções diferentes de sangue.

MATERIAIS E MÉTODOS

No Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram coletados materiais biológicos de 06 voluntários. Todos tinham realizado a última refeição há mais de uma hora e antes da coleta, não realizaram higiene bucal, apenas bochecho com 100 ml de água mineral. De cada um dos voluntários, foi coletada uma amostra de saliva, que foi ejetada em tubo plástico estéril e uma amostra de esfregaço de células da mucosa jugal, com swab também estéril. Foi utilizado como critério de exclusão: indivíduos que apresentassem alteração sistêmica associada a mutações do gene da β -globina humana, a anemia falciforme. O material foi identificado e armazenado em geladeira na temperatura de -4°C por 24 horas e em seguida, armazenado em freezer na temperatura de -22°C , de acordo com protocolo do laboratório.

A extração de DNA foi realizada após descongelamento em temperatura ambiente. Os swabs com material biológico tiveram as pontas cortadas e colocadas em eppendorf, com 300 μl de soro fisiológico. Em seguida, os tubos foram levados ao vórtex, durante 20 segundos e após, para a centrifuga por 1 minuto, de acordo com protocolo do laboratório. Após a centrifugação, foram retirados dos tubos, as pontas dos swabs, ficando pronto o conteúdo residual para a etapa da extração. De cada saliva coletada foram retirados 300 μl e colocados em 6 tubos de eppendorf, respectivamente. As extrações do DNA de todas as amostras foram realizadas utilizando o Genomic DNA Purification Kit, Promega, de acordo com instruções do fabricante e adaptados de acordo com o protocolo *in house*.

Para a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizado o PCR Master Mix da Promega, associado aos *primers* específicos para o gene da β -globina humana, de acordo com protocolo descrito por BELL et al (1993). As amostras e 2 controles negativos preparados com 300 μl de água destilada associados ao PCR Master Mix foram submetidas aos ciclos térmicos de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C , por 30 segundos; de anelamento à 55°C , por 30 segundos; e de extensão à 72°C , por oito minutos.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose à 1%, preparado com 0,4g de agarose e 40 ml de tampão (TBE). O TBE foi também colocado na cuba da eletroforese a um volume de 200 ml. Foi retirado 5µl de cada amplicon e dos 2 controles negativos e associados à 3µl de corante sybergreen. Em seguida, foram aplicados, juntamente com o ladder, aos poços do gel de agarose à 1% para a realização da eletroforese, durante 30 minutos. A fonte da eletroforese foi calibrada em 100 V de voltagem (V), 110mA de corrente (I) e 100w de potência (P).

Para a quantificação do DNA foi utilizado o DNA Labeling and detection kit, Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante, utilizando 1µl de cada DNA extraído. Em seguida, para fins de leitura e quantificação do DNA, cada eppendorf com 1µl da amostra foi colocado no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer.

Na análise estatística, foi avaliada a significância estatística unilateral para o Teste de Monte Carlo e realizada a Probabilidade exata. Foram realizadas comparações de médias de amostras paradas (2 coletas do mesmo indivíduo) e em função do número reduzido de amostras; foram determinadas probabilidades exatas, pois independem da forma de distribuição dos dados.

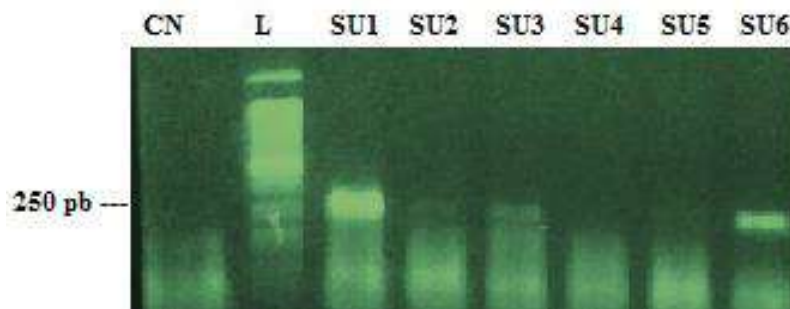
RESULTADOS DO PILOTO:

1 EXTRAÇÃO DO DNA

DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS DA MUCOSA

Após 30 minutos da Eletroforese, em gel de agarose à 1%, foi observado que apenas na amostra SU4 (Figura 6), o produto da PCR não amplificou para o gene da β -globina humana (250 pb). O DNA dessas amostras foi extraído a partir de células da mucosa jugal. As demais amostras que amplificaram, puderam confirmar o sucesso das extrações do ácido desoxirribonucléico.

Figura 6 – Imagem representativa do gel após a eletroforese CN (Controle Negativo). L(Ladder). Amostras de DNA extraídos dos swabs dos 6 pacientes amplificadas por PCR para o gene da β -globina



Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018) com base nos dados desta pesquisa.

DAS AMOSTRAS DE SALIVA

Após 30 minutos da Eletroforese, em gel de agarose à 1%, foi observado que todos os produtos da PCR, das amostras de DNA extraídos das salivas (Figura 7), amplificaram para o gene da β -globina humana (250 pb), demonstrando o sucesso do produto da extração, a partir deste material biológico.

Figura 7 – Imagem representativa do gel após eletroforese CN (Controle Negativo). L(Ladder). Amostras de DNA extraídos a partir das salivas amplificadas por PCR para o gene da β -globina



Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018) com base nos dados desta pesquisa.

2 QUANTIFICAÇÃO

A fim de quantificar o DNA extraído, as amostras de DNA foram associadas aos agentes do kit para quantificação da Invitrogen, seguindo o protocolo do fabricante, e em seguida, foram observados os resultados, através da leitura do aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer. Após a leitura dos dados, observou-se que a extração de DNA genômico a partir de material colhido do esfregaço da mucosa jugal e da saliva de 6 indivíduos, resultou em concentrações bem variadas de DNA (de 0,04 a 58,30 ng/ml).

Os dados colhidos foram analisados e encontrados valores médios ou medianos dessas concentrações, maiores quando a extração foi feita a partir da saliva (média de 2,15 para a mucosa jugal e 31,37 para saliva). A concentração de DNA obtida a partir da saliva foi maior que a obtida por meio do esfregaço da mucosa jugal em valores médios, em todos os 6 indivíduos que tiveram os dois materiais biológicos coletados. A concentração de DNA alcançada a partir da saliva foi mais de 50 vezes maior do que aquela alcançada com a mucosa jugal, no mesmo indivíduo. O resultado mostrou-se estatisticamente significativo, apesar do tamanho reduzido da amostra, ($p=0,017$ / $0,016$). Testes estatísticos: Monte Carlo e Probabilidade exata.

CONCLUSÃO DO PILOTO:

A saliva foi identificada como o melhor material biológico para extração de DNA, quando comparada com células da mucosa jugal. O protocolo de extração da Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da Promega, adaptado *in house* (no laboratório) foi utilizado com sucesso para a extração de DNA de todas as amostras.

4.6.2 Coleta de material biológico

Com base nos resultados do Estudo Piloto, foram coletadas amostras de saliva dos pacientes do grupo caso e do grupo controle (Figura 8), em potes estéreis e armazenados a menos 20 graus (-20°C) para posterior extração e análise do DNA. De cada paciente, também foram extraídas células da mucosa jugal (Figura 9), através de esfregaços com swab e armazenados em geladeira (2°C), para uma segunda fonte de DNA, se necessária.

Figura 8 - coleta de saliva



Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018).

Figura 9 - Esfregaço da mucosa jugal



Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018).

4.6.3 Extração de DNA

Foi utilizado o Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da Promega, adaptado no laboratório. Protocolo para extração do DNA, a partir da saliva: no tubo de eppendorf, colocar 500µl de saliva (descongelada); acrescentar 600µl de solução de lise celular do kit; descansar por 10 minutos; centrifugar por 30 segundos; retirar o

sobrenadante; acrescentar 300µl de solução de lise nuclear do Kit; colocar os eppendorfs em banho maria por 1 hora; acrescentar 100µl de solução de precipitação do Kit; centrifugar por 3 minutos; retirar o sobrenadante em outro tubo e descartar o pellet; acrescentar 300µl de isopropanol gelado; misturar 15 vezes, por inversão dos tubos; centrifugar por 01minuto (13.000 rpm); descartar 600µl do sobrenadante; acrescentar 300µl de etanol à 70%;centrifugar por 01 minuto; retirar todo álcool e inverter o eppendorf deitado em papel toalha para secar, durante 01 hora; acrescentar 50µl de solução de reidratação do Kit; colocar em geladeira (2° C) por 24 horas; manter o eppendorf com DNA extraído, em freezer (- 20°C).

4.6.4 Processamento e Análise dos Genótipos

Para a pesquisa dos polimorfismos nos genes IL-1 β (+3953) (THOMSON et al, 2001), IL-6(-174G/C) (LORENTE et al, 2016), IL-10 (-1082) (TALAAT et al, 2016), TNF- α (-308) (CHANG et al,2012) foram amplificadas as moléculas de DNA extraídas das amostras de saliva, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para um volume final de 25µL. Foram utilizados para cada reação, uma solução Master Mix PCR (Promega), 1µM de cada primer específico para cada região selecionada (Tabela 2) e 5µL de DNA. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2% e visualizados sob luz ultravioleta, para fins de genotipagem.

Tabela 2 - Primers, Enzimas e Ciclos Térmicos para PCR

LÓCUS GÊNICO	PRIMERS	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	CICLOS TÉRMICOS
IL1 β (+3953)	5'-CTCAGGTGTCCTCCAAGAAATCAAA-3' (Forward) e 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' (Reverse)	TaqI	96°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e uma incubação final de 72°C por 5 minutos
IL6(-174)	5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3' (Forward) e 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAGG-3' (Reverse)	Nla III	94° C, 52° C, 72° C por 30 segundos (cada), por trinta ciclos, durante 2 horas à 37° C
IL10(-1082)	5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3(Forward) e 5'-ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3' (Forward) e o primer 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG - 3' (Reverse)	-----	94°C por 2 minutos (1 ciclo), 96° C por 25 segundos, 70° C por 45 segundos e 72° C por 20 segundos (5 ciclos); a seguir, 96° C por 25 segundos, 65° C por 50 segundos e 72° C por 45 segundos (11 ciclos); ao final, 96° C por 25 segundos, 55° C por 60 segundos e 72° C por 2 minutos (15 ciclos)
TNF α (-308)	5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3' (primer forward alelo específico para A) e 5'-ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3' (primer forward alelo específico para G) e 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3 (Reverse)	-----	95° C por 1 minuto, 10 ciclos à 95° C por 15 segundos, 63° C por 45 segundos, 72° C por 35 segundos, 25 ciclos à 95° C por 20 segundos, 59° C por 45 segundo e 72° C por 5 minutos

Fonte: Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão (2018) com base nos dados desta pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1

Título: Avaliação periodontal em crianças e adolescentes com diabetes tipo 1: estudo caso-controle

Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão ¹, Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos², Paulo Roberto Eleutério de Souza^{2,3}, Renata Cimoões ^{1*}

Filiações:

1 Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

3 Universidade de Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente:

E-mail: renata.cimoes@globo.com

Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Centro de Ciências da Saúde –
Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Recife – PE.
CEP 50670-901. Telefone: 55(81) 321268817.

Periódico:

Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial

Avaliação periodontal em crianças e adolescentes com Diabetes Mellitus tipo 1: estudo caso-controle

Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão, Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos, Paulo Roberto Eleutério de Souza, Renata Cimões

RESUMO

Objectivo: Comparar a condição periodontal entre crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 e pacientes saudáveis. **Métodos:** Foi realizado um estudo caso-controle. 160 pacientes entre 6 e 13 anos foram submetidos ao exame clínico periodontal, sendo 60 casos e 100 controles. O nível de inserção clínica (NIC), a profundidade à sondagem (PS), o sangramento à sondagem (SS) e a presença de placa visível (IPV) foram registados. Valores atualizados da hemoglobina glicada (HbA1c) dos pacientes com diabetes foram anotados e comparados aos demais dados. Para as análises estatísticas foram empregados o teste Qui-quadrado de Pearson e o de razão de Verossimilhança. Para a comparação das médias de idade entre os grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney. **Resultados:** Os pacientes do grupo Controle apresentaram maior índice de placa visível (72,52%) e maior profundidade de sondagem (30,90%), nos sítios examinados. Os pacientes com DM1 apresentaram maior número de sítios com Sangramento à Sondagem (9,56%) e uma associação positiva entre SS e controle glicémico inadequado ($p < 0,05$). **Conclusões:** Neste estudo, com base nos critérios objetivos, crianças e adolescentes não foram diagnosticadas com DP, embora tenham apresentado alto Índice de Placa Visível e baixo controle glicémico. Futuros estudos são necessários para melhor esclarecer a etiopatogenia nesses grupos.

Palavras- chave: Diabetes tipo 1. Gengivite. Periodontite.

ABSTRACT

Objective: To compare the periodontal condition among children and adolescents with type 1 diabetes with healthy patients. **Methods:** A case-control study was carried out, sixty-six patients aged 6 to 13 years underwent periodontal clinical examination, 60 test and 100 controls. The clinical attachment level (CAL) probing depth (PD), bleeding on probing (BOP) and presence of visible plaque (IPV) were recorded. Updated values of glycated hemoglobin (HbA1c) in patients with diabetes were recorded and compared to the other data. Pearson's chi-square test and likelihood ratio test were used for statistical analysis. The Mann Whitney test was used to compare the mean values of age between groups. **Results:** Patients in the control group had a higher visible plaque index (72,52 %) and a greater probing depth (30.90%) in the sites examined. Patients with DM1 had a higher number of sites with bleeding (9.56%) and a positive association between BOP and inadequate glycemic control ($p < 0,05$). **Conclusions:** In this study, based on objective criteria, children and adolescents were not diagnosed with PD, although they presented high Visible Plate Index and low glycemic control. Future studies are needed to better clarify the etiopathogenesis in these groups.

Key words: Type 1 diabetes. Gingivitis. Periodontitis.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de doenças sistêmicas e metabólicas, em muitos casos, acontece nos primeiros anos de vida. Crianças são avaliadas por equipes com endocrinologistas, nutricionistas, psicólogos, entre outros profissionais, mas nem sempre recebem atenção bucal adequada, o que pode representar um risco a infecções e comprometer a saúde geral.¹

Pacientes com Diabetes Mellitus (DM) têm despertado uma atenção peculiar aos médicos dentistas. Estima-se uma população mundial de 387 milhões de indivíduos diagnosticados com a doença metabólica², com perspectivas de 9 bilhões no mundo, em 2040.³ O diabetes tipo 1 (DM1) representa de 5 a 10% dos casos, sendo o mais comum entre crianças e adolescentes. É caracterizado por reação auto-imune, com a destruição das células beta das ilhotas de Langerhans pancreáticas; ou de etiologia idiopática, usualmente levando à deficiência completa de insulina.^{4,5} Pacientes podem desenvolver problemas visuais, cerebrais, renais, cardiovasculares, e em casos mais graves, chegar a óbito, isto pode ocorrer, na falência de órgãos vitais.² As alterações bucais também podem ser observadas, como: queiloses, fissuras, ressecamento de mucosas, síndrome da ardência bucal, cáries, dificuldades de cicatrização, além de alterações na microbiota.^{6,7,8}

Entre as repercussões bucais, as periodontopatias, doenças gengivais e periodontites⁹, são as mais citadas, com prevalência de 39% na DM1 e em pacientes com diabetes tipo 2, apresentam 2,8 vezes mais chances de desenvolver a doença, quando comparados a grupos de controle.¹⁰ Pacientes com DM podem apresentar: elevação dos níveis de glicose, cálcio, potássio e magnésio, além da diminuição no fluxo e capacidade tampão salivares; diminuição da atividade dos neutrófilos; além de incompetências microvasculares; que predispõem a danos teciduais e a uma

resposta inadequada diante de infecções.^{6,11,12} A liberação de citocinas, além de produtos das bactérias na doença periodontal (DP), influenciam tecidos e órgãos à distância, o que pode comprometer a condição sistêmica do paciente.¹⁰⁻²³

Uma melhor compreensão das manifestações bucais nestes pacientes, desde a infância, pode orientar cuidados precoces, minimizando riscos e facilitando os tratamentos. Através do estudo caso-controle, buscou-se identificar a condição periodontal de crianças e adolescentes com DM1, e comparar os resultados com pacientes saudáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com uma amostra aleatória não probabilística. A fim de manter a homogeneidade dos grupos, com semelhantes níveis socioeconômicos, foram selecionados serviços que realizam atendimento de saúde gratuito à população, localizados na mesma cidade. O grupo caso foi formado por 60 pacientes com DM1, atendidos em dois hospitais públicos brasileiros. O grupo controle, por 100 crianças e adolescentes atendidas na Clínica Escola do Centro Universitário Maurício de Nassau. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o Parecer de número 912.145. Para os casos, foram selecionados os pacientes entre 6 e 13 anos de idade, com diagnóstico de DM1 e com dentes permanentes em oclusão entre si. Os valores atualizados da hemoglobina glicada (HbA1c) foram registrados. Crianças com outras doenças sistêmicas ou com uso de aparelhos ortodônticos, não foram incluídas no estudo.

Para o grupo controle, foram selecionados pacientes da mesma fase etária, sem diagnóstico de doenças sistêmicas e que apresentassem dentes permanentes em oclusão. O uso de aparelhos ortodônticos também foi critério de exclusão.

Parâmetros avaliados

O exame periodontal foi realizado com a utilização de espelho intra-oral e sondas manuais milimetradas (PC15, Universidade Carolina do Norte). Foram coletados os seguintes dados: Nível clínico de inserção (NIC); Profundidade à sondagem (PS), medida nos sítios: centro-vestibular, mesio-vestibular e disto-vestibular e centro-lingual, disto e mesio-lingual, dos dentes permanentes em oclusão.²⁴ Para o Sangramento à sondagem (SS) foi registrada a presença ou ausência de sangramento, após 30 segundos da sondagem.²⁵ Presença de placa visível (IPV): foi registrada a presença ou ausência de placa bacteriana, sem utilização de sonda.²⁵

Diagnóstico

A Doença periodontal foi classificada como: Gengivite, quando caracterizada pela presença de 25% ou mais de sítios com sangramento à sondagem e nenhum sítio com NIC > 2mm.²⁶ Periodontite, quando caracterizada pelo achado de pelo menos um sítio apresentando simultaneamente PS $\geq$ 4mm e NIC $\geq$ 3 mm.²² Pacientes com hemoglobina glicada $\geq$ 7,0 % foram considerados com mau controle glicêmico.²

Calibração

A pesquisadora realizou todos os exames clínicos periodontais nos pacientes do estudo. Foi previamente calibrada por uma especialista em periodontologia e

comparados os dados coletados. Foi verificado um coeficiente de correlação intraclasse (ICC), satisfatório para todas as análises ($0,4 \leq \text{ICC} < 0,75$).

Análise estatística

Para a análise dos dados, foram aplicados os testes de independência do Qui-quadrado de Pearson e o de Razão de Verossimilhança. Na comparação das médias de idade entre os grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O Software utilizado foi o SPSS 20.0.

RESULTADOS

O sexo masculino foi predominante em ambos os grupos, sem diferença significativa ($p=0,512$) (Gráfico 1). Os pacientes apresentaram diferentes idades, a maioria com 8 ou 11 anos, o que também não representou diferença significativa ($p=0,139$) (Gráfico 2).

No exame clínico, foram avaliados os dentes permanentes em oclusão, com média de $\pm 5,97$ a $\pm 7,25$ dentes por pacientes casos e controles, respectivamente. A maioria dos sítios examinados nos pacientes com DM1 apresentou PS igual a 1 mm (88,98%). No grupo Controle, 29,14% apresentaram PS igual a 2 mm e em apenas 3 sítios, o resultado foi igual a 4 mm. A profundidade de sondagem, portanto, foi maior nos pacientes do grupo controle e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,05$). Em relação ao SS, os pacientes com diabetes apresentaram 1,2 vezes mais hipóteses de apresentar o sangramento, em relação aos pacientes sem diabetes ($p<0,05$) (Tabela 1). A média do IPV foi maior nos pacientes sem DM1, 72,52% (Tabela 2), com placa bacteriana visível em 81,18% das faces examinadas (Tabela 1). Os pacientes com diabetes apresentaram uma média de IPV de 38,95%, com 69,37% das faces examinadas apresentando o biofilme ($p<0,05$).

Foi observado um baixo controle glicêmico no grupo caso, com valores da HbA1c entre 8,71%, em média, chegando a 15% (Tabela 3). Quando foi considerado o SS e os valores da HbA1c, observou-se que os pacientes com DM1 que apresentaram HbA1c>7%, apresentaram um número 2 vezes maior de sangramento após sondagem, que os pacientes com níveis glicêmicos normais (Tabela 4).

Todos as crianças examinadas apresentaram o NIC dentro da normalidade. Após a análise de todos os dados, não foi diagnosticada doença periodontal entre os grupos.

DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento deste estudo, foi realizado o exame periodontal em 160 crianças e adolescentes. O conhecimento prévio das características e alterações de normalidade do periodonto nesta fase do ciclo vital foram essenciais, a fim de que falsas patologias não fossem diagnosticadas. Na criança, ocorrem variações fisiológicas, como maior presença de fibras colágenas, menor queratinização do tecido epitelial gengival; além de alterações ósseas, com espaços medulares maiores, maior vascularização e suprimento linfático, o que pode representar diferenças de coloração, textura e forma dos tecidos periodontais, quando comparados ao paciente adulto.^{1,18,19} É importante ressaltar, no entanto, que em pacientes com diabetes, as alterações imunológicas, vasculares e metabólicas representam condições de risco. A susceptibilidade individual, o nível de controle glicêmico e inadequados cuidados bucais poderão alterar características de normalidade, devendo ser avaliado o caso a caso.¹⁵

A Organização Mundial de Saúde considera a DP como a sexta complicação crônica do diabetes.¹⁰ Uma pesquisa com 208 pacientes com DM, diagnosticou a periodontite severa em crianças com 11 anos de idade, aumentando a incidência de

perda óssea na puberdade e em até 26% dos casos, entre os 17 e 18 anos.²³ Nenhum caso de doença periodontal, no entanto, foi diagnosticado entre os casos e controles deste estudo. Diferenças entre as metodologias empregadas nas pesquisas podem justificar os resultados, com diferentes idades, critérios para diagnóstico ou diferentes dentições avaliadas.

Neste estudo, foram avaliados: NIC, PS, SS e IPV, com base nos dentes permanentes em oclusão, o que variou de 2 a 28 dentes por paciente, de acordo com a idade e a cronologia de erupção. Nos grupos com e sem diabetes, pacientes de ambos os sexos foram examinados, o que não comprometeu a interpretação dos resultados, pois a associação com o gênero não foi significativa. De acordo com a literatura, alterações patológicas como gengivites e periodontites, podem estar associadas ao sexo do indivíduo, quando influenciadas por alterações hormonais, como: na puberdade, gravidez e menopausa.^{1,19} Por outro lado, o sexo masculino pode representar um fator de risco, quando aspectos socioculturais podem influenciar num menor cuidado com a saúde e higiene pessoal e ainda, a uma maior exposição ao tabaco e ao álcool.^{19,23} Estudo em pacientes com DM1, entre 7 e 19 anos de idade, identificaram um percentual de indivíduos (62,8%) com presença de placa abundante e maior sangramento à sondagem, significativamente maior no gênero masculino.⁵

Após o exame da PS, com base em critérios objetivos para diagnóstico, não foi identificada a presença de gengivite. Estudos epidemiológicos, contudo, indicam a presença da gengivite como achado comum em crianças.^{27,28} Vários trabalhos que pesquisam a gengivite em crianças e adolescentes, no entanto, utilizam critérios subjetivos para o diagnóstico da doença e assim, apresentam diferentes resultados. De acordo com Toledo¹⁸, muitos vieses de confusão podem acontecer, pois o

periodonto de crianças e adolescentes podem apresentar alteração de cor, volume e forma, associados a alterações fisiológicas nos períodos de esfoliação dos dentes ou erupção dentária, o que não é doença.

Apesar da ausência da inflamação, foi identificada a presença de placa visível na maioria dos pacientes. Nas crianças com DM1, em 69,37% das superfícies dentárias, e na quase totalidade das faces, no grupo controle (81,18%). O acúmulo e metabolismo de bactérias sobre tecidos dentais representam fatores de risco para cáries, doenças periodontais e estomatites.^{19,29,30,31} O controle do biofilme melhor nos pacientes com DM1 pode estar associado ao perfil dos examinados, crianças sob uma maior vigilância de higiene e dieta. No entanto, das 5.328 faces dentárias examinadas, 3.696 apresentaram presença de placa visível nestes pacientes, sugere que ainda há muito o que se alertar, sobre a necessidade de uma atenção odontológica preventiva, também neste grupo.

Quando os resultados da PS foram comparados, observou-se que os pacientes do grupo controle apresentaram maior comprimento entre a margem da gengiva e a porção mais apical do sulco, com 2 mm, em 29,14% dos pontos examinados. Entre os pacientes com diabetes, apenas 10,80% apresentaram tal medida. Valores entre 1 e 2 mm da profundidade de sondagem, no entanto, ainda são considerados dentro dos limites de normalidade, não representando quadros patológicos.^{1,19}

Em uma Revisão Sistemática, após avaliados 37 estudos sobre a saúde oral de crianças com diabetes tipo 1, foi observado maior índice de placa e maior PS, entre os pacientes com a doença crônica, contudo, quando analisadas as pesquisas de Coorte, entre os artigos da Revisão, não foram observadas diferenças com significância estatística, entre a condição periodontal de casos e controles.³²

As periodontopatias caracterizam-se por um grupo de patologias que ocorrem nos tecidos responsáveis pela proteção dos dentes e sua inserção no tecido ósseo alveolar, mandibular ou maxilar.⁹ A etiopatogenia pode estar associada a processos inflamatórios, traumáticos, neoplásicos, alterações genéticas e metabólicas.²⁷ Grupos de microorganismos anaeróbios no biofilme dentário, no entanto, são conhecidos como os principais agentes etiológicos e a resposta do hospedeiro frente à infecção pode ser a principal responsável pelo dano tecidual.²⁹ Nos pacientes com DM, deficiências na quimiotaxia, adesão e fagocitose dos neutrófilos facilitam a persistência e a proliferação de agentes patogênicos.³⁰ De acordo com a literatura, observa-se entre pacientes com diabetes, uma resposta mais exacerbada de monócitos e macrófagos, que pode ser induzida por uma maior concentração de mediadores inflamatórios no fluido gengival, refletindo numa maior atividade inflamatória local, nem sempre compatível com a quantidade ou qualidade e atividade do agente agressor.³¹

A manutenção da saúde de crianças e adolescentes com DM1 representa um desafio diário. Na prevenção de quadros infecciosos e complicações, o controle da glicemia é essencial.³² O tratamento baseia-se na educação alimentar, que deve manter o padrão calórico e nutricional adequados ao crescimento e desenvolvimento normais, além de uma atividade física regular. A insulinoterapia, pode variar com relação às idades e necessidades individuais, com diferentes dosagens, tempo de ação e intervalos de doses a tratamentos através de bombas de infusão contínuas. A automonitorização glicêmica, com a medida da glicemia capilar e a dosagem da hemoglobina glicada são indicadas no controle e avaliação do paciente, permitindo ajustes, evitando complicações micro e macrovasculares, além de danos neurológicos.^{2,32}

Nesta pesquisa, foram registados os dados da HbA1c de todas as crianças do grupo dos Casos (Tabela 3). Os resultados variaram entre 4% a 15%, sendo a média de 8,71%, indicando assim, um grande número de pacientes com controle glicémico inadequado. De acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016), um melhor controle metabólico acontece com os níveis de HbA1c abaixo dos 7%. Nestes pacientes, observou-se também, uma associação entre a presença do sangramento após sondagem, com até 2 vezes mais hipóteses de ocorrência, nos pacientes com valores da hemoglobina glicada acima dos níveis recomendados (Tabela 4). Assim, apesar do não diagnóstico de gengivites ou periodontites, nos pacientes com diabetes tipo 1 foram observados vários fatores de risco associados, como deficiente higiene bucal e a baixo controle glicémico, circunstâncias que a médio ou longo prazo podem resultar em doenças bucais, assim como no agravamento da condição sistêmica.^{6,11,13,14}

De acordo com metanálise citada na Literatura¹⁰, o efeito do tratamento periodontal no controle glicémico dos pacientes com DM pode reduzir em 80% dos níveis de HbA1c, assim como reduções em 50% nos níveis de citocinas, como a interleucina 6 e o Fator de Necrose Tumoral alfa, representando um melhor controle metabólico.

A higiene bucal adequada, assim como tratamento médico dentário precoce, devem, portanto, fazer parte da rotina de tratamentos destes pacientes, com consultas periódicas, permitindo uma melhor qualidade de vida para crianças e adolescentes.

CONCLUSÕES

Neste estudo, com base nos critérios objetivos, crianças e adolescentes não foram diagnosticadas com doença periodontal, apesar do alto Índice de Placa Visível, do baixo controle glicêmico e maior Sangramento à Sondagem, quando a hemoglobina glicada foi $\geq 7\%$. Futuros estudos são necessários para melhor esclarecer a etiopatogenia nesses grupos.

REFERÊNCIAS

1. Guedes-Pinto AC, Mello-Moura ACV. Odontopediatria. 9ed. Rio de Janeiro: Santos, 2016.
2. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech et. al. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
3. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnemkamp, Guarigata L, Cho NH, Canavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. Diabetes Research and Clin Practice. 128(2017).40-50.
4. Schneider C, Mossman F, Coletti F, Possas M, Daudt M. Taxa de mortalidade e morbidade por diabetes mellitus. RBAC, 2009, vol. 41(4): 287-288.
5. Novotna M, Podzimek S, Broukal Z, Lencova E, Duskova J. Periodontal disease and dental Caries in children with type 1 Diabetes Mellitus . Mediators Inflamm. Volume 2015(2015).
6. Vieira TR, Peret ACA, Peret F. Alterações periodontais associadas às doenças sistêmicas em crianças e adolescentes. Rev Paul Pediatr. 2010, 28(2):237-43.

7. Arheiam A, Omar S. Dental caries experience and periodontal treatment needs of 10- to 15- year old children with type 1 diabetes mellitus. IDJ, 2014; 64:150-154.
8. Costa CC, Resende GB, Souza JM, Tavares SS, Almeida ICSS, Filho LCC. Estudo das Manifestações bucais em crianças com diabetes e suas variáveis de correlação. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, jun.2004, vol.48, no.3.
9. Dias LZS. Atual classificação das doenças periodontais. Rev Odontol.,Vitória, maio-ago.v.8,n.2.2006,p.59-65.
10. Correia D, Alcoforado G, Mascarenhas P. Influência da Diabetes Mellitus no desenvolvimento da doença periodontal.Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial.,v.51,no.3, 2010.167-176.
11. Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos Patogênicos da Doença Periodontal Associada ao Diabetes Melito. Arq Bras Endocrinol Metab 2007; 51-7.
12. Oliveira RN, Corbi SCT, Bastos AS, Orrico SRP, Scarel-Caminaga RM. Doença periodontal em pacientes com Diabetes Mellitus: influência de polimorfismos genéticos? Rev Odontol UNESP, Araraquara. jul./ago., 2011; 40(4): 187-194
13. Perez MMC, Lucena KCR, Souza PRE, CIMÕES R, LEO JC. Analysis of the polymorphism of osteoprotegerin by polymerase chain reaction in patients with type 2 diabetes and the association with periodontal condition. RGO, 2013;61:99-105.
14. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: a two-way street. J Am Dent Assoc. 2008 Mar;139(3):252.
15. Xavier ACV, Silva IN, Costa FO, Corrêa DS. Condição periodontal de crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab 2009; 53(3): 348-54
16. Araújo NC ; Bello DMA; Crovella S; Souza PRE; Donos N; Cimões R. Mannose binding lectin genes (MBL2) polymorphisms and the periodontal disease in diabetic patients. ROC, v. 26, 2011, p. 203-208.

17. Nualart-Grollmus CZN; Chavéz MCM; Donat FJS. Periodontal disease associated to systemic and genetic disorders. *Med Oral Pathol Oral Cir. Bucal*, v.12, 2007, p.211-215.
18. Toledo O.A. Doença Periodontal na criança e no adolescente. *Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica*. 4ªed.- Rio de Janeiro: Medbook, 2012.
19. Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3ª.ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ.2005.
20. Ellis JS, Seymour RA, Steele JG, Robertson P, Butler TJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: A community-based study. *J Periodontol* ,v.70, 1999, p.63-70.
21. Prisant LM; Herman W. Calcium channel blocker induced gingival overgrowth. *J.Clin.Hypertens*. 2002, 4(4): 310-1.
22. Nowzary H, Rich SK. The impact of systemic disease-associated gingival enlargement on pediatric patients. *Compend Contin Educ Dent*.v.29, 2008, p.22-30.
23. Cianciola, L.J., Park, B.H., Bruck, E., Mosovich, L., Genco, R.J. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent in diabetes mellitus. *J. Am.Dental Assoc*. 1982;104:653-660.
24. AAP - American Academy of Periodontology . Parameters of care. *J.Periodontol*.2000; 71:847-83.
25. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25:229-35.
26. Lopes NJ et al. Periodontal therapy reduces the rate of preterm lowbirth weight in woman with pregnancy associated gingivitis. *J.Periodontol*.2005, Nov;76 (11 Suppl):2144-53.

27. Soares D, de Andrade C, Pinto AR, Seabra M, Macho V. Doenças da gengiva e periodonto em crianças e adolescentes. *Acta Pediatr Port* 2009;40(1):23-29

28. Brasil - Ministério da Saúde. Condições de Saúde da População Brasileira 2002-2003. Resultados Principais. Brasília, DF, 2004.

29. Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implication for future treatment strategies. *J Periodontol.* 1993; 64:792-806.

30. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF- α secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:8-16.

31. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT *et al.* Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1b and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004;75:1203-8.

32. Ismail AF, McGrath CP, Yiu CKY. Oral Health of Children with Type I Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015,jun;108(3):369-81.

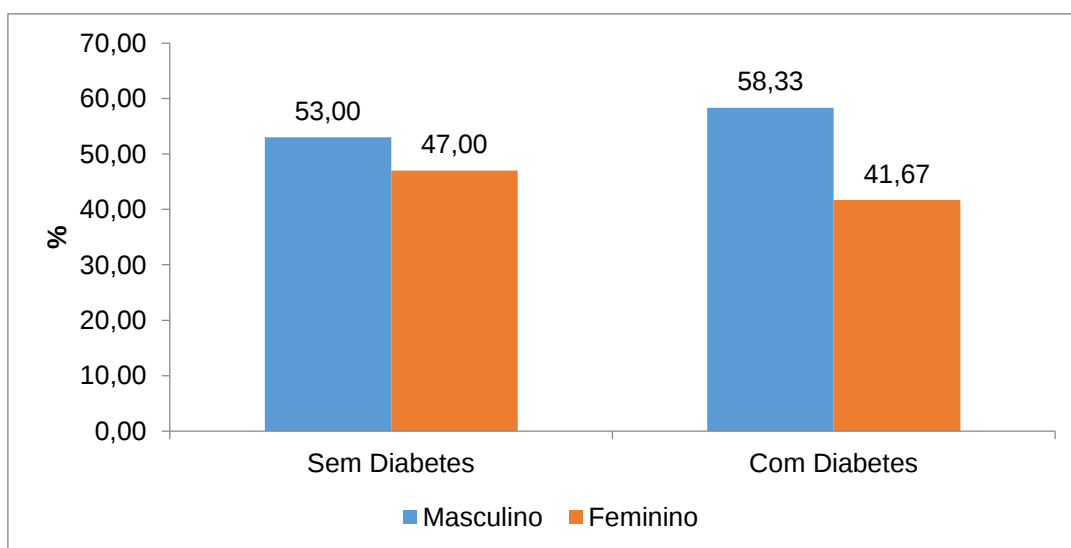


Gráfico 01 - Distribuição dos gêneros dos pacientes segundo os grupos com e sem diabetes

Visível

Não	1.338	18,82	1.63	30,63	2.970	23,88	0,000 ²	0,52	0,48	0,57
Sim	5.772	81,18	3.69	69,37	9.468	76,12				
Total	7.110	100,00	5.328	100,00	12.438	100,00				

1-Teste da Razão de Verossimilhança; 2 Teste qui-quadrado de Pearson; 3-OR – odds ratio; IC - intervalo de confiança

Tabela 2 – Médias do número de dentes permanentes em oclusão, faces presentes, números de faces com placa bacteriana visível e Índice de Placa Visível por grupo. (*) Teste Mann-Whitney

Variáveis	Grupo		p-valor *
	Caso Média ± DP	Controle Média ± DP	
No. De Dentes permanentes em oclusão	15,27 ± 7,21	12,00 ± 5,99	0,005
Número de faces presentes	61,07 ± 28,82	48,00 ± 23,96	0,005
Número de faces com placa	24,98 ± 25,20	34,20 ± 26,13	0,006
Índice de Placa visível	38,95 ± 29,05	72,52 ± 35,59	< 0,001

Tabela 3 - Medidas descritivas do percentual de hemoglobina glicada (HbA1c) dos pacientes com DM1

Variável/Grupo	N	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
HbA1c						
Diabéticos	60	8,71	8,50	2,23	4	15

Tabela 04 - Distribuição dos sítios do grupo Caso, associando o sangramento à sondagem ao percentual de hemoglobina glicada.

1 Teste qui-quadrado de Pearson; 2-OR – odds ratio; IC - intervalo de confiança

Sangramento	Diabetes	Total	p-	OR	IC 95%
-------------	----------	-------	----	----	--------

Sondagem	HbA1c ≤ 7%		HbA1c >7%				valor		
	n	%	n	%	n	%			
Não	1.80	94,3	2.856	89,3	4.65	91,2	0,000 ¹	2,00	1,59 2,50
Sim	108	5,7	342	10,7	450	8,8			
Total	1.908	100,0	3.198	100,0	5.10	100,0			

RESULTADOS

5.2 Artigo 2

Título: Avaliação periodontal de crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 e polimorfismos em locos gênicos da IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) e TNF α (-308)

Ana Carolina de Souza Leitão¹, Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos², Marcela Sandy Valença¹, Paulo Roberto Eleutério de Souza^{2,3}, Renata Cimões^{1*}

Filiações:

1 Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

3 Universidade de Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente:

E-mail: renata.cimoes@globo.com

Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Recife – PE. CEP 50670-901. Telefone: 55(81) 321268817.

Periódico:

International Journal of Paediatric Dentistry

Avaliação periodontal de crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 e polimorfismos em loci gênicos da IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) e TNF α (-308)

Ana Carolina de Souza Leitão¹, Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos², Paulo Roberto Eleutério de Souza^{2,3}, Renata Cimões^{1*}

RESUMO

Background: As doenças periodontais podem acometer crianças e adolescentes e o diabetes mellitus, assim como a presença de polimorfismos em loci gênicos de interleucinas, podem representar agentes modificadores da doença bucal.

Objetivo: Pesquisar doença periodontal (DP) em pacientes com e sem DM1 e o perfil genético para IL1 β (+3954), IL6(-174), IL10(-1082) e TNF α (-308). **Desenho do**

estudo: Foram avaliados 60 casos e 100 controles, com idades de 6 a 13 anos, foram avaliados: NIC, PS, SS e o IPV. Salivas foram coletadas para extração do DNA, amplificação por PCR e genotipagens. Através dos valores da HbA1c foi avaliado o controle glicêmico. A análise estatística foi realizada através dos Testes: Qui-quadrado de Pearson, Razão de Verossimilhança e Mann Whitney. **Resultados:** A distribuição genotípica para os loci gênicos da IL1, IL6 e IL10 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para o locus do TNF α , o genótipo GG foi mais presente entre os pacientes sem DM1. Não foi diagnosticada a DP e assim, não foi possível associar os genótipos e os alelos a essa doença. Pacientes controle apresentaram maiores IPV e PS ($p < 0,05$) e os casos, maior SS ($p < 0,05$). A HbA1c $> 7\%$ foi fator de risco para o SS ($p < 0,05$). **Conclusão:** Não foi diagnosticada a DP nesta amostra, mas foram identificados fatores de risco, com alto IPV e baixo controle glicêmico. Na análise molecular, o alelo G e o genótipo GG para o TNF α (-308) representaram fator de proteção ao desenvolvimento do DM1.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1, gengivite, periodontite, polimorfismos, interleucinas

INTRODUÇÃO

A prática odontológica moderna é caracterizada por procedimentos preventivos e minimamente invasivos, baseada em evidências.¹ Pesquisas sobre alterações nos tecidos de proteção e sustentação dos dentes em pacientes infantis, no entanto, ainda têm baixa representatividade, o que limita a fundamentação de novos protocolos clínicos.^{1,4,6}

Apesar da doença periodontal ser mais diagnosticada na fase adulta, pode ter início em crianças e adolescentes, em qualquer idade do ciclo vital, com progressão lenta, na maioria dos casos.¹⁻⁶ A inflamação gengival e a reabsorção óssea são características da patogênese da doença, associadas à resposta local, frente à ação dos microorganismos infectantes do biofilme, assim como à resposta imune do indivíduo, que pode ser modificada diante de fatores de risco como o fumo ou na presença de distúrbios sistêmicos.⁴⁻⁹

Entre as doenças crônicas, o Diabetes mellitus (DM) deve despertar especial atenção. A disfunção metabólica caracterizada pela hiperglicemia, oferece riscos às funções e estruturas vasculares, renais, visuais, cardiológicas, neurológicas nos indivíduos afetados; além de poder comprometer estruturas bucais: queiloses, diminuição do fluxo salivar, dificuldades de cicatrização; além de modificações na microbiota, que predis põem a cáries e alterações nos tecidos adjacentes aos dentes.^{4,5,8,9,10,11} Variações microvasculares, com o espessamento de capilares, alteram a permeabilidade endotelial, o que dificulta a migração e atividade de células de defesa; além de inibir a neoformação de fibras colágenas, comprometendo a fixação e proteção dental. A presença das periodontopatias, por outro lado, induz a liberação de citocinas inflamatórias, além dos produtos tóxicos dos patógenos, capazes de dificultar a absorção da insulina, dificultando a melhora da condição sistêmica.⁷

De acordo com a Associação Internacional de Diabetes, entre crianças e adolescentes, o Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é o mais comum, e representa cerca de 5 a 10% do total de casos. A doença classificada como autoimune ou de etiologia idiopática provoca a destruição de células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, levando o paciente à dependência total de hormônio exógeno.

A incidência tem aumentado na população infantil, principalmente entre menores de 5 anos.¹²⁻¹⁶ Pesquisas evidenciam que a retirada precoce do leite materno da dieta dos lactentes e assim, uma exposição antecipada ao leite bovino, tem papel importante na potencialização e etiopatogenia da doença. A alta prevalência de anticorpos anti-albumina bovina sérica (BSA) foi encontrada nestes pacientes. Capaz, portanto, de desencadear o processo autodestrutivo.¹⁰ Infecções, deficiências vitamínicas, além da suscetibilidade genética ainda são citados como fatores de risco.¹¹

Aspectos genéticos também têm sido associados a riscos de alterações nos tecidos bucais em pacientes com DM: a presença de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) em genes envolvidos na cascata inflamatória, modificando a expressão gênica e assim, a resposta imune do hospedeiro diante do agente agressor.¹²⁻¹⁸ Apesar de não ser consenso na literatura, resultados com significância estatística fizeram associação entre a presença de alelos mutantes em regiões promotoras da interleucina 1 β (+3953)¹², da IL6 (-174)¹³, do Fator de Necrose Tumoral Alfa (-308)¹⁴ e da IL-10 (-1087)¹⁵ com periodontopatias (Tabela 1). Quando os SNPs foram identificados como possíveis modificadores da resposta humoral, ora capazes de exacerbar a presença de interleucinas circulantes, ora inibindo a produção dessas proteínas, aumentando, em ambos casos, a gravidade das doenças.¹²⁻¹⁸ Os estudos, no entanto, têm sido realizados em pacientes jovens e adultos, sem estudos similares em portadores do DM1.

Diante do exposto, da necessidade de encontrar mais evidências em crianças e adolescentes, além de possíveis marcadores moleculares associados ao risco da doença periodontal, este estudo caso-controle buscou comparar a condição do periodonto de crianças com e sem diabetes tipo 1, identificando os genótipos frequentes para os genes das interleucinas IL1 β (+3954), IL6(-174), TNF- α (-308) e IL10(-1082).

MATERIAIS E MÉTODOS

O Projeto de pesquisa foi inicialmente submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob Parecer de número 912.145. O estudo caso-controle foi desenvolvido com crianças brasileiras,

no período de abril de 2015 a novembro de 2016, nos departamentos de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas de Pernambuco e do Centro Médico Senador José Ermírio de Moraes, ambos serviços públicos, localizados no município de Recife, referência no atendimento especializado a crianças com diabetes mellitus tipo 1. Na Clínica odontológica de Atendimento a criança e ao adolescente, do Centro Universitário Maurício de Nassau, foram examinadas as crianças para o grupo controle. As análises genéticas foram desenvolvidas no Laboratório de Genética e Sequenciamento, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Todos os pais ou responsáveis pelos pacientes assinaram o Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, cientes dos Riscos e Benefícios da pesquisa. Durante os exames periodontais e coleta de material biológico para o estudo, foram realizados procedimentos minimamente invasivos, gerando pouco ou nenhum desconforto nas crianças. Ao término, todos receberam escovas dentais, aplicação tópica de flúor, bem como orientações sobre saúde bucal. Discussões e palestras sobre os riscos à saúde bucal de crianças com diabetes também aconteceram com as equipes médicas dos serviços de saúde, durante o período da pesquisa.

AMOSTRA

As crianças foram selecionadas por conveniência, após passarem por critérios de inclusão e exclusão. Para o grupo caso, como critérios de inclusão, foram observados: pacientes com idade entre 06 a 13 anos; com pelo menos dois dentes permanentes em oclusão entre si; diagnóstico do DM1, de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (2015). Como critérios de exclusão: apresentar outro comprometimento sistêmico (síndromes, hipertensão arterial, imunodeficiência, cardiopatias, hepatopatias, asma, ou outra condição que de forma direta ou indireta pudesse trazer algum tipo de comprometimento na condição periodontal); fazer uso de aparelho ortodôntico.

Para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: pacientes com a mesma faixa etária do grupo caso, com pelo menos dois dentes permanentes em oclusão entre si; além de estar no primeiro dia de consulta, na clínica odontológica. Como critérios de exclusão: apresentar diagnóstico de alguma condição sistêmica debilitante (diabetes, síndromes, hipertensão arterial, imunodeficiência, cardiopatias, hepatopatias, asma, ou outra condição que de forma direta ou indireta pudesse

trazer algum tipo de comprometimento na condição periodontal); fazer uso de aparelho ortodôntico. Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, a amostra final contou com 60 pacientes para o grupo caso e 100 pacientes para o grupo controle.

CALIBRAÇÃO

A pesquisadora principal realizou todos os exames clínicos periodontais nos pacientes do estudo. Previamente, foi calibrada por uma especialista em periodontia e comparados os dados coletados. Foi verificado um Coeficiente de Correlação Intraclassa (ICC) satisfatório para todas as análises.

EXAME PERIODONTAL

Todas as crianças foram submetidas ao exame clínico periodontal, realizado com a utilização de odontoscópios e sondas manuais milimetradas (PC15, Universidade Carolina do Norte). A avaliação clínica periodontal foi realizada através de exames objetivos, com base nos dentes permanentes em oclusão.⁴

Os seguintes dados foram coletados e registrados:

Nível de Inserção Clínica (NIC): medido como a distância da junção amelocementária (JAC) até a gengiva marginal, medida em milímetros (superfícies vestibular e lingual/ palatina).¹⁹

Profundidade à Sondagem (PS): a distância entre a margem da gengiva e a porção mais apical da bolsa ou sulco. Medida com sonda milimetrada, de forma circunferencial nas superfícies central, mesial e distal vestibular; e mesial, central e distal lingual / palatina. O registro na ficha periodontal será feito para valores a partir de 4 mm de forma ordinal em escala de 1 mm.¹⁹

Sangramento à sondagem (SS): foi registrada a presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 30 segundos transcorridos da profundidade de sondagem.²⁰

Índice de Placa Visível (IPV): foi registrada presença (escore 1) ou ausência de placa bacteriana (escore 0), sem utilização de sonda, após secagem da superfície dentária com leve jato de ar comprimido.²⁰ Para o cálculo do índice, o número de

faces com presença de placa foi dividido pelo número de faces presentes e o resultado, multiplicado pelo número 100, a fim de obter o valor em percentual.

DIAGNÓSTICO

A Doença periodontal foi diagnosticada como: gengivite, quando caracterizada pela presença de 25% ou mais de sítios com sangramento à sondagem e nenhum sítio com Nível de Inserção Clínica $> 2\text{mm}$ ²¹ e periodontite, quando caracterizada pelo achado de pelo menos um sítio apresentando simultaneamente, PS $\geq 4\text{mm}$ e NIC $\geq 3\text{ mm}$.¹⁹

ANÁLISE GENÉTICA

Foram coletadas amostras de saliva dos pacientes dos grupos caso e controle, em potes estéreis e armazenados a menos 20 graus ($- 20^{\circ}\text{C}$) para posterior extração e análise do DNA. Para a extração do DNA foi utilizado o Wizard® Genomic DNA Purification Kit, da Promega, com protocolo adaptado no laboratório, após Estudo Piloto. Protocolo: no tubo de eppendorf, adicionar 500 μl de saliva (descongelada) e 600 μl de solução de lise celular do kit; descansar por 10 minutos; centrifugar por 30 segundos; retirar o sobrenadante; acrescentar 300 μl de solução de lise nuclear do Kit; colocar os eppendorfs em banho maria por 1 hora; acrescentar 100 μl de solução de precipitação do Kit; centrifugar por 3 minutos; retirar o sobrenadante em outro tubo e escartar o pellet; acrescentar 300 μl de isopropanol gelado; misturar 15 vezes, por inversão dos tubos; centrifugar por 01minuto (13.000 rpm); descartar 600 μl do sobrenadante; acrescentar 300 μl de etanol à 70%;centrifugar por 01 minuto; retirar todo álcool e inverter o eppendorf deitado em papel toalha para secar, durante 01 hora; acrescentar 50 μl de solução de reidratação do Kit; colocar em geladeira (2°C) por 24 horas; manter o eppendorf com DNA extraído, em freezer ($- 20^{\circ}\text{C}$).

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS GENÓTIPOS:

Para a pesquisa dos polimorfismos nos genes IL-1 β (+3953)²², IL-6(-174G/C)²³, IL-10 (-1082)²⁴, TNF- α (-308)²⁵ foram amplificadas as moléculas de DNA extraídas das amostras de saliva, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para um volume final de 25 μL . Foram utilizados para cada reação, uma solução Master Mix PCR (Promega), 1 μM de cada primer específico para cada

região selecionada (Tabela 2) e 5µL de DNA. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2% e visualizados sob luz ultravioleta, para fins de genotipagem.

CONTROLE GLICÊMICO:

A fim de avaliar o controle médio glicêmico dos pacientes do grupo caso, foram identificados nos prontuários individuais dos serviços de endocrinologia, os valores atualizados das hemoglobinas glicadas. Pacientes com valores de hemoglobina glicada $\geq 7\%$ foram consideradas como mau controle glicêmico.¹¹

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Para análise do exame periodontal, os dados foram expressos em valores absolutos e relativos para comparação dos valores obtidos após o exame do NIC, da PS, do SS e o IPV. Foi utilizado o Teste de Independência do Qui-quadrado de Pearson e o de razão de Verossimilhança, quando o teste do Qui-quadrado não pôde ser utilizado. Para comparação das médias de idade entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney, pois a amostra não seguia uma distribuição normal, confirmada pelo teste de Shapiro Wilk. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. O Software utilizado foi o SPSS 20.0. Para a análise genética, foi utilizado o Teste Exato de Fisher e Software Bioestat 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e os valores da OR (Odds ratio) considerados: fator de risco, quando > 1 e fator de proteção, quando < 1 .

RESULTADOS

Neste estudo, o sexo masculino foi predominante em ambos grupos, ($p > 0,05$). As crianças apresentaram diferentes idades, a maioria com 8 ou 11 anos ($p > 0,05$). No exame clínico, foram avaliados os dentes permanentes em oclusão entre si, totalizando 2.116, com média de $\pm 5,97$ a $\pm 7,25$ dentes avaliados para cada caso e controle, respectivamente. Foram avaliadas 3.664 faces no grupo caso e 4.800 faces no grupo controle. A maioria dos sítios examinados nos pacientes

com DM1 apresentou PS igual a 1 mm (88,98%). No grupo controle, 29,14% apresentaram PS igual a 2 mm e em apenas 3 sítios, o resultado foi igual a 4 mm. A profundidade de sondagem foi maior nos pacientes do grupo controle ($p < 0,05$). Em relação ao SS, os pacientes com diabetes apresentaram 1,2 vezes mais chances de apresentar o sangramento, em relação aos pacientes sem diabetes ($p < 0,05$) (Tabela 3). A média dos valores do IPV foi maior nos pacientes sem diabetes (72,52%) que nos pacientes com diabetes (38,95%), ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Foi observado um baixo controle glicêmico no grupo caso, com valores da HbA1c de 8,71%, em média, chegando à 15%. Quando foi considerado o SS e os valores da HbA1c, observou-se que os pacientes com DM1 que apresentaram HbA1c > 7%, apresentaram um número 2 vezes maior de sangramento após sondagem, que os pacientes com níveis glicêmicos compensados ($p < 0,05$) (Tabela 3). Após a análise de todos os dados da ficha clínica periodontal, não foi identificada a doença periodontal em nenhum dos pacientes do grupo caso, nem do controle.

Quando foi avaliada a distribuição alélica e genotípica entre os indivíduos (Tabela 4) para o gene do TNF α (-308), o alelo G foi mais frequente entre os pacientes sem DM1. Quando comparados os genótipos entre os grupos, foi utilizado o GG como referência. Não houve significância estatística, quando comparado ao genótipo GA ($p > 0,05$). Quando o genótipo GG foi comparado ao homozigoto AA, no entanto, apresentou maior frequência entre os pacientes sem DM1 ($p < 0,05$).

Na análise da distribuição alélica para o gene da IL-6 (-174), utilizou-se o alelo C como referência ($p < 0,05$), com uma maior frequência entre os pacientes do grupo caso. Na análise da distribuição dos genótipos, não houve significância estatística entre os indivíduos CC, GC ou GG.

Para o gene da IL-10 (-1082) foi utilizado o alelo A como referência, sem significância estatística, quando comparado ao alelo G. Ao serem comparadas as distribuições genotípicas entre os grupos, também não foi observada significância estatística.

Na análise do gene da IL-1 β (+3954) foi utilizado o alelo T como referência, sem significância estatística quando comparado ao alelo C. Para a avaliação dos genótipos, o homozigoto TT foi utilizado como referência, sem significância estatística, quando comparado ao genótipo TC ou CC.

DISCUSSÃO

A doença bucal de maior prevalência entre crianças e adolescentes é a cárie dental¹, no entanto, doenças periodontais também podem ser diagnosticadas e têm despertado a atenção de pesquisadores. Agentes modificadores, como o Diabetes mellitus, interferem na patogênese da infecção e na resposta imune do indivíduo frente aos microorganismos do biofilme e assim, casos de DP que, como regra, são diagnosticados em adultos, passam a ser também associados àqueles pacientes, o que pode comprometer tecidos de proteção e sustentação dos dentes, com riscos de perdas dentárias, se não tiver o diagnóstico e tratamento adequados.^{3,4,7}

Neste estudo, foi observada uma inadequada higiene bucal em casos e controles. O IPV foi menor, no entanto, nos pacientes com DM1. O maior monitoramento das crianças, por pais e responsáveis, acompanhadas 24 horas por dia em esquemas alimentares e medicamentosos, talvez justifique a atenção um pouco melhor sobre os cuidados bucais. Em pesquisa similar, contudo, o maior número de superfícies com placa bacteriana foi associado às crianças com diabetes.³ Assim, observa-se que a escovação dos dentes e a atenção com a saúde da boca pode variar entre as populações, ora aumentando ou diminuindo os fatores de risco às doenças.

De acordo com a Academia Americana de Odontopediatria, a gengivite tem um diagnóstico comum entre crianças e adolescentes, com distribuição universal.⁶ Neste caso-controle, foram utilizados critérios objetivos para o diagnóstico da inflamação e com base nesses parâmetros, nenhuma criança apresentou a gengivite, pois nenhum indivíduo apresentou mais de 25% dos sítios com sangramento.²¹ Achados distintos do trabalho de Xavier et al⁴, onde foram examinados 168 pacientes com diabetes tipo 1 e a prevalência desta patologia foi em 28% dos casos. Resultado esse, associado ao maior tempo de diagnóstico da doença sistêmica e ao baixo controle glicêmico.

A placa bacteriana na superfície dental representa um fator determinante para o desenvolvimento da doença, contudo, na etiopatogênese da gengivite, esta

pode levar até 7 dias para desenvolver a inflamação, após o contato dos tecidos gengivais com os microorganismos patogênicos. Além disso, a escovação dentária adequada pode reverter qualquer alteração inicial, antes do diagnóstico clínico da doença.¹ Portanto, apesar da presença de biofilme em grande número de faces dentais examinadas em casos e controles deste estudo, certamente a quantidade ou qualidade não foram suficientes para o diagnóstico da inflamação gengival.

De acordo com Toledo¹, muitas pesquisas devem ter seus resultados questionados, pois utilizam apenas critérios subjetivos para o exame clínico em crianças e adolescentes, quando nesta fase do ciclo vital, é fisiológico encontrar alterações de cor, volume e forma nos tecidos periodontais, sem que represente doença, o que pode gerar muitos vieses de confusão. Assim, evitando-se erros de diagnóstico, este caso-controle buscou critérios objetivos para o diagnóstico da gengivite, com base na metodologia de outros estudos.^{4,21}

O exame odontológico no paciente infantil, exige atenção, considerando peculiaridades inerentes ao crescimento e desenvolvimento dos indivíduos. Características estruturais são específicas, como uma maior queratinização epitelial, maior presença de fibras colágenas, maiores espaços medulares, assim como maior suprimento vascular e linfático, quando comparados ao indivíduo adulto. As crianças podem apresentar alterações fisiológicas, como a presença de edemas, aumento da profundidade do sulco gengival, alterações na coloração dos tecidos, associados a períodos de esfoliação e erupção dentárias, o que não deve ser confundido com quadros patológicos.¹

Entre os 60 casos e 100 controles, as idades variaram entre 6 e 13 anos, quando já apresentam dentes permanentes em oclusão e a estabilidade funcional do periodonto permite a padronização do exame.¹ A distribuição por sexo ou idade, no entanto, não representou significância estatística nesta amostra. Estes critérios podem estar associados a fatores modificadores da resposta humoral, como à imunossenescência, hábitos como o tabagismo ou alcoolismo, além de alterações hormonais, como na menopausa ou durante a gestação.²⁶ De acordo com a Associação Americana de Periodontia, em qualquer idade pode ser diagnosticada a doença periodontal, apesar da sua natureza progressiva, com maior prevalência entre os adultos.⁹

Quando considerado o SS, apresentou-se maior entre os pacientes com DM1, com significância estatística, apesar do IPV ter sido menor entre estes

pacientes. Nos indivíduos com diabetes mellitus, alterações microvasculares podem alterar a resposta imune do paciente, frente aos agentes periodontopatógenos e assim, a resposta inflamatória pode se apresentar de maneira mais agressiva que em pacientes saudáveis. A disfunção de leucócitos polimorfonucleares, quanto à quimiotaxia e fagocitose, além do aumento de interleucinas circulantes, podem interferir na resposta individual, aumentando a possibilidade de sangramento, assim como da evolução da doença.^{2-6,11-14}

Por outro lado, quando foi analisado o controle glicêmico entre os pacientes com DM1 e o SS, observou-se que a hemoglobina glicada com valores acima de 7%, representou fator de risco para o sangramento. Achados também descritos em outros estudos^{4,11}. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes¹¹, a meta para o melhor controle glicêmico entre os pacientes é a hemoglobina glicada abaixo de 7%. A HbA1c representa a glicemia pregressa dos últimos quatro meses e assim, funciona como importante marcador para o controle dos pacientes. A descompensação desses níveis podem interferir na função neutrofílica, no padrão de cicatrização, na neoformação de colágenos, que pioram a condição periodontal.⁴ Por outro lado, a presença de infecções periodontais, induzem o aumento de citocinas inflamatórias circulantes, o que induz resistência à insulina e assim, pode agravar a condição sistêmica do indivíduo, indicando a relação bidirecional entre as doenças.^{4,15,17,18}

O controle dos níveis glicêmicos em crianças e adolescentes, no entanto, é mais difícil, quando comparado ao paciente adulto. A dificuldade de perceber alguns sinais precoces do agravamento da doença; diferenças nos padrões alimentares, que geram variações no peso das crianças; práticas de esportes, que podem levar a grandes variações glicêmicas; além do tratamento em si, que depende da responsabilidade compartilhada com adultos, seja para a verificação da glicemia capilar várias vezes ao dia; seja aplicando os esquemas insulínicos.¹⁰ Assim, demanda de cuidados peculiares, a fim de evitar tantas oscilações na glicemia, o que nem sempre é realizado. Representa, portanto, um fator de risco a médio e longo prazo a complicações sistêmicas ainda mais graves, assim como para o desenvolvimento e progressão de periodontopatias, quando associado ao inadequado controle do biofilme dental.

Nesta pesquisa, com base nos critérios de diagnóstico para a periodontite, esta doença também não foi encontrada entre os grupos. Resultado

que difere de estudo similar, também brasileiro, que identificou a periodontite em 5,9% dos casos, com significância estatística, representando o diabetes, nesta população, como fator de risco para o desenvolvimento da patologia periodontal.⁴

Levantamentos epidemiológicos indicam que a ocorrência da periodontite e suas distintas manifestações, crônica ou agressiva, em crianças e adolescentes, não se apresentam de forma regular. Dados sobre a prevalência podem chegar a variar entre 0,1% a 20% entre os países.²⁷ O que pode ser justificado pela etiopatogênese multifatorial das doenças periodontais, da influência de fatores ambientais, socioculturais, étnicos, suscetibilidade genética, que podem aumentar ou diminuir as hipóteses de risco às doenças e a sua progressão.¹

A fim de permitir uma homogeneidade entre os grupos desta amostra, foram selecionados serviços de saúde que prestam atendimento gratuito à população, permitindo assim, semelhantes níveis sócioeconômicos entre os examinados; bem como semelhanças culturais entre eles, quando todos eram domiciliados no mesmo estado. Características genéticas individuais foram avaliadas através de técnicas da biologia molecular.

Nas últimas décadas, várias pesquisas identificaram a presença de polimorfismos genéticos SNP, em regiões promotoras das interleucinas, como possíveis fatores associados ao desenvolvimento de periodontopatias.^{12,13,14,15,17,18,22,23} Neste caso-controle, como não foi diagnosticada a gengivite, nem a periodontite, as distribuições alélicas e genotípicas analisadas nos indivíduos não puderam ser associadas à DP. Os resultados estatísticos, no entanto, permitiram avaliar os achados moleculares e o risco de desenvolver o DM1.

A presença do locus polimórfico pode induzir a uma mudança na expressão gênica e assim, alterar a função protéica, como nas citocinas estudadas. A Interleucina IL1 β , proteína pró-inflamatória, é codificada pelo gene localizado no cromossomo 2q14.1. Produzida por macrófagos, participa de várias atividades celulares: proliferação, diferenciação e apoptose. O polimorfismo no locus +3954, alterando o alelo selvagem C para T, pode alterar a resposta imune do indivíduo e aumentar os níveis da citocina circulantes no processo inflamatório. A doença periodontal poderia induzir reabsorções ósseas, com uma maior ativação de osteoclastos, além de agir como potente inibidor de neoformação dos tecidos de suporte dental.¹²

Nos indivíduos deste estudo, a presença do alelo T não representou significância estatística para o risco de desenvolver DM1, quando comparado ao alelo C, assim como a presença do homozigoto TT, com valores de $p > 0,05$. Resultado diverso, no entanto, de estudos que indicam a liberação de auto-antígenos das células β , associada à presença de maiores níveis da interleucina 1, na presença de polimorfismos, o que favorece a destruição celular pela reação autoimune.^{11,28}

A etiopatogenia do DM1 está associada a fatores genéticos, inflamatórios e ambientais, com o sistema de antígenos leucocitários humanos responsável pela primeira etapa da autoimunidade. O sistema potencializa a apresentação de auto-antígenos específicos de células beta nas ilhotas pancreáticas pelos macrófagos para os linfócitos TCD4+ e assim, inicia-se o processo autodestrutivo.^{11,28} Macrófagos ativados secretam citocinas que induzem a ativação e migração celulares, liberando produtos tóxicos às células pancreáticas.^{28,29,30} A presença de fluido inflamatório, a insulite, está diretamente associada à atividade moduladora das citocinas ao processo de citólise de células β , atividade que pode ser modificada e associada à presença de polimorfismos genéticos. Análises imunohistoquímicas de tecido pancreático indicam a presença de células dendríticas e macrófagos, como as primeiras células a infiltrarem nas ilhotas de Langerhans.²⁸ O quadro histológico do DM1 é caracterizado, portanto, pela presença do infiltrado linfomononuclear e a ausência de células beta.²⁸

Importante citocina, também pesquisada, foi a IL-6. Codificada pelo gene localizado no cromossomo 7p15.3, foi associada, em outro estudo brasileiro¹³, à susceptibilidade de desenvolver a periodontite crônica, nos indivíduos identificados com polimorfismos SNP. Apresenta função pró-inflamatória e participa da maturação de células da linhagem B, produtoras de imunoglobulinas. Polimorfismos genéticos no locus -174, alterando o alelo selvagem de G para C estão associados a uma elevação dos níveis plasmáticos desta proteína, o que pode levar a aumento da inflamação.¹³ Produzida em locais de inflamação aguda e crônica, é também marcador biológico utilizado na suspeição de DM.²⁶

Nos resultados desta pesquisa, observou-se a presença do alelo C como fator de risco para o desenvolvimento da DM1. Resultados semelhantes foram encontrados entre indivíduos japoneses, confirmando a associação entre níveis séricos elevados da IL6 e o DM.²⁶ Quando comparados os genótipos das crianças

com e sem diabetes, no entanto, com o homozigoto CC de referência, não houve associação significativa com o risco para desenvolver a doença metabólica.

Outra proteína pró-inflamatória, o Fator de Necrose Tumoral é codificado pelo gene localizado no cromossomo 6p21.33. Polimorfismos no locus -308, alterando o alelo selvagem A para G, podem alterar a resposta inflamatória, modificando a resposta imune frente aos processos inflamatórios.²⁵ Pesquisa desenvolvida com 180 pacientes com peri-implantite associou a presença do SNP, com o maior risco para desenvolver a doença periodontal, avaliando os casos de reabsorções ósseas e os genótipos, quando comparados ao grupo controle.¹⁴

Na análise desse locus, neste caso-controle, observou-se que a presença do alelo G nos genótipos, conferiu proteção ao risco de desenvolver o DM1, assim como o homozigoto GG, quando comparado ao homozigoto AA ($p < 0,05$). Mais presentes, portanto, entre os indivíduos sem diabetes.

O último locus gênico pesquisado foi o da IL10 (-1082), localizado no cromossomo 1q.32.1. A citocina anti-inflamatória codificada é produzida principalmente por monócitos, com propriedades pleiotrópicas de imunorregulação e inflamação. Inibem a síntese de interleucinas inflamatórias. Polimorfismos no locus -1082, com a modificação do alelo selvagem G pelo A, no entanto, podem induzir uma atividade diferenciada da proteína e assim, alterando a resposta imunológica do indivíduo. Estudo desenvolvido entre indivíduos europeus, associou a presença deste polimorfismo com o risco para desenvolver a periodontite. O genótipo GG foi maior, com significância estatística, entre os pacientes que apresentaram a DP, quando comparados à pacientes com o periodonto saudável.¹⁵

Neste estudo, quando analisados os achados moleculares dos grupos, não houve associação entre as distribuições alélicas ou genotípicas para o risco de desenvolver o diabetes mellitus tipo 1. Estudo desenvolvido no Japão, no entanto, sugere a associação de polimorfismos no gene da IL10, como possível marcador biológico para a suspeição do DM1. No trabalho japonês, porém, outros loci foram avaliados e assim, seus resultados não podem ser comparados aos achados dessa pesquisa.³⁰

Diante do exposto, conclui-se que as crianças e adolescentes avaliadas não apresentaram a DP, mas foram identificados fatores de risco, com alto IPV e baixo controle glicêmico. Na análise molecular, genótipos e distribuições alélicas não puderam ser associadas à doença periodontal, mas o alelo G e o genótipo GG

para o TNF α (-308) representaram fator de proteção ao desenvolvimento da DM1. Diante das limitações do estudo, da complexidade de fatores envolvidos no diabetes e na doença periodontal nesta faixa etária, novas pesquisas são necessárias.

POR QUE ESTE ARTIGO É IMPORTANTE PARA O ODONTOPEDIATRA

Este estudo é de grande importância, diante de baixas evidências científicas sobre a condição periodontal de pacientes com e sem diabetes, nesta faixa etária. A pesquisa ainda elucida sobre aspectos imunológicos e genéticos no DM1, através de conceitos e evidências, alertando sobre fatores de risco associados às reações inflamatórias e infecciosas, na etiopatogênese da doença metabólica.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Leitão, AC, realizou o trabalho de campo, coleta de dados, participou do desenho do estudo, da interpretação dos resultados e da escrita do artigo. Santos, E. contribuiu na interpretação dos dados e nas análises genéticas. Valença, MS. contribuiu na coleta de dados. Souza, PRE. Contribuiu na interpretação dos resultados, nas análises genéticas e na revisão do artigo. Cimões, R. Idealizou o projeto, realizou o desenho do estudo, contribuiu na interpretação dos resultados e na revisão do artigo. Todos os autores leram o artigo e concordaram com o resultado final.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflitos de interesses neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Toledo OA. Doença periodontal na criança e no adolescente. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. 4ed.-Rio de Janeiro: Medbook, 2012 :97-114.
2. Montero J, Rosel E, Rocio B, Lopez-Valverde A, Albaladejo A, Bravo M. Oral health-related quality of life in 6- to 12-year-old schoolchildren in Spain. International Journal of Paediatric Dentistry. 2016; 26:220–230

- 3.López del Valle LM, Ocasio-Lopez C. Comparing the Oral Health Status of Diabetic and Non-Diabetic Children from Puerto Rico: a Case-control Pilot Study.PR Health Sci.J.2011.September; 30 (3): 123-127.
- 4.Xavier, ACV, Silva IN, Costa FO, Corrêa DS. Condição Periodontal de crianças e adolescentes com diabetes melito tipo1. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;348-354.
- 5.Clerehugh, V. Periodontal diseases in children and adolescents. British Dental Journal, v.204, nº.8, apr.2008: 469-471.
- 6.Periodontal Diseases of Children and Adolescents. American Academy of Pediatric Dentistry. Reference Manual, v.38/no.6, 17/18 : 388-396.
- 7.Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E *et al.* Incidenceof the childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Care. 2000; 23:1516-26.
- 8.Alberti KGMM, Zimmet PZ, World Health Organization Consultation.Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO, 1999.
- 9.American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabete mellitus. Diabetes Care. 2015 (suppl 1): 8-16.
- 10.Macedo CLD, Ferreira MC, Naujorks AA, Tercziany A, Costa FJB, David HC et al. Aleitamento materno e diabetes tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab, vol 43, no.5,out.1999: 360-365.
- 11.Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes .Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016).
- 12.Socransky SS,Haffajee AD, Smith C, Duf GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. J Clin Periodontol 2000; 27: 810–818
- 13.Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Souza AP, Line SRP.

Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a caucasian brazilian population. J Clin Periodontol .2003;30,438-442.

14. Rakic M, Petkovic-Curcin A, Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF α single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. Clin Oral Invest, 2014.

15. Berglundh T, Donati M, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -1087 IL-10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. J Clin Periodontol 2003; 30: 249–254

16. Palomo JM, Palomo L. Periodontal Diseases and Quality of life. Biomed J Sci & Tech Res 1(3)- 2017

17. Perez MMC, Lucena KCR, Souza PRE, Cimões R, Leão JC. Analysis of the polymorphism of osteoprotegerin by polymerase chain reaction in patients with type 2 diabetes and the association with periodontal condition. RGO. 2013; v.61:99-105.

18. Araújo NC, Bello DMA, Crovella S, Souza PRE, Donos N, Cimões R. Mannose binding lectin genes (MBL2) polymorphism and the periodontal disease in diabetic patients. ROC .2011; v.26:203-208.

19. American Academy of Periodontology (AAP). Parameters of care. J.Periodontal. 2000;71:847-83.

20. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dental J.1975;25:229-35.

21. Lopes NJ. Periodontal therapy reduces the rate of preterm lowbirth weight in woman with pregnancy associated gingivitis. J Periodontal. 2005.

22. Thomson WM, Edwards SJ, Dobson-LE DP, Tompkins GR, Poulton R, Knigh DA, Braithwait AW. IL1 genotype and adult periodontitis among Young New Zealanders. Journal of Dental Research.2001; 80(8):1700-1703.

23. Lorente L, Martin MM, Pérez- Cejas A, Barros Y, Solé-Violan J, Ferreres J et al. Association between interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C), Serum interleukin-6 levels and mortality in severe septic patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:1-10.

24. Talaat RM, Mohamed YA, Mohamed EH, Elsharkaway M, Grurgis AA. Interleukin 10(-1082 G/A) and (-819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Meta Gene* 9.2016; 254-258.

25. Chang WT, Wang YC, Chen CC, Zhang SK, Liu CH, Chang FH, Hsu LS,. The -308 G/A of Tumor necrosis Factor (TNF α) and 825 C/T of guanidini nucleotide binding protein 3 (GNB3) are associated with the onset of acut myocardial infarction and obesity. *Taiwan. Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13:1846-1857.

26. Tonete AC, Nobrega OT. Imunossenescencia: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. *Rev. Bras. Gerontol*; 2008,11(2):259-273.

27. Albandar IM. Global Epidemiology of periodontal diseases in children and Young persons. *Periodontology*. 2002; 29:153-76.

28. Sesterheim P, Saitovitch D, Stawb HL. Type 1 diabetes mellitus. Multifactors that confer susceptibility the autoimmune pathogenesis. *Scientia Medica*. 2017; v.7,4: 212-217.

29. Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2005;13:743-9.

30. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Takahashi R, Kewahara H, et al. Genetic Association Between Interleukin 10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. *Human Immunology*. 2002; 63: 690-695.

TABELAS

Tabela 1. Citocinas e polimorfismos associados à DP

CITOCINA	GENEBANK	LÓCUS	POLIMORFISMO
----------	----------	-------	--------------

IL-1 β	Gene ID: 3553	+3954	C/T
IL-6	Gene ID: 3569	-174	G/C
TNF- α	Gene ID: 7124	-308	A/G
IL-10	Gene ID: 3586	-1082	G/A

Tabela 2: Primers, Enzimas e Ciclos Térmicos para PCR

LÓCUS GÊNICO	PRIMERS	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	CICLOS TÉRMICOS
IL1 β (+3953)	5'-CTCAGGTGTCCTCCAAGAAATCAAA-3' (Forward) e 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' (Reverse)	TaqI	96°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e uma incubação final de 72°C por 5 minutos
IL6(-174)	5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3' (Forward) e 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAGG-3' (Reverse)	Nla III	94° C, 52° C, 72° C por 30 segundos (cada), por trinta ciclos, durante 2 horas à 37° C
IL10(-1082)	5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3(Forward) e 5'-ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA-3' (Forward) e o primer 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG - 3' (Reverse)	-----	94°C por 2 minutos (1 ciclo), 96° C por 25 segundos, 70° C por 45 segundos e 72° C por 20 segundos (5 ciclos); a seguir, 96° C por 25 segundos, 65° C por 50 segundos e 72° C por 45 segundos (11 ciclos); ao final, 96° C por 25 segundos, 55° C por 60 segundos e 72° C por 2 minutos (15 ciclos)
TNF α (-308)	5'-AATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3' (primer forward alelo específico para A) e 5'- ATAGGTTTTGAGGGGCATGG-3' (primer forward alelo específico para G) e 5'-TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3 (Reverse)	-----	95° C por 1 minuto, 10 ciclos à 95° C por 15 segundos, 63° C por 45 segundos, 72° C por 35 segundos, 25 ciclos à 95° C por 20 segundos, 59° C por 45 segundo e 72° C por 5 minutos

Tabela 3 – Dados do Exame Periodontal - Distribuição dos sítios do grupo caso e controle segundo as variáveis: Profundidade de Sondagem, Sangramento à Sondagem, Controle Glicêmico e Índice de Placa Visível

Variáveis	Diabetes		Total n (%)	OR ³	OR ³ IC 95%	p-valor
	Sim n (%)	Não n (%)				
Profundidade Sondagem						
1mm	4.746 (88,98)	4.913 (96,10)	9.659 (77,62)	---	---	< 0,001 ¹

2mm	578 (10,84)	2.072 (29,14)	2.650 (21,30)	---	---	
3mm	9 (0,17)	122 (1,72)	131 (1,05)	---	---	
4mm	1 (0,02)	3 (0,04)	4 (0,03)	---	---	
Sangramento Sondagem						
Sim	510 (9,56)	576 (8,10)	1.086 (8,73)	1,20	1,06 – 1,36	0,004 ²
Não	4.824 (90,44)	6.534 (91,90)	11.358 (91,27)	1,00	---	
Controle Glicêmico (Casos)						
	HbA1c >7%	HbA1c ≤ 7%				
Sangramento Sondagem						
Sim	342 (10,7)	108 (5,7)	450 (8,8)	2,00	1,59 – 2,50	<0,001 ¹
Não	2.856 (89,3)	1.800 (94,3)	4.656 (91,2)	1,00	---	
Grupo						
	Controle	Caso				
	Média ± DP	Média ± DP				
Nº de Dentes permanentes em oclusão	12,00 ± 5,99	15,27 ± 7,21	---	---	---	0,005 ⁴
Nº de faces presentes	48,00 ± 23,96	61,07 ± 28,82	---	---	---	0,005 ⁴
Nº de faces com placa visível	34,20 ± 26,13	24,98 ± 25,20	---	---	---	0,006 ⁴
Índice de Placa visível	72,52 ± 35,59	38,95 ± 29,05	---	---	---	< 0,001 ⁴

1- Teste da Razão de Verossimilhança; 2 Teste qui-quadrado de Pearson; 3-OR – odds ratio; IC - intervalo de confiança 4 - Teste de Mann-Whitney

Tabela 4 – Alálise genética - Distribuição Alélica e Genotípica de polimorfismos de única base (SNPs) por grupos caso e controle

SNPs/ Alelos/ Genótipos	Sem Diabetes (n=100)	Com Diabetes (n=60)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-valor
	n (%)	n (%)	
TNF (-308)			
G	161 (80,5)	80 (66,7)	Referência

A	39 (19,5)	40 (33,3)	0,48 (0,29-0,81), 0,007
GG	66 (66,0)	28 (46,7)	Referência
GA	29 (29,0)	24 (40,0)	0,51 (0,25-1,03), 0,073
AA	5 (5,0)	8 (13,3)	0,27 (0,08-0,88), 0,031
IL-6 (174)			
C	26 (13,0)	27 (22,5)	Referência
G	174 (87,0)	93 (77,5)	1,94 (1,07-3,52), 0,039
CC	2 (2,0)	3 (5,0)	Referência
GC	22 (22,0)	21 (35,0)	1,57 (0,23-10,36), 1,0
GG	76 (76,0)	36 (60,0)	3,16 (0,51-19,79), 0,42
IL-10 (-1082)			
A	61 (30,5)	33 (27,5)	Referência
G	139 (69,5)	87 (72,5)	0,86(0,52-1,43), 0,66
AA	5 (5,0)	2 (3,3)	Referência
GA	51 (51,0)	29 (48,3)	0,70 (0,13-3,86), 0,99
GG	44 (44,0)	29 (48,3)	0,61(0,11-3,34), 0,86
IL-1 1β (+ 3954)			
T	154 (77,0)	100 (83,3)	Referência
C	46 (23,0)	20 (16,7)	1,49 (0,83-2,67), 0,200
TT	59 (59,0)	41 (68,3)	Referência
TC	36 (36,0)	18 (30,0)	1,39 (0,69-2,78), 0,45
CC	5 (5,0)	1 (1,7)	3,48 (0,39-30,85), 0,45

O tamanho do n nos alelos é o dobro dos genótipos

6 CONCLUSÕES

COM BASE NOS RESULTADOS DESTE CASO-CONTROLE, PÔDE-SE CONCLUIR:

1. Não foi diagnosticada DP nos grupos, mas foram identificados fatores de risco,

com alto IPV e baixo controle glicêmico;

2. A hemoglobina glicada $\geq 7\%$ é fator de risco para o sangramento à sondagem nos pacientes com DM1;

3. As distribuições alélicas e genótípicas não puderam ser associadas à DP;

4. O alelo C para a IL6 (-174) é fator de risco ao desenvolvimento do DM1, mas o homozigoto CC não representa associação significativa;

5. A distribuição dos genótipos para a IL1 β (+3954) e IL10(-1082) não apresentam diferença estatística entre os grupos;

6. O genótipo GG para o TNF α (-308) foi mais presente entre os pacientes sem DM1, representando fator de proteção ao desenvolvimento da doença metabólica;

7. Novos estudos são essenciais para melhor avaliar a etiopatogênese da DP em crianças e adolescentes.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. G. A. et al. Atendimento Odontológico ao paciente diabético tipo 1. **Odontol Clín-Científ**, n. 8, p. 13-19, 2009.

ALVES, C. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arq Bras Endocrinol Metab**, p. 51-57, 2007.

AMERICAN Academy of Periodontology (AAP). Position Paper. Periodontal disease of children and adolescents. **J. Periodontol** 1996; 67:57-62.

American Academy of Periodontology (AAP). Parameters of care. **J. Periodontol**, 2000; 71:847-83

American Academy of Periodontology. Periodontal (AAP). Diseases in children and adolescents. **J. Periodontol**, v. 74, p.1696-1704, 2003.

ARAÚJO, N. C. et al. Mannose binding lectin genes (MBL2) polymorphisms and the periodontal disease in diabetic patients. **Revista Odonto Ciência (Online)**, v. 26, p. 203-208, 2011.

Araújo N. C. et al. Inter-relações entre diabetes mellitus e doença periodontal. **Odontologia Clínico-Científica** (Impresso), v. supl., p. 405-408, 2011

BAEKESKOV, S. et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, 13, 347(6289), p. 151-156, sep. 1990.

BELLO, D. M. A. et al. Condição periodontal e marcadores do controle metabólico em pacientes diabéticos. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada** (Impresso), v. 11, p. 357-361, 2011.

BOSTANCI, N. et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 5, p. 370–376, 2007.

BOYCE, B. F. et al. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch.Biochem.Biophys**, v. 473, n. 2, p. 139-46, 2008.

BUWAY et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.**, v. 12, n. 9, p. 1260-1268, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. (Cadernos de Atenção Básica, n. 16). (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BURT, A. et al. Type 1 diabetes in children - touching the void in research evidence. In: Bridging the gaps. **Abstracts of the 12th Cochrane Colloquium**, Ottawa, Canada, p. 2-6, oct., 2004.

CALLIARI, L. E. P. Abordagem do Diabetes Mellito na primeira infância. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, 52/2, p. 243-249, 2008.

CARVALHO, F. M. et al. Genética da periodontite agressiva em brasileiro: resultados preliminares em famílias de ascendência africana. **R. Periodontia**, v. 17, n. 3, p. 35-40, 2007.

CHANG, W.T. et al. The - 308 G/A of Tumor necrosis Factor (TNF α) and 825 C/T of guanidini nucleotide binding protein 3 (GNB3) are associated with the onset of acute myocardial infarction and obesity. Taiwan. Int. **J.Mol.Sci**, 13, p. 1846-1857, 2012.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bones loss in periodontal disease. **J.Periodontol**, v. 79, n. 85 (suppl), p. 1569-76, 2008.

CORREIA, D.; ALCOFORADO, G.; MASCARENHAS, P. Influência da Diabetes Mellitus no desenvolvimento da doença periodontal. **Revista Portuguesa de Estomatologia - Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 51, n.3, p.167-176, 2010.

D'AITUO, F. et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **J Dent Res**, 83, p. 156-60, 2004.

SISTEMA de Informação da Atenção Básica: DATASUS (SIAB). Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/>>. Acesso em: 10 set. 2017.

DIAS, L. Z. S.; PIOL, S. A. C.; ALMEIDA, C. S. L. Atual classificação das doenças periodontais. **Rev Odontol**, v. 8, n. 2, p. 59-65, 2006.

DRLICA, K. Aplicações da genética humana. In: **COMPREENDENDO o DNA e a clonagem gênica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005.

ELLIS, J. S. et al. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: A community-based study. **J Periodontol**, v. 70, p. 63-70, 1999.

ENGEBRETSON, S. P. et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1b and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. **J Periodontol**, v. 75, p. 1203-1208, 2004.

ERLICH, H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1084-1092, 2008.

FERNANDES, A. P. M. et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus tipo 1. **Rev Latino – am. Enfermagem**, v. 13, n. 5, p. 743- 749, set.-out., 2005.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocr Rev**. v. 24, p. 278-301, 2003.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 46, n. 1, p.16-26, 2002.

GUEDES-PINTO, A. C.; MELLO-MOURA, A. C. V. **Odontopediatria**. 9. ed. Rio de Janeiro: Santos, 2016.

GUSMÃO, E. S. et al. Avaliação clínica e sistêmica em pacientes que procuram tratamento periodontal. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 20, n. 49, p.199-203, 2005.

HOFBAUER, L. C; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor B-ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J.Mol Med**, v. 79, p. 243-253, 2001.

HOÇOYA, L. S.; JARDINI, M. A. N. Polimorfismo genético associado à doença periodontal na população brasileira: revisão de literatura. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 5, p. 305-310, set./out., 2010.

HASEGAWA, T. et al. Animal models for bone and joint disease. Bone disease of osteoprotegerin deficient mouse. **Clin.Calcium**, v. 21, n. 2, p.190-196, 2011.

IDE, A. et al. Genetic Association Between Interleukin 10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. **Human Immunology**, v. 63, 690-695, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KAUFMAN, F. R. Diabetes in children and adolescents. **Areas of controversy. Med Clin North Am**. v. 82, n. 4, p. 721-38, 1998.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, 2001, v.142, n.12, p. 5050-5055, dec. 2001.

KIM, Y. J.; VIANA, A. C.; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Influência de fatores genéticos na etiopatogênese da doença periodontal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 175-180, 2007.

LAMSTER, I. B. et al. The Relationship Between Oral Health and Diabetes Mellitus. **JADA**, 2008; v. 139, (suppl 5), p. 19S-24S, 2008.

LIU, C. et al. Structural and functional insights of RANKL/RANK interaction and signaling. **J. Immunol**, v. 184, n. 12, p. 6910-6919, jun.15, 2010.

LOESCHE, W. et al. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. **J. Periodontol**, v.53, n. 4, p. 223-30, 1982.

LOPES, N. J. et al. Periodontal therapy reduces the rate of preterm lowbirth weight in woman with pregnancy associated gingivitis. **J. Periodontal**, v. 76, suppl. 11, p. 2144-2153, nov. 2005.

LORENTE, L. Martin MM, Pérez- Cejas A, Barros Y, Solé-Violan J, Ferreres J et al. Association between interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C), Serum interleukin-6 levels and mortality in severe septic patients. **Int. J. Mol. Sci**, 2016,17,1861, p. 1-10.

MEALEY, B. L. Periodontal disease and diabetes: a two-way street. **JADA**, v.139, n. 3, p. 252, 2008.

_____. Impact of advances in diabetes care on dental treatment of the diabetic patient. **Compendium Contin Educ Dent**, v. 19, n. 1, p. 41-44; 46-48, 1998.

MERCHANTA, A. T. et al. Associations between periodontal disease and selected risk factors of early complications among youth with type 1 and type 2 diabetes: a pilot study. **Pediatric diabetes**, n. 12, p. 529–535, 2011

MIZUNO, A. et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin. *Brochem Biophys. Res. Commun*, v. 247, n. 3, jun. 29, p. 610-615, 1998.

MOGI, M. et. al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **J Dent Res.**, n. 83, p. 166-9, 2004.

NERY, C. F. A atuação da periodontia na infância e na adolescência. **Revista Periodonto News**, v. 3, n. 5, p. 346-352, 2009.

NERY, C. F. Diabetes e a relação com as doenças periodontais. **Revista PerioNews**, v. 2, n. 3, p. 178-83, 2008.

NOWZARY, H.; RICH, S. K. The impact of systemic disease-associated gingival enlargement on pediatric patients. **Compend Contin Educ Dent**, v. 29, p. 22-30, 2008.

NUALART-GROLLMUS, C. Z. N.; CHAVÉZ, M. C. M.; DONAT, F. J. S. Periodontal disease associated to systemic and genetic disorders. **Med Oral Pathol Oral Cir. Bucal**, v.12, p. 211-215, 2007.

NUNES, M. D. R; DUPAS, G.; FERREIRA, N. M.L. A. Diabetes na infância/ adolescência: conhecendo a dinâmica familiar. **Revista eletrônica de enfermagem**, v.b9, n. 1, p.119-130, 2007.

OGURSTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence for 2015 and 2040. **Diabetes Research and clinical practice**, n. 128, p. 40-50, 2017.

OLIVEIRA, R. N. et al. Doença periodontal em pacientes com Diabetes Mellitus: influência de polimorfismos genéticos? **Rev Odontol UNESP**, v. 40 n. 4, p. 187-194, jul./ago., 2011.

OPPERMANN, R. V. An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. **BRAZ ORAL RES**, n. 21, Spec Iss 1, p. 8-15, 2007.

PALMER, J. P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, n. 4063, p. 1337-1339, 1983.

PARK, O. J. et al. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. **Oral Diseases**, n. 14, p. 440-444, 2008.

PEREZ, M. M. C. et al. Analysis of the polymorphism of osteoprotegerin by polymerase chain reaction in patients with type 2 diabetes and the association with periodontal condition. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, v. 61, p. 99-105, 2013.

PERRINO, M. A. Diabetes and Periodontal Disease: An Example of an Oral/Systemic Relationship. **NYSDJ**, v. 73, n. 5, p. 38-41, 2007.

PRISANT, L. M.; HERMAN, W. Calcium channel blocker induced gingival overgrowth. **J.Clin.Hypertens**, v. 4, p. 3010-3011, 2002.

REWERS, M. et al. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. **Pediatric Diabetes**, n. 10, Suppl. 12, p. 71-81, 2009.

ROSING, C. K.; OPPERMAN, R. V. **Epidemiologia das doenças periodontais**. São Paulo: Artes médicas, 2001.

ROSKAMP, L.; VAZ, R. S; LIMA, H. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatolog**, v. 29, n.6, p. 250-255, 2006.

SALAZAR-PELAEZ, L. M. et al. Polimorfismos genéticos da interleucina 1 e o risco de periodontite apical crônica numa população da Antioquia, Colômbia. **Arch Oral Res**, jan./abr., v. 8, n. 1, p. 19-30, 2012.

SCAREL-CAMINAGA, R. M. R. et al. A familial case of aggressive Periodontitis: clinical, microbiological and genetic findings. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 38, n.3, p.175-183, 2009.

SCHAPIRA L; Wilensky A; Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. **J.Clin.Periodontol**, 2005; v.32, p.72-86.

SCHNEIDER C. et al. Taxa de mortalidade e morbidade por diabetes mellitus. **RBAC**, v. 41, n. 4, p. 287-288, 2009.

SILVA, F. B.; SOUSA, S. M. G. Aplicações da biologia molecular na odontologia. Conceitos e técnicas. **UNIMEP**, v. 14, n. 2, 2002.

SILVA, M. C. **Análise histológica e radiográfica das alterações periodontais provocadas pela indução do diabetes em ratos**. 147 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, 2007. Bauru, 2007.

SILVA, M. E. R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, p.166-180, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso brasileiro sobre diabetes 2002**: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003. 73 p.

STERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H. L. Type 1 Diabetes mellitus: multifactors that confer susceptibility to autoimmune pathogenesis. **Scientia Medica**, v.17, n. 4, p. 212- 217, 2007.

TAIWO, J. O. Oral hygiene status and necrotizing ulcerative gingivitis in Nigerian children. **J. Periodontol**, v. 64, p.101-104, 1993.

TALAAT, R. M. et al. Interleukin 10 (-1082 G/A) and (-819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Meta Gene**, n. 9, p. 254-258, 2016.

TAVARES, N. C. et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, n. 62, p. 286-289, 2013.

TOLEDO, O. A. Doença Periodontal na criança e no adolescente. In: _____. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2012. cap. 6.

THOMSON, W. M. et al. IL1 genotype and adult periodontitis among Young New Zealanders. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 8, p. 1700-1703, 2001.

TODD J.A.; BELL, J.I.; McDEVIN, H. O. HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, v. 329, n. 6140, p. 599-604, 1987.

TONETE AC, Nobrega OT. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Rev Bras Gerontol**, v. 11, n. 2, p. 259-273, 2008.

TONETTI, M. S; CLAFFEY, N. Advances in the progression of periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. **J. Clin. Periodontol**, v. 32 (suppl.6), p. 210-213, 2005.

TROUVIN, A. P.; GOEB, V. Receptor activation of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin maintaining the balance to prevent bone loss. **Clin Interv. Aging**, v. 5, p. 345-354, 2010.

TYROVOLA, J. B, et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **Journal oral Sci**, v. 50, n. 4, p.367-76, 2008.

VAN DYKE, T. E.; LESTER, M. A.; SHAPIRA, L. The role of the host response in periodontal disease progression: implication for future treatment strategies. **J Periodontol**, n. 64, p. 792-806, 1993.

VIEIRA, T. R. et al. Relação entre periodontite e diabetes mellitus em crianças e adolescentes. **Arq bras odontol**, v. 4, n. 2, p. 92-95, 2008.

XAVIER, A. C. V. et al. Condição periodontal de crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 3, p. 348-354, 2009.

ZAITTER, S.; FERENCZ, C.; TOMAZINHO, P. H. Avaliação da microbiota salivar de pacientes pediátricos com e sem diabetes melito tipo 1. **RSBO**, v. 3, n. 1, p. 24-27, 2006.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) ou menor que está sob sua responsabilidade, para participar, como voluntário(a), da pesquisa Polimorfismos Genéticos e a doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1. Esta pesquisa é da responsabilidade da pesquisadora Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão, com endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Recife-PE. CEP 50670-901, telefone: (81) 92421870, e-mail: carolinalfalcao@hotmail.com e está sob orientação de Renata Cimões Jovino Silveira, telefone: 88310501, e-mail: renata.cimoes@globo.com Também participa desta pesquisa o pesquisador Paulo Roberto Eleutério de Souza, telefone para contato: 33206095.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido(a) sobre sua participação. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que o(a) menor faça 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 nem o(a) Sr.(a) nem o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade serão penalizados(as) de forma alguma. O(a) Senhor(a) tem o direito de retirar o consentimento da participação do(a) menor a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem como objetivo pesquisar a presença de alterações genéticas, que são informações contidas no interior das células e observar se há relação com a presença de inflamação nas regiões em torno dos dentes. Em apenas uma sessão, serão realizados na criança: um exame odontológico, a fim de verificar as condições gengivais; e uma coleta de 05 ml de saliva, através do cuspe da criança, em recipiente estéril, a fim de ser posteriormente avaliada em laboratório, para que seja observada a presença ou ausência de estruturas que podem aumentar o risco de desenvolver doenças na gengiva. Todo material biológico coletado da saliva será utilizado para fins exclusivos da pesquisa, podendo ser solicitado a qualquer momento, em caso de desistência da participação neste trabalho.

RISCOS: Os exames poderão gerar pequeno desconforto no paciente, em virtude do contato dos instrumentos com os tecidos bucais. A fim de minimizar, todo procedimento será realizado com o uso de instrumentos específicos e executados por profissional qualificado.

BENEFÍCIOS: A criança e os pais ou responsáveis receberão orientações sobre a importância da saúde bucal e sobre os riscos da cárie e inflamações gengivais; além da criança receber uma aplicação tópica de flúor, a fim de estimular os cuidados bucais. A pesquisa poderá identificar um maior ou menor risco da criança desenvolver doenças em torno dos dentes, o que poderá contribuir para a melhoria da saúde, através de orientações necessárias e tratamentos odontológicos preventivos.

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 participação do/a voluntário(a). Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para ele/ela participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a participação serão assumidas pelos pesquisador. Fica também garantida indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação do/a voluntário/a 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 –

Prédio do CCS – 1º andar, sala 4 – Cidade Universitária, Recife – PE. CEP: 50740-600, Tel.:(81) 2126.8588- e-mail: cepccs@ufpe.br)

Pesquisadora

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____,

Abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo **Polimorfismos Genéticos e a doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1**, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele(a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para o (a) menor em questão.

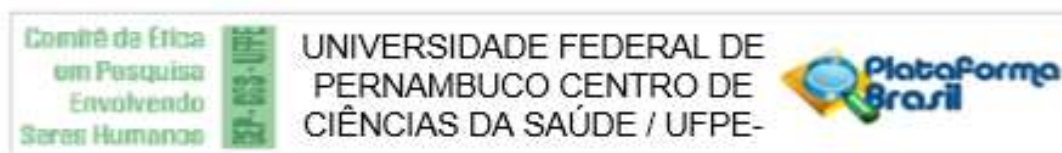
Recife, _____ de _____ de _____

Assinatura do(a) responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Nome:

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética - CCS/ UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos genéticos e a doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1

Pesquisador: ANA CAROLINA DE SOUZA LEITÃO ARRUDA FALCÃO

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 38878714.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 912.145

Data da Relatoria: 14/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa de aluno da Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, orientado pela Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira da UFPE. A pesquisa será realizada em diabéticos, atendidos no ambulatório de pediatria do HC/UFPE onde será avaliado se existem polimorfismos genéticos associados à presença de doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL Avaliar a presença de polimorfismos genéticos relacionados aos processos inflamatórios em crianças portadoras de DM1 comparativamente a um grupo de crianças não diabéticas e verificar a associação à condição periodontal dos indivíduos.

Objetivo Secundário:

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3.2.1. Avaliar a condição clínica periodontal em crianças portadoras de DM1; 3.2.2. Verificar a presença de polimorfismos genéticos relacionados aos processos inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-10, TNF-, OPG e RANK) em crianças DM1; 3.2.3. Verificar se os genótipos polimorfos estão associados às condições periodontais de crianças portadoras de DM1.

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

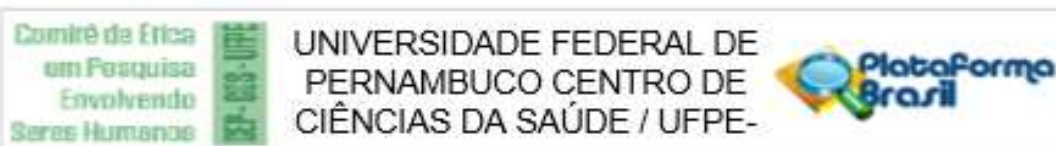
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 012.145

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Bem delineados no Projeto e TCLE

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será do tipo Caso-Controlle, com delineamento transversal. A amostra será formada por conveniência, por pacientes infantis, atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC), referência em Pediatria e Endocrinologia Pediátrica, com base no cadastro da Central de Regulação do Estado – Central de Leitos – Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. De acordo dados do setor de Endocrinologia Pediátrica do HC, em 2014, o hospital apresenta um total de 169 pacientes diabéticos tipo 1 cadastrados, subdivididos em 13 grupos, que são acompanhados em dia específico, a cada 04 meses, pelo serviço.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

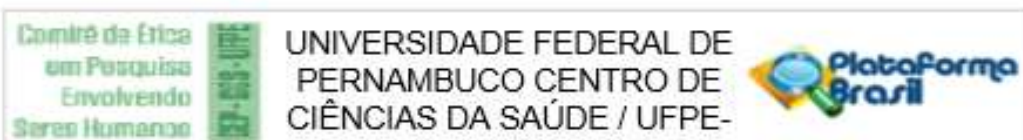
Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo avaliado em reunião do Comitê e liberado para o início da coleta de dados.

Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do relatório final - pelo pesquisador - ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE via "Notificações".

O CEP, após apreciação desse relatório, emitirá Parecer Consubstanciado pelo sistema Plataforma Brasil.

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: (51)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 912.145

RECIFE, 12 de Dezembro de 2014

Assinado por:
 GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (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

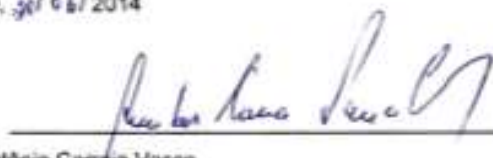
ANEXO B - Carta de Anuência do Hospital das Clínicas de Pernambuco



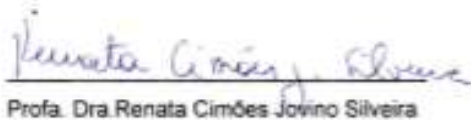
CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins, que autorizo a doutoranda Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão, regularmente matriculada no doutorado em Odontologia Integrada do PPGODONTO, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, a desenvolver pesquisas nos ambulatórios de pediatria, do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Após aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética desta Universidade, a doutoranda realizará exames na cavidade bucal de pacientes infantis diabéticos tipo 1 e não diabéticos, através de procedimentos não invasivos, assim como realizará orientações sobre saúde bucal a pacientes e responsáveis. Intitulada como: Polimorfismos genéticos e a doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1, a pesquisa será realizada sob a orientação da Professora Dra. Renata Cimões Jovino Silveira, docente permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde – UFPE.

Recife, 30/06/2014


 Dr. Antônio Correia Vasco
 Ambulatório de Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO


 Prof. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira


 Ana Carolina de Souza Leitão A. Falcão
 Doutoranda – PPGODONTO- UFPE
 CRO 5769

ANEXO C - Carta de Anuência da Prefeitura do Recife – Secretaria Municipal de Saúde



CARTA DE ANUÊNCIA

Autorizo **Ana Carolina de Souza Leitão Arruda Falcão**, pesquisadora de Pós-graduação em Odontologia Integrada, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, a desenvolver pesquisa no Centro Médico Senador Ermírio de Moraes, da Secretaria de Saúde do Recife, sob o título: "Polimorfismos Genéticos e a doença periodontal em crianças diabéticas tipo 1", sendo orientada por Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Estarei ciente que me são resguardados e abaixo listados:

- O cumprimento das determinações éticas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa;
- A liberdade de recusar a participar ou retirar minha anuência, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma;
- A garantia de que nenhuma das pessoas envolvidas será identificada e terá assegurado privacidade quanto aos dados envolvidos na pesquisa;
- Não haverá nenhuma despesa para a Secretaria de Saúde do Recife decorrente da participação na pesquisa.

O(s) pesquisador(es) comprometem-se a trazer para esta diretoria o relatório final da pesquisa através de cópia em *Compact Disk* (CD), uma vez que só serão autorizadas novas pesquisas se não houver pendências de devolutiva do serviço.

Tenho ciência do exposto e concordo em fornecer subsídios para a pesquisa.

Recife, 20 de janeiro de 2016.

Atenciosamente,


Juliana Ribeiro
 Chefe de Divisão de Educação na Saúde

Juliana Ribeiro
 Divisão de Educação na Saúde
 DES/SEGES/SESAL/PCR
 Matrícula nº 99.986-8

ANEXO D - Carta de Anuência do Centro Universitário Maurício de Nassau



ANUÊNCIA DE PESQUISA NA CLÍNICA DE ATENÇÃO À CRIANÇA E AO ADOLESCENTE DA UNINASSAU

Eu, M^{te} da Conceição Andrade de Oliveira, coordenadora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Maurício de Nassau, estou ciente de que a docente da disciplina de CLÍNICA DE ATENÇÃO À CRIANÇA E AO ADOLESCENTE, a professora ANA CAROLINA DE SOUZA LEITÃO ARRUDA FALCÃO, doutoranda em ODONTOLOGIA INTEGRADA na Universidade Federal de Pernambuco(UFPE), após a anuência da Direção Pedagógica desta Instituição, realizará parte da pesquisa de doutorado, na clínica odontológica da Uninassau, de acordo com Projeto de Pesquisa apresentado, bem como do Parecer do Comitê de ética, já aprovado pela UFPE.

Recife 03 de outubro de 2016

Conceição Andrade de Oliveira
Coordenadora de Curso
Ass: 020113111

M^{te} da Conceição Andrade de Oliveira



Faculdade Maurício de Nassau

Recife-PE: Rua Fernando Iozzi, 788-Saque, CEP 51011-221, 811(3412-4640) **Jaboão-PE:** Av. Almirante Bessa, 833-Centro, CEP 55040-200 853(2107-5889)
Complexo Granda-PE: Rua Antônio Carneiro de Sousa, 295-Straço Velho, CEP 51100-970, 853(2101-8900) **Salvador-BA:** Av. Tombador, 88-Petropolis, CEP 41890-440, (71) 3585-9500 **Natal-RN:** Av. Engenheiro Roberto Freire, 1514-Capim Macio, CEP 59080-400, 854(3344-7880) **Maceió-AL:** Av. Prof. Sanchoal Amorim, 230-Porta Verde, CEP 57035-200, 821(3199-2299) **Aracaju-SE:** Rua Rachado, 1871-São José, CEP 48015-150 www.uninassau.edu.br

ANEXO E - Ficha clínica periodontal

FICHA CLÍNICA

NOME: _____
 SEXO: () Masculino () Feminino DATA: _____ idade: _____

Dente	Profundidade de Sondagem (mm)						Excesso Gingival (mm)						Furca			Mob	NIC
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina			M	D	P		
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M					
18																	
17																	
16																	
15																	
14																	
13																	
12																	
11																	
21																	
22																	
23																	
24																	
25																	
26																	
27																	
28																	
38																	
37																	
36																	
35																	
34																	
33																	
32																	
31																	
41																	
42																	
43																	
44																	
45																	
46																	
47																	
48																	

SANGRAMENTO À SONDAGEM: AUSÊNCIA (0) PRESENÇA (1) APÓS 30 SEG DA SONDAGEM

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		

PRESENÇA DE PLACA VISÍVEL:
 AUSENTE (0) PRESENTE (1)

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 F - Artigo Publicado com o grupo de pesquisa no Archives of Oral Biology: Evaluation of the effect of tacrolimus on periodontitis induced in rats

Archives of Oral Biology 80 (2017) 89–94



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aob



Evaluation of the effect of tacrolimus on periodontitis induced in rats



Luiz Alexandre Moura Penteado^{a,b,d}, Gilmara Medeiros Lucena^b,
Marcílio Otávio Brandão Peixoto^b, Thiago Correia Barbosa^c,
Ana Carolina de Souza Leitão Arruda^{d,*}, Renata Cimões^d

^a Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

^b University Center Cesmac, Maceió, Alagoas, Brazil

^c North University of Paraná, Londrina, Paraná, Brazil

^d Federal University of Pernambuco, Health Sciences Center, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2016

Received in revised form 15 February 2017

Accepted 27 March 2017

Keywords:

Tacrolimus

Alveolar bone loss

Periodontitis

ABSTRACT

Objective: This study was to investigate the effect of tacrolimus (FK506) on periodontitis induced in rats. **Design:** Periodontal disease was induced in 30 Wistar rats which were then randomly divided into two groups: treatment with a daily injection of 0.9% saline (1 mL/day) and treatment with a daily injection of FK506. After periods of 10, 15 and 30 days the animals were killed and separate radiographs of the right and left hemimandibles were obtained. One calibrated examiner measured the periodontal bone support (PBS) in the images, after the following treatments: S, saline without ligature; SL, saline with ligature; T, FK506 without ligature; TL, FK506 with ligature. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test ($p < 0.01$).

Results: The radiographic results were similar at all evaluation time points. The S treatment had a higher PBS averaging at 10, 15 and 30 days, which was statistically significant different compared with the SL treatment and TL treatment, but not significantly different from the T treatment. The SL and TL treatments showed no statistically significant differences between them.

Conclusions: Tacrolimus used for up to 30 days showed no protective or aggravating effects on alveolar bone loss.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Periodontal disease is a pathologic process that affects the protective and/or support periodontal structures (Cortelli, Lotufo, & Sallum, 2005). The primary cause of periodontal disease is the accumulation of microorganisms organized in the form of dental biofilm (Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2006; Page & Kornman, 2000). Apical migration of the junctional epithelium and adjacent conjunctive tissue, with loss of alveolar bone structure, distinguishes periodontitis from the various forms of gingivitis (Clemons, Reynolds, Agarwal, Boughman, & Suzuki, 1990; Pihlstrom, Michalowicz, & Johnson, 2005).

During disease progression, different degrees of compromise of the periodontium may be observed, and there may be tooth loss. The scientific literature has shown that, in some situations,

periodontal disease may have a significant impact on the individual's systemic condition (Lindhe, Karring, & Lang, 2003). Therefore, it may play a role as an infectious focus, contributing to cardiovascular diseases, cerebral vascular accidents, diabetes mellitus, premature birth, respiratory diseases, among others (Cury, Joly, de Araújo, Wassall, & de Araujo, 2003; Lindhe et al., 2003).

The routine therapy adopted for the treatment of periodontal disease is control of the local causative factors. This treatment is based on the mechanical processes of root scaling and planing (RSP) accompanied by effective mechanical biofilm control (brushing) by the patient. When it is not possible to reverse disease progression exclusively by means of mechanical control, there is the possibility of periodontal surgical intervention (Lascala & Moussalli, 1999).

However, there is a form of periodontal disease that affects around 2% of the population (Quirynen et al., 1995) which is characterized by rapid evolution and is frequently associated with highly virulent and resistant bacteria. In these cases, the disease is classified as aggressive periodontitis, and it has been demonstrated

* Corresponding author at: Federal University of Pernambuco, Health Sciences Center, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, University City, Recife, PE, 50670-901, Brazil.
E-mail addresses: carolinalafalcao@hotmail.com, carolinalafalcao@gmail.com (A.C. de Souza Leitão Arruda).

that this form of presentation of the disease does not respond adequately to routine conventional therapies (Armitage, 1999).

Newman et al. indicated the coadjuvant use of antibiotics for the treatment of aggressive periodontitis, and these may be systemically or locally administered, with the purpose of potentiating the effect of scaling, since there is evidence of the presence of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, strictly anaerobic microorganism (Newman et al., 2006).

However, the use of antibiotics has been shown to have limitations in some cases, in addition to the question of the possibility of bacterial resistance resulting from indiscriminate use. Thus, over the last few decades, the use of immune response modulators has emerged as an alternative treatment for cases of aggressive periodontitis. Chemically modified tetracyclines, such as doxycycline (Periostat®) and minocycline, have been shown to have this characteristic (Lotufo, Kantorski, & Zimmermann, 2003; Lindhe et al., 2003; Newman et al., 2006) cyclosporine (CsA) itself is essentially an immunosuppressor. Nassar et al. by means of an experimental study, proved that immunosuppressed rats treated with CsA presented less alveolar bone loss under conditions of induced periodontitis (Nassar, Oehlmeier, Abi Rached, & Spolidorio, 2000). Nassar et al., also observed that there was less alveolar bone loss in animals with induced periodontal disease treated with meloxicam in a subchronic and chronic form, compared with those who were not treated; there was a reduction in the progression and intensity of periodontal disease because, according to the authors, this medication acts on the immunoinflammatory response (Nassar, Nassar, & Inagaki, 2003).

Therefore, further studies are needed to corroborate the information already available. In addition, with a view to greater power, cost reduction, ease of application, and lower toxicity must be investigated, and evidence of how other immunosuppressive drugs behave is needed.

Tacrolimus (FK506) is a macrolide antibiotic produced by *Streptomyces tsukubaensis*, available on the Brazilian market for topical or systemic use. As occurs with CsA, tacrolimus inhibits T-cell activation by blocking calcineurin activity, thereby leading to a reduction in cytokine formation. At present, it is mainly prescribed for cases of liver and kidney transplants (Silva, 2006; Yagiela, Neidle, & Dowd, 2000). The hypothesis raised in this study is that tacrolimus may have an effect on the course of periodontal disease and may prevent and/or assist in the treatment of periodontal diseases that do not respond adequately to conventional therapy.

Using radiographs, this study evaluated the immunosuppressive effect of tacrolimus on periodontitis induced in rats, and the cytotoxicity resulting from tacrolimus therapy using biochemical and histopathological analyses.

2. Materials and methods

The project was submitted for evaluation to the Research Ethics Committee (REC) of the School of Biological and Health Sciences – Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde of FEJAL/Cesmac

(registered with CONEP/CNS/SIPAR/MS on 14/12/2007 No. 25000.223512/2007-58) and was approved under Protocol No. 082A/2009.

After approval, an experimental study was performed using an animal model. The sample comprised 30 clinically healthy adult male Wistar rats from the same lineage ranging in weight from 250 to 300 g, obtained from the Vivarium of FCBS, FEJAL/CESMAC. The animal model used in this study was in accordance with the literature, in which rats are frequently used to study chronic periodontitis (Johnson, 1975; Koide et al., 1995). These animals offer some advantages, such as price and ease of handling, and they allow microbiological, macroscopic, histological and radiographic evaluation (Rêgo, de Lima Pompeu, Moreira, Naidu, & da Silva Pereira, 2010).

Throughout the experiments, the rats were maintained in 12-h (light/dark) circadian cycles, and were fed with rations (Labina – Purina®, São Lourenço da Mata/PE, Brazil) and water ad libitum (Irie, Tomofuji, & Tamaki, 2008; Sanbe et al., 2007).

To investigate the hypothesis raised as the central question of this study, periodontal disease was induced in the animals. The clinical, radiographic, and histological aspects of periodontal disease in rats are similar to those found in humans (Klausen, Evans, & Sfintescu, 1989; Koide et al., 1995; Rêgo et al., 2010). The animals were weighed to calculate the correct dose of the anaesthetic (ketamine chloride (Dopalen – Sespo, Jacaré/SP, Brazil) and xylazine chloride (Rompun – Bayer do Brasil, São Paulo/SP, Brazil)). The animals were anesthetized using doses of 0.8 mL/100 g and 0.4 mL/100 g of body weight, respectively, intramuscular injection (Nassar et al., 2003; Ricardo, Balducci, Vasconcelos, & Carvalho, 2006; Rêgo et al., 2010).

After anaesthesia the animals were placed on an operating table (Doku, Shklar, & Bugbee, 1966). The oral cavity was opened using two rings made of Chrome Nickel No. 0.07 orthodontic wire (Dental Morelli Ltda, Sorocaba – SP) fastened to the incisors (maxillary and mandibular); the tongue was then pulled with a silk suture thread No. 3-0 (Ethicon, São Paulo/SP, Brazil) in the opposite direction to the tooth that would receive the ligature (right mandibular 1st molar, 1st RMDM).

Using a No. 5 exploratory probe (Prata Produtos Odontológicos Ltda, Caieiras – SP), temporary separation was performed between the right mandibular first and second molars; the No. 5 probe was always introduced in a standardized manner in the distal crenation of the first molar, and separation was considered complete when the top of the probe was visualized in the lingual to vestibular direction. This separation enabled subgingival insertion of the ligature (silk suture thread No. 3-0, Ethicon, triangular needle CT 1.7 cm, 45 cm long, black color, Brazil) using two curved Kelly forceps (Golgran Instrumentos Cirúrgicos e Odontológicos Ltda, São Paulo – SP), to catch the thread and place it in the interproximal space between the right mandibular first and second molars. The ligature was then stabilized with a simple knot in the mesial region of the first molar (Fig. 1).



Fig. 1. Procedure for induction of periodontal disease: (A) positioning + opening of the oral cavity, (B) withdrawal of the tongue, (C) temporary separation of the first and second molars, and (D) subgingival placement of the ligature.

Once a week, throughout the experiment, the animals were anesthetized and a simple visual inspection was performed to verify the position and subgingival stability of the ligature. In the present study, ligature displacement did not occur in any of the animals. Authors believe that to act as a gingival irritant and favored accumulation of bacterial biofilm, consequently establishing periodontal disease in a period of 10 days (de Azevedo Galvão, Chapper, Rösing, Cardoso Ferreira, & de Souza, 2003; de Azevedo Galvão, Rösing, & Cardoso Ferreira, 2003; Gonçalves, da Rocha Nogueira Filho, Sallum, & Sallum, 2003; Rêgo et al., 2010).

From the tenth day after ligature insertion, the animals were randomly divided into two groups of 15, the randomization was performed by means of a simple draw, first of an opaque plastic bag was removed the number of the animal and another the treatment that Would receive. From the tenth day after ligature insertion, the animals were randomly divided into two groups of 15, the randomization was performed by means of a simple draw, first of an opaque plastic bag was removed the number of the animal and another the treatment that Would receive Group 1 served as negative controls, and in addition to the ligature on the right mandibular first molar, the animals received a daily interperitoneal injection of 1 mL of 0.9% saline solution. The left mandibular first molar of the animals in this group did not receive the ligature. Group 2 served as the test group, and in addition to the ligature on the right mandibular first molar, the animals received a daily intraperitoneal injection of tacrolimus; 1 mg/kg per day (Jiang, Sakuma, & Fujii, 1999; Nassar et al., 2007). The left mandibular first molar also remained without ligature in this group.

Thus, using this model, the study assessed the following treatments: SL, saline with ligature; S, saline; TL, tacrolimus with ligature; and T (tacrolimus). Fig. 2 presents an organizational chart showing the samples and treatments.

Five animals in each group were submitted to euthanasia at 10, 15, and 30 days after induction of periodontal disease. This procedure was conducted in accordance with the requirements of the Federal Council on Veterinary Medicine – CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) Resolution No. 714, June 20, 2002, which regulates the manner in which laboratory animals must be treated in Brazil.

The main solid visceral organs (liver, kidneys, lungs, spleen, and heart), as well as blood samples were collected for histopathological and biochemical analyses to verify the risks for toxicity related to the experiment.

The hemimandibles were removed and desiccated for the purpose of taking individual conventional radiographs. For each hemimandible and radiographic film, a single tip of a modified Williams periodontal probe (probe Maceió – Neumar Instrumentos Cirúrgicos Ltda, Caieiras – SP) was included to form a set consisting of the film (a), hemimandible (b), and the probe tip (c), as shown in Fig. 3.

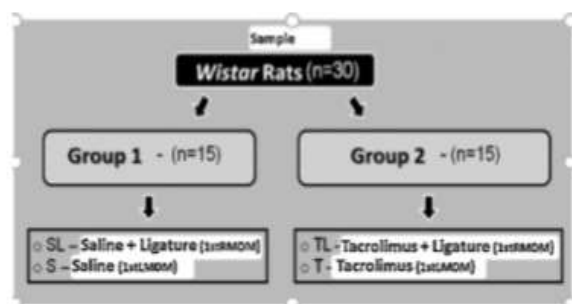


Fig. 2. Sample distribution (n = 30) in groups 1 and 2 and treatments used (SL, S, TL, and T).

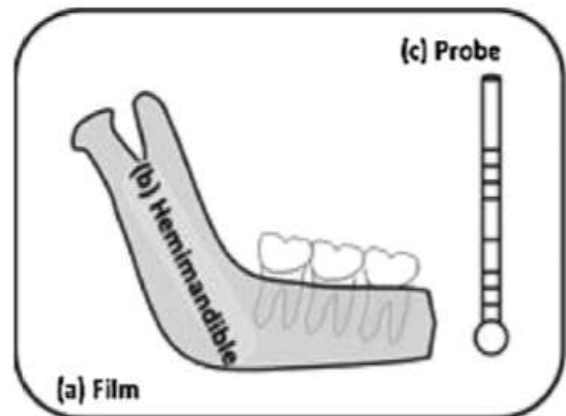


Fig. 3. The image set: film (a); hemimandible (b), and probe (c).

All the radiographs were taken in the same dental appliance (Gnatus brand, model Timex; 70 kVp and 8 mA), using adult periapical film (Dental Intraoral E-Speed Film 30.5 × 40.5 mm; Kodak®, Carestream Health Inc, Rochester, NY, USA), from the same lot. The focus-object distance was also standardized using a periapical radiographic positioner (Jon®, São Paulo – SP, Brazil); the exposure time (0.32 s) applied for all radiographs was the same as that used by Nassar et al. (2003). All the radiographic films were developed at the same time in an automated processor (model A/T 2000® XR; Air Techniques Inc, Hicksville, NY, USA).

The periodontal probe was introduced as an image reference parameter (standard) to calibrate the *ImageJ* program, which was used to measure the remaining periodontal bone support (PBS) by comparing the tested (1st RMM) and untested first left mandibular molar (1st LMM) teeth of each animal, according to the method proposed by Cavallini (2006). As images are required for this program, it was necessary to digitize the radiographs.

The radiographs were digitized in a standardized manner using a reflex type camera (Canon EOS Rebel XSi, Canon Inc, Japan) and a DG Macro 105 mm lens, F2.8 Sigma EX (Sigma Corporation, Japan). During image capture (photographs), the camera was stabilized on a photographic tripod (Velbon CX300, Velbon Zhongshan Co Ltd., China). All the photographs/images were standardized in the camera and captured in JPEG format at a resolution of 600 dpi in 8 bit gray tones, in addition to using the retard button set at 10 s.

The saved images were analyzed with regard to PBS using the *ImageJ* software program, version 1.37 (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The tip of the millimetric periodontal probe was used to calibrate the *ImageJ* program by tracing a line from 0 to 5 mm, acting as the scale to define the PBS measurements. The analysis was performed by a single blind evaluator, who was calibrated by performing three measurements from the apex to the cuspid of the tooth, at time intervals of 0, 30, and 60 min; these measurements were submitted to Pearson's correlation test and the evaluator was considered calibrated when $R^2 \geq 0.8$.

The calibrated fixed points for the measurements of PBS, following the recommendations of Cavallini (2006); were on the distal tooth cuspid tip (C), the point of the bone crest or bone defect (B), and on the root apex (A) on the distal side of the mandibular first molar. From these three points, linear measurements (standardized in millimeters) were obtained; the measurement of PBS was calculated using the formula $AB/AC \times 100$, also in accordance with the method proposed by the same author (Cavallini, 2006).

From the three measurements obtained, the mean and standard deviation were calculated and saved in the *Microsoft Excel*. The data were then submitted to the Shapiro–Wilk statistical test to verify

their normality. Normal distribution was obtained and the data were then submitted to analysis of variance (ANOVA) at a level of significance of 1% and differences were determined by the Tukey test ($p < 0.01$).

3. Results

Of the total number of animals investigated ($n = 30$), two rats that received SL treatment for a period of 10 days, one that received SL treatment and one that received TL treatment for 30 days, were lost during the weekly procedure for verification of subgingival ligature stability. The loss of these animals was associated with an accidental complication due to anaesthesia. Table 1 shows the final distribution of animals according to group, period and treatment applied. The results are given from the radiographic observations of 12 animals in group 1 and 14 animals in group 2.

Fig. 4 presents the percentage of the remaining PBS for the different treatments after 10, 15, and 30 days. Irrespective of the time interval evaluated, lower PBS was found after SL and TL treatments but there was no statistical differences between them ($p > 0.01$). The S and T treatments presented the highest PBS values without statistical difference between them ($p > 0.01$). When the presence of the ligature (SL and TL) was compared no ligature (S and T) statistical differences ($p < 0.01$) were observed; higher PBS was always observed when there was no ligature.

4. Discussion

Within the bibliographic survey conducted for the present study, only the study of Guimarães, Nassar, and Andia (2007), performed a radiographic evaluation of the effect of periodontitis induced in rats, thereby allowing their results to be compared with those of the present research. From the point of view of radiographic analysis, the present study differs from that of Guimarães et al., 2007, with regard to the method used for radiographic evaluation. Guimarães directly measured alveolar bone loss using as reference the distance between the alveolar bone crest and the cementum–enamel junction, while the present study quantified the remaining PBS; thus providing a more reliable diagnosis of dental insertion.

In a period of 10 days, Guimarães et al. (2007) observed that the animals that received ligatures and were treated with tacrolimus presented less alveolar bone loss ($p < 0.05$) compared with those that received the ligature only. Therefore, in their study, the treatment with tacrolimus resulted in greater PBS. These data corroborate the results of the present research in which TL treatment presented a higher mean PBS than SL treatment in the same period of 10 days, even though there was no statistically

Table 1
Distribution of animals (Wistar rats) according to group 1 or 2; period 10, 15, 30 days; and treatment applied.

Group	Period	Treatment
1	10 days ($n = 3$)	S
		SL
	15 days ($n = 5$)	S
		SL
	30 days ($n = 4$)	S
		SL
2	10 days ($n = 5$)	T
		TL
	15 days ($n = 5$)	T
		TL
	30 days ($n = 4$)	T
		TL

Treatment: S, saline; SL, ligature + saline; T, tacrolimus; TL, ligature + tacrolimus.

Remaining Periodontal Bone Support (PBS) of the different treatments after a period of 10, 15 and 30 days, after induction of periodontal disease

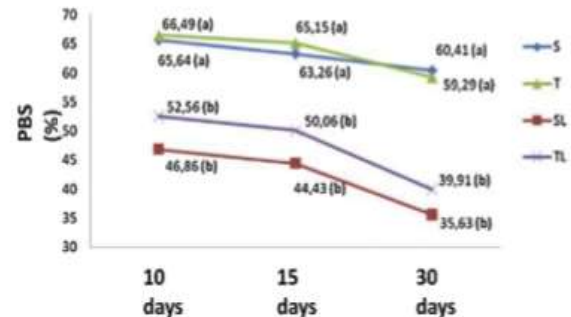


Fig. 4. PBS remaining after 10, 15, and 30 days of treatment (S, SL, T, and TL). Comparisons must be made only between treatments; different letters in parentheses after the measurements signify a statistically significant difference at the same time point in days (ANOVA; Tukey, $p < 0.01$).

significant difference, in contrast to the study by Guimarães et al. (2007).

Moreover, in the present research, for ethical reasons and as a result of the loss of some animals, the final sample was limited to 26 animals compared with 135 animals used in the study of Guimarães et al. (2007). The present study used a confidence interval of 99% ($p < 0.01$) whereas Guimarães et al. (2007), used a 95% confidence interval ($p < 0.05$). From results of our study, we believe that an increase in the sample size and a reduction in the confidence interval would lead to statistically significant differences.

In the study of Guimarães et al. (2007), and in the present research, the animals that did not receive a ligature presented less bone loss and the highest mean PBS (S and T), respectively. This validates the efficacy of the experimental model of induced periodontal disease, which has also been observed in other studies that have used this model (de Azevedo Galvão, Chappier et al., 2003; Nassar et al., 2000; Rêgo et al., 2010).

Guimarães et al. (2007) observed an increase in bone loss over time; that is, for all treatments, the mean bone loss was higher at 15 days than at 10 days. This was also evident in our study, in that a reduction in PBS was observed over time. This may be attributed to the characteristic that the continuous presence of local factors (in this case the ligature) leads to perpetuation of the destructive inflammatory process in periodontal tissue.

The literature mentions that tacrolimus and CsA have a similar mechanism of action, as both exert their suppressive action by inhibiting calcineurin (Scott, McKeage, Keam, & Plosker, 2003; Santos, Gonçalves, Martins, & de Souza, 2009). According to these authors, the difference in the activity of these immunosuppressive agents lies in the different binding proteins: cyclophilin binds to CsA and the $\text{fk-binding protein isoenzyme 120}$ binds to tacrolimus.

Therefore, several studies have compared the effect of CsA and tacrolimus in different in vitro and in vivo situations, with the aim of corroborating our understanding of the behavior of these immunosuppressants, in addition to seeking greater power, ease of application, and lower toxicity as a result of their therapeutic use. In an experimental study, using radiographs, Nassar et al. (2000) evaluated the effect of CsA on alveolar bone loss in rats with induced periodontitis. Their results showed that, in a period of 15 days, the animals that received ligatures and treatment with CsA presented lower alveolar bone loss ($p < 0.05$) compared with those treated only with ligatures. The observations with respect to the radiographic behavior of the CsA immunosuppressors in the study

of Nassar et al. (2000), and of tacrolimus in the present study and that of Guimarães et al. (2007) are similar, since both showed reduction in alveolar bone loss, and consequently higher PBS, in 15 days.

For all the experiments, the variable times and presence/absence of ligatures influenced the results in the present research and in the study of Guimarães et al. (2007). Therefore, in the present study, the mean PBS values for the treatments with ligatures (SL and TL) diminished over time, and were always lower than those of the other treatments (S and T) when compared at the same time point. On the other hand, throughout the experimental period, the mean PBS values for the TL treatment were higher than those for the SL treatment, although there was no statistically significant difference between them at any time point.

The results of Guimarães et al. (2007); for the variables (time and ligature) were similar radiographically to those in the present study, throughout the experiment (at 10, 15, and 30 days). Thus, it was observed that the highest alveolar bone loss always occurred in the treatments with ligatures and that the presence of tacrolimus promoted a significant reduction ($p < 0.05$) of bone resorption at all time points.

Based on the results of the present research and the limitations of the present study (sample reduced to 26), with regard to the hypothesis of a protective effect of tacrolimus against alveolar bone loss in cases of induced periodontitis, no beneficial or aggravating characteristics were observed statistically. On the other hand, the numerical hypothesis suggested by the results of the present study may corroborate the study by Guimarães et al. (2007); who affirmed that tacrolimus produced a protective effect by diminishing alveolar bone loss and granulocyte infiltration in induced periodontitis.

Another aspect investigated in the present study was the probable toxicity arising from prolonged use of tacrolimus, which was also discussed by Garcia, dos Santos, Schott, Trevisan, and Juarez (2004). To investigate the effect of toxicity in the present study, it was initially proposed to perform a histopathological analysis of the main solid visceral organs, and a biochemical analysis of the blood samples, both in a descriptive manner.

From the histopathological point of view, none of the animals in group 1 ($n = 12$) presented pathological or degenerative alterations. On the other hand, in group 2 ($n = 14$), it was observed that 14.28% ($n = 2$) of the animals that received tacrolimus for 30 days presented hepatic alterations, more precisely, cells with microvesicular steatosis, characterized by fatty infiltration in the liver (Fig. 5). According to Oliveira and Laudanna (2000); this hepatic alteration may have various origins, apart from the prolonged use of tacrolimus, among them obesity, diabetes, dyslipidemia and prolonged parenteral nutrition. In order to determine whether microvesicular steatosis is a consequence of the continuous use of

tacrolimus or of possible diabetes, it would be necessary to perform a specific biochemical analysis of these two animals, as initially proposed, to enable the origin of the hepatic alterations (from the action of drugs or systemic) to be defined. Due to methodological problems, the data from the biochemical analyses were considered unreliable, and therefore discarded. This made it impossible to draw a conclusion about the probable cause of the fatty infiltration in the liver. On the other hand, this alteration did not arise in the other animals.

During histological analysis of the animals' kidneys, no sign of nephrotoxicity was observed in either group of animals, in agreement with the results of Jiang et al. (1999), and contradictory to the affirmation of nephrotoxic risk associated with the continuous use of tacrolimus for a period equivalent to that used in the study, 30 days (Garcia et al., 2004).

The other organs of all the animals in groups 1 and 2 where shown to be within a pattern of normality. In view of these observations, a combination of methods is still required to evaluate the effect of tacrolimus on periodontal disease, more precisely, on alveolar bone loss, in order to corroborate studies such as that of Guimarães et al. (2007).

5. Conclusion

Tacrolimus used for up to 30 days as a proposed therapy for periodontitis induced in rats presented no protective or aggravating effects on alveolar bone loss.

Conflict of interest

There is no conflict of interest in this research.

References

- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4, 1–6.
- Cavallini, F. (2006). A influência de dose subantimicrobiana de doxiciclina sobre a perda óssea alveolar e a inserção conjuntiva em periodontite induzida associada à sobrecarga oclusal em ratos. *Dissertation (Master of Periodontology)*. São Paulo: Department of Odontology, University of Tabatubá. 71 p.
- Clemons, G. P., Reynolds, M. A., Agarwal, S., Boughman, J. A., & Suzuki, J. B. (1990). Current concepts in the diagnosis and classification of periodontitis. *Journal of the California Dental Association*, 18(5), 33–38.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolution number 714, 20. June 2002. Available at: http://www.furb.br/site/arquivos/357080-486559/Resolucao%20714_20020202.htm. Accessed 17 June 2009.
- Cortelli, J. R., Lotufo, R. F. M., & Sallum, A. W. (2005). Glossário da sociedade brasileira de periodontia revista periodontia. *Piracicaba*, 15(4), 3–61.
- Cury, P. R., Joly, J. C., de Araújo, V. C., Wassall, T., & de Araújo, N. S. (2003). Periodontite: fator de risco para doenças sistêmicas. *Revista Gaúcha de Odontologia*, 51, 210–214.
- Doku, H. C., Shklar, G., & Bugbee, B. (1966). The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 22, 569–577.
- de Azevedo Galvão, M. P., Chappier, A., Rösing, C. K., Cardoso Ferreira, M. B., & de Souza, M. A. (2003). Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17, 56–62.
- de Azevedo Galvão, M. P., Rösing, C. K., & Cardoso Ferreira, M. B. (2003). Effects of ligature induced periodontitis in pregnant Wistar rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17, 51–55.
- Garcia, S. C., dos Santos, L. I., Schott, L. K., Trevisan, S. B., & Juarez, V. P. (2004). Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40, 393–401.
- Gonçalves, P. T., da Rocha Nogueira Filho, G., Sallum, E. A., Sallum, A. W., & Nociti, F. H. Jr. (2003). Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis – a study in rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17, 46–50.
- Guimarães, M. R., Nassar, P. O., Andia, D. C., Nassar, C. A., Spolidorio, D. M. P., Rossa, C. Jr., et al. (2007). Protective effects of Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, in experimental periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 52, 882–888.
- Irie, K., Tomofuji, T., Tamaki, N., Sanbe, T., Ekuni, D., Azuma, T., et al. (2008). Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *Journal of Dental Research*, 87, 456–460.
- Jiang, H., Sakuma, S., Fujii, Y., Akiyama, Y., Ogawa, T., Tamura, K., et al. (1999). Tacrolimus versus cyclosporin A: A comparative study on rat renal allograft survival. *Transplant International*, 12, 92–99.

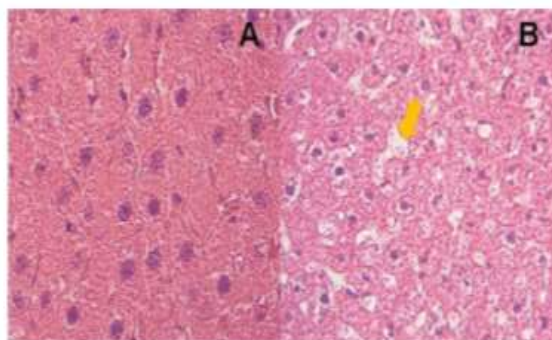


Fig. 5. Histological view of the liver after 30 days with tacrolimus. (A) Normal liver and (B) fatty infiltrate (arrow: cell with microvesicular steatosis).

- Johnson, I. H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10, 332–345.
- Klausen, B., Evans, R. T., & Sîntescu, C. (1989). Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 97, 494–499.
- Koide, M., Suda, S., Saitoh, S., Ofuji, Y., Suzuki, T., Yoshie, H., et al. (1995). In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature–Induced alveolar bone resorption in rats. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 24, 420–434.
- Lascala, N. T., & Moussalli, N. H. (1999). *Compêndio Terapêutico Periodontal*, (3rd) Artes Médica.
- Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N. P. (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (4th ed.) Oxford: Blackwell Munksgaard.
- Lotufo, R. F. M., Kantorski, K., & Zimmermann, G. (2003). Antibióticos de liberação local e controlado em periodontia: minociclina e doxiciclina. *Revista Gaúcha De Odontologia*, 51, 395–397.
- Nassar, C. A., Oehlmeier, P., Abi Rached, R. S. G., Spolidorio, L. C., & Marcantonio, E. Jr. (2000). Avaliação radiográfica do efeito da ciclosporina—A no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. *Revista de Odontologia da UNESP*, 29, 183–193.
- Nassar, C. A., Nassar, P. O., Inagaki, N. S., & Girelli, C. Jr. (2003). Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Revista de Odontologia da UNESP*, 32, 125–130.
- Nassar, C. A., Nassar, P. O., Andia, D. C., Guimarães, M. R., Pepato, M. T., & Spolidorio, L. C. (2007). Biochemical evaluation of glycemic levels of long-term tacrolimus therapy in rats. *Brazilian Oral Research*, 21, 293–297.
- Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. (2006). *Clinical periodontology*, (10th ed.) Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Oliveira, C. P. M. S., & Laudanna, A. A. (2000). Função Hepática I—Metabolismo das bilirrubinas: Esteatose Hepática. *Revista de Hepatologia* Available at: http://www.fugesp.org.br/nutricao_e_saude_conteudo.asp?id_publicacao=2&edicao_numero=4&menu_ordem=1 Accessed 11 August 2012.
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (2000). The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontology*, 14, 9–11.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 336, 1809–1820.
- Quirynen, M., Bollen, C. M. L., Vandekerckhove, B. N. A., Dekeyser, C., Papaioannou, W., & Eysen, H. (1995). Full versus partial mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: Short term clinical and microbiological observations. *Journal of Dental Research*, 174, 1459–1467.
- Rêgo, R. D., de Lima Pompeu, M. M., Moreira, M. M. S. M., Naidu, T. G., & da Silva Pereira, S. L. (2010). Effect of croton zehntneri essential oil (CZEO) on alveolar bone loss in rats with induced periodontitis. Morphometric analysis. *Revista Periodontia*, 20, 69–75.
- Ricardo, L. H., Balducci, J., Vasconcelos, L. M. R., & Carvalho, Y. R. (2006). Periodontal healing after root conditioning using TTC-HCl or citric acid: A histological study in rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 9, 40–47.
- Sanbe, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Azuma, T., Tamaki, N., & Yamamoto, T. (2007). Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats. *Journal of Periodontology*, 78, 2165–2169.
- Santos, R. L., Gonçalves, R. T., Martins, M. A., & de Souza, M. M. G. (2009). Influence of immunosuppressants on bone metabolism and tooth movement: A literature review. *Revista Odonto Ciência*, 24, 86–91.
- Scott, L. J., McKeage, K., Keam, S. J., & Plosker, G. L. (2003). Tacrolimus: A further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*, 63, 1247–1297.
- Silva, P. (2006). *Farmacologia*, (7th ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Yagiela, J. A., Neidle, E. A., & Dowd, J. F. (2000). *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*, (4th ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

ANEXO G - Normas para publicação de artigos na Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial

INFORMAÇÃO PARA OS AUTORES

A Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial é uma revista trimestral, que considerará para publicação trabalhos originais, de investigação, casos clínicos, comunicações curtas e revisões, de interesse científico para clínicos e investigadores relacionados direta ou indiretamente com a saúde oral. Todos os trabalhos serão avaliados por pelo menos dois membros do conselho editorial da revista e/ou revisores externos que condicionarão a sua aceitação para publicação. Autores e revisores serão mantidos no anonimato durante o processo de avaliação dos trabalhos. Apenas serão considerados para publicação os trabalhos contendo material original, que não tenha ainda sido publicado, na íntegra ou parcialmente (incluindo tabelas e figuras), e que não se encontrem submetidos ou aceites para publicação noutras revistas. Antes de enviar os manuscritos, os autores devem obter todas as autorizações necessárias para a publicação do material apresentado. Note-se que, para cumprir os regulamentos que regem os direitos dos autores, a reprodução de imagens, figuras ou gráficos de outras publicações deve ter autorização prévia dos respectivos autores e/ou editores. A localização dos originais deverá ser incluída nas referências bibliográficas. Os artigos publicados passarão a ser propriedade da Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial, não podendo ser reproduzidos, total ou parcialmente, sem a permissão do seu editor-chefe. As opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos autores e poderão não refletir a opinião dos editores e membros do conselho editorial.

Preparação do manuscrito

Os textos deverão ser escritos em português ou em inglês. No caso de serem escritos em inglês, deverá ser submetida, em anexo, uma declaração assinada por um tradutor profissional assumindo a responsabilidade pela qualidade linguística do texto. Esta declaração também poderá ser feita por um dos autores, desde que tenha o inglês como língua nativa.

Submissões Têm que ser realizadas online em <http://www.ees.elsevier.com/spemd> e devem incluir os elementos abaixo indicados:

1. Carta de apresentação

Assinada por todos os autores e dirigida ao editor-chefe da Revista, declarando que o trabalho não se encontra publicado nem submetido para publicação noutra revista ou jornal, nem o será até que a decisão final referente a esta submissão seja tomada. Deverá declarar que todos os autores leram e concordam com a versão submetida, e que, em caso de aceitação para publicação, transferem todos os direitos sobre o artigo a favor da Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial. Deverá também conter indicação do título do artigo e da contribuição de cada um dos autores para o trabalho. De acordo com o “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals”, a autoria implica uma contribuição substancial para o manuscrito. É, portanto, necessário especificar na carta de apresentação a contribuição dada por cada autor do trabalho. Exemplo: João P. António concebeu este estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. Pedro Silva colaborou no protocolo experimental e realizou a análise estatística dados. Nuno Pereira recolheu os dados e colaborou na análise dos mesmos. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão do manuscrito. No caso em que o número de autores exceda os seis deverá justificar-se a situação.

2. Página de capa

Deverá conter apenas o título do trabalho, nome e afiliação de cada autor pela ordem que desejam ver publicado (ex: João P. António¹, Pedro Silva², Nuno Pereira¹ – ¹Faculdade de Medicina Dentária de Lisboa, Lisboa, Portugal; ²Faculdade de Medicina

Dentária do Porto, Porto, Portugal). De-verá conter ainda a identificação completa do autor correspondente com indicação do nome, morada, número de telefone e endereço de e-mail.

3. Título

Título do trabalho, que deverá ser curto (máximo 15 palavras) e definir com clareza o tema abordado. Deverá ser apresentado em português e em inglês.

4. Autores

Os nomes dos autores deverão ser apresentados com a forma e pela ordem que desejam ver publicado (primeiro nome, inicial do nome intermédio, último nome). Deverá ser feita referência ao e-mail e às instituições a que cada autor se encontre associado. Toda a comunicação futura entre a Revista e os autores será efectuada exclusivamente por correio electrónico. Caso indicação expressa em contrário toda a correspondência será enviada para o primeiro autor.

5. Resumo/Abstract: Deverão ser apresentados resumos em português e inglês que não poderão exceder as 250 palavras para o trabalho de investigação e 150 para casos clínicos, revisões ou comunicações breves (em cada língua). Não deverão ser utilizadas abreviaturas. Do resumo dos trabalhos de investigação deverão constar os principais objetivos do trabalho, materiais e métodos seguidos, resultados obtidos e principais conclusões. Cada uma das secções do resumo deverá ser precedida obrigatoriamente pelo respetivo título (Objetivos; Métodos; Resultados; Conclusões). Os resumos das apresentações de casos clínicos deverão sumariar a situação encontrada e o tratamento administrado. Nos resumos de trabalhos de revisão sistemáticas e comunicações curtas deverá ser apresentado o objetivo do trabalho, a metodologia seguida e uma pequena descrição do principal tópico abordado.

6. Palavras-chave/Keywords

Palavras-chave (3 a 10) que permitam a indexação do artigo, de acordo com a terminologia usada no Índice Médico “Medical Subject Headings” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) as quais deverão ser submetidas em português e inglês.

7. Documento com o Corpo do Artigo

7.1 Apresentação: Neste documento não deverá ser incluída qualquer referência à identidade dos autores para que a mesma não seja revelada durante o processo de avaliação. Todo o trabalho, incluindo o corpo do artigo, referências, legendas das figuras e tabelas com legendas, deverá ser formatado com espaçamento duplo, tamanho de letra Arial 12 justificado. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente a partir do número 1. As margens deverão ser de 2,5 cm em todo o documento. Deverão ser inseridas quebras de página entre cada secção.

7.2 Corpo do artigo de acordo com o tipo de trabalho:

a) Artigos de investigação – O texto não deverá exceder as 2250 palavras, excluindo referências, legendas e tabelas. Deverá ser organizado em introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e conclusões.

Introdução – Explicação do problema. Pequeno resumo da literatura considerada relevante. Identificação de falhas e tendências dos estudos disponíveis. No final deste capítulo deverá constar uma clara descrição do objetivo do trabalho e a apresentação da(s) hipótese(s) a testar.

Materiais e métodos – Curto resumo do desenho experimental. Completa descrição dos materiais utilizados (nome comercial, fabricante, cidade, país, lote e validade). Explicação detalhada do que foi e como foi avaliado no presente trabalho, descrevendo as variáveis estudadas, o método utilizado para a constituição da amostra, o tamanho da amostra, o grupo controlo utilizado, o método de calibração dos examinadores e o equipamento utilizado nas medições. Os testes utilizados na análise estatística e o nível de significância estatística fixado deverão ser mencionados no fim desta secção. **Resultados** – Descrição dos resultados de forma clara e concisa, pela mesma ordem em que os testes foram descritos na secção anterior. No texto, nas tabelas e nos gráficos apresentados não deverá haver repetição dos dados. Os resultados que se mostrarem estatisticamente significativos deverão ser acompanhados pelo valor de probabilidade respectivo (p). **Discussão** – Discussão dos

resultados obtidos, relacionando-os com as hipóteses anteriormente apresentadas e com a literatura disponível mais relevante. As limitações do trabalho deverão ser identificadas. Poderão ser sugeridas áreas alvo de futuros estudos. Conclusões – Listar de forma concisa as principais conclusões a retirar do estudo. As conclusões deverão ser condizentes com os objetivos e suportadas pelos resultados.

b) Artigos com casos clínicos – O texto não deverá exceder as 1750 palavras, excluindo referências, legendas e tabelas. Introdução – Realizar uma breve revisão da literatura relevante para o problema encontrado. Incluir referências aos vários métodos de tratamento existentes. Caso clínico – Descrição do paciente (idade, sexo, etc), da patologia encontrada e de possíveis antecedentes médicos ou dentários. Descrição dos diversos métodos de tratamento existentes. O método de tratamento utilizado deverá ser justificado e detalhadamente descrito. Apresentar os resultados do tratamento e o tempo de follow-up. Discussão e Conclusões – Comentários às vantagens e desvantagens apresentada pelo método de tratamento seguido. Apresentar contra-indicações, caso existam. O texto desta secção não deverá ser uma mera repetição das secções anteriores.

c) Artigos de revisão – A Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial publica artigos de revisão que tenham sido solicitados pelos editores. No entanto, em situações excecionais os artigos não solicitados que forem enviados, poderão ser considerados. O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo referências, legendas e tabelas (máximo de 5). Neste tipo de artigos deverá ser apresentado a metodologia seguida e um registo preciso e completo da literatura, organizado por tópicos. O texto deverá ser dividido por secções com títulos e subtítulos que ajudem numa mais simples compreensão do artigo.

d) Comunicações breves – As descrições de novas técnicas poderão conduzir a publicações curtas, devendo ser organizadas com uma pequena introdução seguida da descrição da técnica. O texto não deverá exceder as 1000 palavras, excluindo referências, legendas e tabelas. Estudos piloto com metodologias inovadoras também poderão conduzir a publicações curtas. Neste caso, deverão ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão. As comunicações breves deverão ter um máximo de 15 referências.

7.3 Bibliografia:

As referências bibliográficas no texto, tabelas e legendas terão que ser identificadas por números árabes colocados entre parêntesis e sobrescritos. A numeração deverá corresponder a uma ordenação bibliográfica por ordem de citação no texto. Todas as referências citadas no texto deverão constar da lista de referências. Na lista de referências bibliográficas apenas deverão constar os artigos citados no texto e tabelas. A referência a resumos/ abstracts, a sites da Internet ou a qualquer outro tipo de material não publicado deverá ser evitada. A formatação das referências deverá estar de acordo com as “Normas para a apresentação de manuscritos a publicar em Revistas Biomédicas” do International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) ([http:// www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Os títulos das publicações deverão ser abreviados de acordo com o tratamento dado no Index Medicus (<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>).

Exemplo do formato a seguir na referência a artigos publicados em revistas: Chersoni S, Suppa P, Breschi L, Ferrari M, Tay FR, Pashley DH, et al. Water movement in the hybrid layer after different dentin treatments. *Dent Mater.* 2004;20:796-803. Exemplo do formato a seguir na referência a capítulos de livros: Marshall SJ. Dental amalgam – Structures and properties. In: Anusavice KJ editor. *Phillips' Science of Dental Materials*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. p. 361-85.

7.4 Tabelas: Todas as tabelas deverão ser referidas no texto. Deverão ser apresentadas após a lista de referências bibliográficas, uma por página, e formatadas a 2 espaços. Deverão ser numeradas com algarismos árabes, por ordem de citação no texto, e acompanhadas da respectiva legenda. A tabela deve ser tanto quanto possível explicativa por si só, sem recurso ao texto do artigo.

7.5 Legendas das figuras: As legendas das figuras deverão ser apresentadas na última página do documento com o corpo do artigo. Deverão ser autoexplicativas e estar numeradas com numeração igual à respetiva figura. Quando forem utilizados símbolos, setas, números ou letras para identificar partes de uma figura, estes deverão ser identificados e explicados claramente na legenda. Deverá ser identificada a escala interna e método de coloração nas fotomicrografias.

8. Figuras

Não coloque as figuras no documento com o corpo do artigo. Todas as figuras deverão ser fornecidas em ficheiros independentes com o tamanho 8 cm x 6 cm, no formato em JPEG ou TIFF a 300 dpi. Todas as figuras deverão ser citadas no texto e ser numeradas consecutivamente de acordo com a

ordem de citação. Caso estejam presentes, as letras, números e símbolos, deverão ser claros, proporcionais entre si e de tamanho suficiente para serem legíveis. Se uma figura já tiver sido publicada anteriormente, deverá ser identificada a fonte original e incluída nas referências bibliográficas. Para cumprir os regulamentos que regem os direitos dos autores, a reprodução de imagens, figuras ou gráficos de outras publicações deverá ter autorização prévia dos detentores dos direitos, autor/editor. A referida autorização de-verá ser incluída no processo de submissão. A permissão é exigida independentemente do seu detentor, exceto para documentos de domínio público.

9. Agradecimentos

Deverão ser expressos a pessoas e/ou a Instituições que tenham permitido a efetivação ou prestado contribuição para o trabalho. Nos artigos de investigação deverão constar as fontes de financiamento caso as haja. Os agradecimentos deverão ser submetidos como um ficheiro independente para que a entidade dos autores não seja reveladas durante o processo de avaliação do artigo.

10. Ficheiros anexos

Todo o material para publicação que seja muito extenso, particularmente tabelas ou ferramentas para recuperação de dados, poderá, em certos casos e após consideração, ser colocado na internet para consulta por parte dos interessados sendo designado por material suplementar.

OBRIGAÇÕES DO AUTOR

Responsabilidades éticas Proteção de indivíduos humanos e animais. Quando se descrevem experiências que foram realizadas em seres humanos, terá que ser mencionado que os procedimentos seguidos estão em conformidade com as diretrizes éticas do comité responsável pela investigação humana (institucional ou regional) e em conformidade com a Associação Médica Mundial e a Declaração de Helsínquia, disponível em <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>. Quando são descritas experiências em animais, deve mencionar se as regras de uma instituição ou de um conselho internacional de investigação ou uma lei de regulamentação nacional sobre o cuidado e uso de animais de laboratório foram seguidas.

Confidencialidade.

Os autores são responsáveis por seguir os protocolos estabelecidos pelos respetivos centros de saúde para aceder a dados de episódios clínicos de forma a escrever este tipo de publicação para fins de investigação / divulgação para a comunidade, e portanto, devem declarar que cumpriram esse requisito. O autor é obrigado a garantir que o requerimento para informar todos os pacientes envolvidos no estudo foi cumprido e que está em posse do documento assinado por eles após terem recebido informação suficiente, e após terem obtido o seu consentimento por escrito para participar no estudo. Os autores devem mencionar, em "Métodos" que os procedimentos usados em pacientes e controlos foram realizados depois de obtido o modelo de consentimento assinado.

Privacidade.

O autor também é responsável por assegurar o direito à privacidade dos pacientes protegendo a sua identidade, tanto no texto do artigo bem como nas imagens. Nomes, iniciais ou números de registo médico hospitalar não devem ser usados (ou qualquer outro tipo de dados relevantes para a investigação que possam identificar o paciente) nem no texto ou nas fotografias, a menos que essa informação seja essencial para fins científicos, caso em que deve ser incluído no artigo, desde que o paciente, ou os seus pais ou tutores, tenham dado o consentimento por escrito para a sua publicação. Os autores são responsáveis por obter o consentimento por escrito, autorizando a publicação, reprodução e divulgação em suporte de papel e em áreas de acesso público na internet.

Financiamento

Os autores devem declarar a fonte de toda a ajuda financeira recebida.

Autoria

Apenas aquelas pessoas que contribuíram intelectualmente para o desenvolvimento do trabalho devem aparecer na lista de autores. O tipo de participação no trabalho (algumas das quais são expressas abaixo) por cada autor deve ser indicado na carta de apresentação. Para os que ajudaram na coleta de dados, ou tenham participado em alguma técnica, não são, por si só, critérios suficientes para aparecer como um autor. Em geral, para aparecer como autor devem ser atendidos os seguintes requisitos:

1. Ter participado na conceção e design, aquisição de dados, análise e interpretação dos dados do trabalho que resultou no artigo em questão.
2. Ter participado na redação do manuscrito ou das suas revisões.
3. Ter aprovado a versão que será finalmente publicada.

No caso de autoria coletiva, serão incluídos os nomes dos redatores, ou dos responsáveis pelo trabalho, seguido de “e pelo Grupo...”, quando todos os membros do grupo são considerados como coautores do trabalho. Se for desejado incluir o nome do grupo, embora nem todos os membros possam ser considerados como coautores, a fórmula usada será mencionar os autores responsáveis, seguido por “em nome do grupo.”. Em qualquer caso, os nomes e as instituições dos membros do grupo devem ser incluídos num apêndice no final do manuscrito. Os autores serão indicados tanto na primeira ou na página de título e na secção Adicionar / Editar / Remover / Autor. Todos os autores devem declarar que leram e aprovaram o manuscrito e que os requisitos de autoria foram cumpridos. O Jornal declina qualquer responsabilidade sobre eventuais conflitos decorrentes da autoria de obras publicadas no Jornal.

Conflito de interesses

Existe um conflito de interesses quando um autor tem / teve relações financeiras ou pessoais que possam ser inapropriadamente tendenciosas ou influenciar as suas ações. O potencial conflito de interesses existe independentemente do que as partes interessadas consideram que essas relações possam ou não possam ter influenciado o seu julgamento científico. Os autores devem indicar na Carta de Apresentação e na secção de Informações Adicionais do EES, quaisquer relações financeiras ou pessoais que possam ter tido ou possam ter, no momento da escrita ou publicação do artigo, com pessoas ou instituições, e que possam dar origem a um conflito de interesses no que respeita ao artigo que foi submetido para publicação. O que é declarado aparece no Jornal impresso.

Obtenção de permissões

Os autores são responsáveis pela obtenção de permissões apropriadas para reproduzir parcialmente material (texto, tabelas ou figuras) de outras publicações. Estas permissões devem ser solicitadas a partir do autor, bem como a partir da editora que publicou esse material. A permissão para publicar é requerida a partir da instituição que financiou a pesquisa. O comunicado de que o conteúdo do artigo é original e que não foi publicado anteriormente e que não foi submetido à consideração de qualquer outra publicação, no todo ou em qualquer das suas partes. Os autores devem estar cientes de que não revelar que o material submetido para publicação tenha sido total ou parcialmente publicado é uma violação grave da ética científica. Da mesma forma, autores que reproduzam no seu artigo material previamente publicado (texto, tabelas ou figuras) são responsáveis pela obtenção das permissões apropriadas para reproduzir esse material no Jornal. Os autores devem obter autorizações por escrito do autor, bem como do editor que publicou esse material, e submeter uma cópia delas junto com o artigo para o Jornal.

Revisões e alterações

Sempre que a aceitação do artigo esteja pendente de alterações a efetuar pelos autores, estas deverão ser realizadas no prazo máximo de 15 dias, para pequenas modificações, ou em 60 dias, no caso de grandes alterações. Após a produção gráfica do artigo, a prova final será enviada ao autor correspondente para aprovação. Este deverá responder por email indicando as alterações necessárias, dentro do prazo limite estabelecido pelo conselho editorial para cumprimento dos prazos da revista. Apenas serão admitidas correções de erros de formatação. A não obtenção de resposta dentro do prazo estabelecido será entendida como sinal de concordância com a versão final apresentada.

Lista de verificação dos documentos a submeter

- Carta de apresentação (obrigatório)
- Página de capa (obrigatório)
- Documento com o corpo do artigo (obrigatório)
- Figuras
- Agradecimentos
- Ficheiros anexos
- Declaração do responsável pelo texto em inglês
- Autorização para divulgação de dados e figuras

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial (Portuguese Journal of Stomatology, Dental Medicine and Maxillofacial Surgery) is published quarterly, and considers for publication original research reports, clinical reports, short communications and reviews of scientific interest to clinicians and researchers directly or indirectly related with oral health.

All papers are peer-reviewed by members of the journal's editorial board, determining their acceptance for publication. Both authors and reviewers are anonymous during the evaluation of the work submitted.

Papers considered for publication must contain original material, not published, in full or in part (including tables and figures), and not submitted or accepted for publication in other journals. Before sending the manuscripts, authors must obtain all permissions needed for publication of the presented material. Note that, to comply with regulations governing authors' rights, the reproduction of images, figures or graphs from other publications must have prior authorization of the respective authors. These should be included in the references.

The published articles will remain property of the Portuguese Journal of Stomatology, Dental Medicine and Maxillofacial Surgery, and cannot be reproduced, totally or partially, without permission of the editor-in-chief. The opinions expressed are of the exclusive responsibility of the authors and may not express the opinion of editors and editorial board members.

Manuscript preparation

The text should be written in Portuguese or English. If written in English, a signed declaration, from a professional translator or one of the authors, assuming the responsibility for the quality of the written English, must be submitted in attachment.

Submissions

May only be made online at <http://www.ees.elsevier.com/spemd> and should include the following elements:

1. Presentation letter

Signed by all the authors and addressed to the journal's editorinchief, stating that the paper is not published or submitted to be published in other journal, and that it will not be submitted elsewhere until the final decision on this submission is taken. The presentation letter should also state that all the authors have read and agree with the submitted version and that, in case of acceptance, transfer the copyright of the paper to the journal. The letter should also contain the manuscript title and refer the contribution of each author to the paper submitted.

According to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" the authorship implies a substantial contribution to the manuscript. It is, subsequently, necessary to specify the contribution of each author. e.g.: John Doe conceived this study and supervised all the aspect of its implementation. Peter Doe collaborated in the experimental protocol and performed the statistic analysis of the data. Charles Doe collected the data and collaborated in the analysis of it. All the authors contributed to the interpretation of the results and to the article revision.

A justification must be presented every time the number of authors exceeds six.

2. Cover page

This page should only contain the title, name and affiliation of each author by the order it should be published (ex: João P. António 1, Pedro Silva 2, Nuno Pereira 1 – 1 Faculdade de Medicina Dentária de Lisboa, Lisboa, Portugal; 2 Faculdade de Medicina Dentária do Porto, Porto, Portugal). The identification of the corresponding author must be given stating name, address, phone number and e-mail.

3. Title

The title of the manuscript should be short (maximum 15 words) and clearly define the subject in question. Should be presented in Portuguese and in English.

4. Authors

Authors should be presented the same way and in the order they will be published (first name middle name, surname). The email and affiliations of each author should be given. Every type of correspondence between the journal and the authors will be made, exclusively, by e-mail. Unless otherwise clearly expressed, all correspondence will be sent to the first author.

5. Abstract

Abstracts in English and Portuguese should be submitted with a limit of 250 words for research manuscripts and with a limit of 150 words for clinical cases, reviews or brief communications. Abbreviations should not be used. The abstracts of original research reports should contain the main objectives, materials and methods, results and main conclusions. An appropriate heading must precede each section, namely: Objectives; Methods; Results; Conclusions. The abstracts of clinical cases should summarize the problem and the treatment offered. The abstract of systematic reviews and brief communications should present the objective, methods and a brief description of the main topic discussed.

6. Keywords

Keywords (3-10), to allow indexing of the article according to the terminology used in the Medical Index "Medical Subject Headings (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>), should be submitted in Portuguese and English.

7. Document with the manuscript

7.1 Presentation:

This document should not have any reference to the author's identity in order to avoid their identification during the reviewing process. All work, including the body of the article, references, figure captions and tables with captions should be formatted double-spaced, Arial font size 12 and left justified. All pages should be numbered, starting at number 1. Margins should be 2.5 cm throughout the document. A page break must be included between each section.

7.2 Body of the article according to the type of work:

a) Research articles – The text should not exceed 2250 words excluding references, legends, and tables. Should be organized into introduction, materials and methods, results, discussion and conclusions. Each section should be organized as follows:

Introduction – Explanation of the problem. Short summary of the relevant literature. Identification of shortcomings and trends in the available studies. Clear description of the paper's purpose at the end, stating the working hypothesis.

Materials and methods – Short summary of the experimental design. Complete description of the materials used (name, manufacturer, lot number and expiration date). Detailed explanation of what was assessed in the work and how it was performed, describing the variables studied, the method for recruiting the sample, sample size, control group used, examiners' calibration method and equipment used in the measurements. The tests used in statistical analysis and statistical significance level set should be mentioned at the end of this section.

Results – Clear and concise description of the results, in the order in which the tests were described in the previous section. Between text, tables and graphs presented there should be no repetition of data. Statistical significant results should be accompanied by their probability value

Discussion – Discussion of the results, relating them to the hypotheses previously presented and with the most relevant literature available. The limitations of the work should be identified. Target areas for future studies maybe suggested. Conclusions – List concisely the main conclusions to be drawn from the study. The conclusions should be consistent with the objectives and supported by the results.

b) Clinical cases -The text should not exceed 1750 words excluding references, legends, and tables. Introduction – Conduct a brief review of the literature relevant to the problem in question. Include references to the various methods of treatment available. Case report – description of the patient (age, gender, etc.), pathology encountered and possible medical or dental history. Brief description of the different treatment methods available. The method of treatment used should be justified and fully described. Results of treatment and length of follow-up should be presented. Discussion and Conclusions – Remarks on the advantages and disadvantages presented by the method of treatment followed. Present contraindications, if any. If the text is a mere repetition of the previous sections, the Discussion and Conclusions should be omitted.

c) Review article – The Portuguese Journal of Stomatology, Dentistry and Maxillofacial Surgery publishes mainly review articles that have been requested by the editors. However, exceptionally articles that are sent unsolicited may be considered. The text should not exceed 5000 words excluding references, captions and tables (maximum 5). In this type of articles the literature research methodology and a complete and accurate record of literature, organized by topics, should be presented. The text should be divided into sections with headings and subheadings that help a simpler comprehension of the article. d) Brief Communications – Description of new techniques may lead to short publications. These should be presented with a short introduction followed by the description of the technique. The text should not exceed 1000 words, excluding references, captions and tables. Preliminary results and pilot studies may lead to short publications. In this case, they should be organized into introduction, methods, results and discussion. Brief communications should have a maximum of 15 references.

7.3 Bibliography:

References in the text, tables and captions have to be identified by Arabic numerals placed in parentheses and superscript. The numbering should correspond to the order of citation in the text. All references cited in the text and tables should appear on the list of references. Reference to abstracts, Internet sites or any other unpublished material should be avoided. The references should be according to the “Standards for the submission of manuscripts to be published in biomedical journals” of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). The journal titles should be abbreviated according to the treatment given in Index Medicus (<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>).

Example of the format to follow in references to articles published in journals: Chersoni S, Suppa P, Breschi L, Ferrari M, Tay FR, Pashley DH, et al. Water movement in the hybrid layer after different dentin treatments. *Dent Mater*. 2004;20:796-803.

Example of the format to follow in references to chapters in books: Marshall SJ. Dental amalgam – Structures and properties. In: Anusavice KJ editor. *Phillips’ Science of Dental Materials*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. p. 361-85.

7.4 Tables:

All tables must be mentioned in the text. Tables should be formatted at 2 spaces on a separate sheet, numbered with Arabic numerals and accompanied by a title and subtitle. Each table in the manuscript should stand-alone and be interpreted without referencing the text of the manuscript.

7.5 Figure captions: Captions should be self-explanatory and be numbered with numbers equal to the accompanying technical illustration. When using symbols, arrows, numbers or letters to label parts of a figure, they should be clearly identified and explained in the caption. The internal scale and method of staining in photomicrographs should be identified.

8. Figures

Do not place the figures in the manuscript within the body of the article. All figures should be provided in separate files **with size 8 • 6 cm in JPEG or TIFF format at 300 dpi.**

All figures should be cited in the text and numbered in the respective order. In presence of letters, numbers and symbols, the size and proportion should be clear enough in order to be legible.

If a figure has been published previously, the original source must be identified and included in the list of references. To comply with authors’ rights regulations, **the reproduction of pictures, figures or graphics from other publications must have prior authorization from the copyright holders, author/editor.** The signed authorization should be upload in the submission process. Permission is required independently of the ownership, except for public documents.

9. Acknowledgements:

Only persons and/or institutions that have allowed the execution or provided input to the work should be acknowledge. In research papers funding sources if any should be included. **Acknowledgment should be submitted in a separate file, so the identity of the authors is not revealed to the reviewers.**

10. Appendices

All the materials that are too large, like tables or tools for data recovery, in certain cases and after consideration, can be placed at the Journal's site for consultation, being referred to as **additional material**.

OBLIGATIONS OF THE AUTHOR

Ethical responsibilities

Protection of human subjects and animals. When describing experiments that have been carried out on human beings, it must be mentioned that the procedures followed are in accordance with the ethical guidelines of the committee responsible for human research (institutional or regional) and in accordance with the World Medical Association and the Helsinki Declaration, available at: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>. When experiments on animals are described, it must mention whether the rules of an institution or an international research council or a national regulatory law on the care and use of laboratory animals have been followed.

Confidentiality. The authors are responsible for following the protocols established by their respective health centres to access data from medical records in order to write this type of publication for research / disclosure purposes for the community, and thus must declare that they have complied with this requirement. The author is obliged to ensure that the requirement of having informed all the patients enrolled in the study has been met and is in possession of the document signed by them after they have received sufficient information, and having obtained their written informed consent to participate in the study. The authors must mention, in the "Methods" that the procedures used in patients and controls were performed after having obtained the signed informed consent form.

Privacy. The author is also responsible for ensuring the right of privacy of the patients by protecting their identity, both in the text of the article as well as in the images. No names, initials or hospital medical record numbers will be used (or any other type of data irrelevant to the investigation that could identify the patient) either in the text or in the photographs, unless this information is essential for scientific purposes, in which case it may be included in the article, provided that the patient, or their parent or guardian, gave their informed consent in writing for its publication. The authors are responsible for obtaining the informed consent in writing, authorising their publication, reproduction and circulation on paper support and on public access Internet.

Funding

The authors must declare the source of any financial help received.

Authorship

Only those persons who have intellectually contributed to the development of the work should appear in the list of authors. The type of participation in the work (some of which are expressed below) by each author must be stated in the Cover Letter. To have helped in the collection of data, or to have taken part in some technique, are not by themselves sufficient criteria to appear as an author. In general, to appear as an author the following requirements should be met:

1. To have participated in the conception and design, data acquisition, analysis and interpretation of the data of the work that has resulted in the article in question.
2. To have participated in the drafting of the manuscript or its revisions.
3. To have approved the version that will finally be published.

In the case of collective authorship, it will include the name of the writers, or those responsible for the work, followed by "and the Group...", when all the members of the group are considered as co-authors of the work. If it is desired to include the name of the group, although not all members may be considered as co-authors, the formula used will be to mention the authors responsible, followed by "on behalf of the Group.". In any event, the names and the institutions of the members of the group should be included in an Appendix at the end of the manuscript. The authors will be stated both on the first or title page and in the Add/ Edit/Remove/Author section. All authors must declare that they have read and approved the manuscript and that the requirements for authorship have been met. The Journal declines any responsibility on possible conflicts arising from the authorship of works published in the Journal.

Conflict of interests

There is a conflict of interests when an author has/had financial or personal relationships that could have inappropriately biased or influenced their actions. The potential conflict of interests exists regardless of whether the interested parties consider that these relationships may or may not have influenced their scientific judgement. The authors must state, in the Cover Letter and in the Additional Information section of the EES, any financial or personal relationships that they may have had or may have, at the time of writing or submitting the article, with persons or institutions, and that could give rise to a conflict of interests as regards the article which is submitted for publication. What is declared will appear in the printed Journal.

Obtaining of permissions

The authors are responsible for obtaining the appropriate permissions to partially reproduce material (text, Tables or Figures) of other publications. These permissions must be requested from the author, as well as from the publisher that has published that material. Permission to publish is required from the institution that has financed the research.

A statement that the content of the article is original and has not been published previously and has not been submitted for consideration to any other publication, either wholly or in any of its parts. The authors must be aware that not to reveal that the material submitted for publication has been wholly or partially published is a severe breach of scientific ethics. Similarly, authors who reproduce previously published material in their article (text, Tables or Figures) are responsible for obtaining the appropriate permissions to reproduce that material in the Journal. The authors must have obtained written authorisation from the author, as well as from the publisher that has published this material, and submit a copy of them along with the article to the Journal.

Redundant or duplicate publication

The Journal does not accept previously published material and will not consider any manuscripts for publication that are simultaneously submitted to other journals, or redundant or duplicate publications, that is, articles that substantially overlap another article already published, printed, or in electronic media. In the Cover Letter, the authors must mention any previous submissions or publications of the same work, either wholly or partially, that could be considered a redundant or duplicate publication. It is necessary to quote and include the literature references of these previous publications in the new manuscript. These restrictions do not apply to published abstracts of papers, presentations, or conferences, presented at national or international scientific meetings.

Revisions and adjustments

Whenever the article acceptance is waiting for authors' adjustments, the revisions should be done by authors within 15 days for minor changes or 60 days for major changes. After article' graphical production, final proof will be sent to the correspondent author for approval. The necessary adjustments should be communicated by email within the scheduled deadline, established by the editorial council for the journal timeline compliance. Failing to respond within the scheduled deadline will be understood as acceptance of the final presented version.

Checklist of the documents to submit

- **Cover letter (mandatory)**
- **Title page (mandatory)**
- **Document with the manuscript (mandatory)**
- **Figures**
- **Acknowledgements**
- **Supplementary files**
- **Signed declaration from the entity/author responsible for the English language**
- **Authorization from the copyright holders, author/ editor of the pictures, figures or graphics from other publications used in the submitted manuscript**

ANEXO H - Normas para publicação de artigos na Internacional Journal of Paediatric Dentistry



International Journal of Paediatric Dentistry

© BSPD, IAPD and John Wiley & Sons A/S



Edited By: Chris Deery

Impact Factor: 1.532

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 41/90 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 69/121 (Pediatrics)

Online ISSN: 1365-263X

Author Guidelines

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

Relevant Documents: Sample Manuscript

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in International Journal of Paediatric Dentistry](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#).

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

1. GENERAL

International Journal of Paediatric Dentistry publishes papers on all aspects of paediatric dentistry including: growth and development, behaviour management, prevention, restorative treatment and issue relating to medically compromised children or those with disabilities. This peer-reviewed journal features scientific articles, reviews, clinical techniques, brief clinical reports, short communications and abstracts of current paediatric dental research. Analytical studies with a scientific novelty value are preferred to descriptive studies.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after acceptance of a manuscript for publication in International Journal of Paediatric Dentistry. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures. In June 2007, the Editors gave a presentation on How to write a successful paper for the International Journal of Paediatric Dentistry.

2. ETHICAL GUIDELINES

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with the Ethical Policies of the Journal and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

3. CONFLICT OF INTEREST AND SOURCE FUNDING

Journal of Oral Rehabilitation requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at IJPDedoffice@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

4. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Articles for the International Journal of Paediatric Dentistry should be submitted electronically via an online submission site. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support is available by phone (+1 434 817 2040 ext. 167) or here. If you cannot submit online, please contact Daricel Borja in the Editorial Office by e-mail IJPDedoffice@wiley.com.

4.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd> *Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'. *If you are registering as a new user. - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important. - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.' - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'. *If you are already registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password. *Log-in and select 'Author Center'.

4.2. Submitting Your Manuscript

After you have logged into your 'Author Center', submit your manuscript by clicking on the submission link under 'Author Resources'. * Enter data and answer questions as appropriate. * You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter. Please note that a separate Title Page must be submitted as part of the submission process as 'Title Page' and should contain the following: • Word count (excluding tables) • Authors' names, professional and academic qualifications, positions and places of work. They must all have actively contributed to the overall design and execution of the study/paper and should be listed in order of importance of their contribution • Corresponding author address, and telephone and fax numbers and email address

*Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen. *You are required to upload your files. - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button. - When you have

selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button. * Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

4.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) is now accepted by IPD. As such manuscripts can be submitted in both .doc and .docx file types.

4.4. Review Process

The review process is entirely electronic-based and therefore facilitates faster reviewing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by experts in the field (generally two reviewers), and the Editor-in-Chief makes a final decision. The International Journal of Paediatric Dentistry aims to forward reviewers' comments and to inform the corresponding author of the result of the review process. Manuscripts will be considered for 'fast-track publication' under special circumstances after consultation with the Editor-in-Chief.

4.5. Suggest a Reviewer

International Journal of Paediatric Dentistry attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript and their area of expertise. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

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

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

4.7. E-mail Confirmation of Submission

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

4.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

4.9. Submission of Revised Manuscripts

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. All revisions must be accompanied by a cover letter to the editor. The letter must a) detail on a point-by-point basis the author's response to each of the referee's comments, and b) a revised manuscript highlighting exactly what has been changed in the manuscript after revision.

4.10 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's

institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article.

They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

5. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: Divided into: [Summary](#), [Introduction](#), [Material and methods](#), [Results](#), [Discussion](#), [Bullet points](#), [Acknowledgements](#), [References](#), [Figure legends](#), [Tables and Figures arranged in this order](#). The summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions and should be less than 200 words. A brief description, in bullet form, should be included at the end of the paper and should describe Why this paper is important to paediatric dentists.

Review Articles: may be invited by the Editor.

Short Communications: should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

Clinical Techniques: This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges.

Brief Clinical Reports/Case Reports: Short papers not exceeding 800 words, including a maximum of three illustrations and five references may be accepted for publication if they serve to promote communication between clinicians and researchers. If the paper describes a genetic disorder, the OMIM unique six-digit number should be provided for online cross reference (Online Mendelian Inheritance in Man).

A paper submitted as a Brief Clinical/Case Report should include the following: □ a short Introduction (avoid lengthy reviews of literature); □ the Case report itself (a brief description of the patient/s, presenting condition, any special investigations and outcomes); □ a Discussion which should highlight specific aspects of the case(s), explain/interpret the main findings and provide a scientific appraisal of any previously reported work in the field. □ Please provide up to 3 bullet points for your manuscript under the heading: 1. Why this clinical report is important to paediatric dentists. Bullet points should be added to the end of your manuscript, before the references. Letters to the Editor: Should be sent directly to the editor for consideration in the journal.

6. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

6.1. Format

Language:

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

6.2. Structure

The whole manuscript should be double-spaced, paginated, and submitted in correct English. The beginning of each paragraph should be properly marked with an indent.

Original Articles (Research Articles): should normally be divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order.

Please include a statement of author contributions, e.g. Author contributions: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data; and A.S. and K.J. led the writing.

Summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions.

Introduction should be brief and end with a statement of the aim of the study or hypotheses tested. Describe and cite only the most relevant earlier studies. Avoid presentation of an extensive review of the field.

Material and methods should be clearly described and provide enough detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary repeated. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Use this order also in the results section. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully.

(i) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(ii) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consortstatement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. International Journal of Paediatric Dentistry encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(iii) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

Results should clearly and concisely report the findings, and division using subheadings is encouraged.

Double documentation of data in text, tables or figures is not acceptable. Tables and figures should not include data that can be given in the text in one or two sentences.

Discussion section presents the interpretation of the findings. This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Avoid repetition of results, do not use subheadings or reference to tables in the results section.

Bullet Points should include one heading: *Why this paper is important to paediatric dentists. Please provide maximum 3 bullets per heading.

Review Articles: may be invited by the Editor. Review articles for the International Journal of Paediatric Dentistry should include: a) description of search strategy of relevant literature (search terms and databases), b) inclusion criteria (language, type of studies i.e. randomized controlled trial or other, duration of studies and chosen endpoints, c) evaluation of papers and level of evidence. For

examples see: Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2003; 61: 347-355. Paulsson L, Bondemark L, Söderfeldt B. A systematic review of the consequences of premature birth on palatal morphology, dental occlusion, tooth-crown dimensions, and tooth maturity and eruption. *Angle Orthodontist* 2004; 74: 269-279.

Clinical Techniques: This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to highest scientific and clinical practice standards.

Short Communications: Brief scientific articles or short case reports may be submitted, which should be no longer than three pages of double spaced text, and include a maximum of three illustrations. They should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Supplementary data Supporting material that is too lengthy for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher as online-only content, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include the study protocols, more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures (including). All material to be considered as supplementary data must be uploaded as such with the manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. Please indicate clearly the material intended as Supplementary Data upon submission. Also ensure that the Supplementary Data is referred to in the main manuscript. Please label these supplementary figures/tables as S1, S2, S3, etc.

Full details on how to submit supporting information, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

6.3. References

A maximum of 30 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). They should be identified in the text by superscripted Arabic numbers and listed at the end of the paper in numerical order. Identify references in text, tables and legends. Check and ensure that all listed references are cited in the text. Non-refereed material and, if possible, non-English publications should be avoided. Congress abstracts, unaccepted papers, unpublished observations, and personal communications may not be placed in the reference list. References to unpublished findings and to personal communication (provided that explicit consent has been given by the sources) may be inserted in parenthesis in the text. Journal and book references should be set out as in the following examples:

1. Kronfol NM. Perspectives on the health care system of the United Arab Emirates. *East Mediter Health J*. 1999; 5: 149-167.
2. Ministry of Health, Department of Planning. Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001.
3. Al-Mughery AS, Attwood D, Blinkhorn A. Dental health of 5-year-old children in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 308-309.
4. Al-Hosani E, Rugg-Gunn A. Combination of low parental educational attainment and high parental income related to high caries experience in preschool children in Abu Dhabi. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 31-36.

If more than 6 authors please, cite the three first and then et al. When citing a web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parenthesis). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add (in press). Please ensure that all journal titles are given in abbreviated form.

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

6.4. Illustrations and Tables

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines

Figures and illustrations: All figures should be submitted electronically with the manuscript via ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Each figure should have a legend and all legends should be typed together on a separate sheet and numbered accordingly with Arabic numerals. Avoid 3-D bar charts.

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

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

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

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

7. AFTER ACCEPTANCE

7.1. Copyright

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

CTA Terms and Conditions http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

7.2. Permissions

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

7.3. NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#).