

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA REGIÃO -174 G/C DO GENE
IL-6 E A CONDIÇÃO PERIODONTAL EM DIABÉTICOS TIPO 1**

MARÍLIA LINS E SILVA

Recife – PE

2014

MARÍLIA LINS E SILVA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA REGIÃO -174 G/C DO GENE
IL-6 E A CONDIÇÃO PERIODONTAL EM DIABÉTICOS TIPO 1**

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

Orientadora: Prof. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

Recife –PE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Marília Lins e.
Associação entre o polimorfismo na região -174 G/C do gene IL-6 e a
condição periodontal em diabéticos tipo 1 / Marília Lins e Silva. – Recife:
O Autor, 2014.
44 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Polimorfismo genético. 2. Interleucina-6. 3. Doenças periodontais.
4. Diabetes mellitus tipo 1. I. Silveira, Renata Cimões Jovino
(Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2014-187)

TÍTULO DO TRABALHO: ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NA
REGIÃO -174 G/C DO GENE IL-6 E A CONDIÇÃO PERIODONTAL EM
DIABÉTICOS TIPO 1

NOME DA ALUNA: MARÍLIA LINS E SILVA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/02/2014.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. (a) RENATA CIMÕES JOVINO SILVEIRA_____

Prof. (a) Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS_____

Prof. (a) Dr. ALEXANDRE BATISTA LOPES DO NASCIMENTO_____

Recife –PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra A. T. Carvalho

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof. Dr. Anderson S. Leônidas Gomes

Prof. Dra. Simone Guimaraes F. Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

MEMBROS COLABORADORES

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da

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

Silva

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de S. Beatrice

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

SECRETÁRIA

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Oziclere Sena de Araújo

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Aos meus pais, irmã e amigos que sempre me incentivaram a acreditar nos meus sonhos, e aos futuros aprendizes na expectativa dos sonhos que os mesmos também terão, dedico com carinho este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteou com o dom da vida e me deu força e determinação para seguir em frente nessa busca incessante pelo saber.

Aos meus pais, por apoiarem as minhas decisões e me ensinarem os verdadeiros valores da vida, sendo exemplos de dignidade, honestidade e perseverança. É uma arte amar vocês, e será sempre o meu melhor texto, a minha melhor sintonia porque vocês são e sempre serão o meu maior amor.

À minha irmã, minha inspiração profissional. Obrigada pelo incentivo, pela amizade e pelo carinho. Tenho muito orgulho de você.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao programa de pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro, pela oportunidade e honra de fazer parte de seu corpo discente.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira, pela idealização deste trabalho e pela confiança em mim depositada. Obrigada por ter me aceito como sua aluna.

Ao Prof. Dr. Tibério César Uchôa Matheus, obrigada pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, por ter, gentilmente, cedido o seu laboratório, me apoiando e acreditando na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos de forma tão simples e humilde. Para mim, foi um privilégio conviver com a equipe do Genoma.

Aos professores da pós-graduação em Odontologia da UFPE, pelas experiências e ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos serviços de Endocrinologia do Hospital das Clínicas HC-UFPE, Hospital Agamenon Magalhães e Hospital Barão de Lucena, pelo acolhimento.

À Joana Paula Maia, por todo o apoio durante o desenvolvimento da pesquisa, e pela amizade e carinho tão sinceros.

Aos meus queridos companheiros de turma, obrigada pelos muitos momentos de estudo e diversão compartilhados durante o período que passamos juntos. Às minhas amigas Camila Cravo e Camila Nunes que nestes dois anos foram a minha segunda família, meus

agradecimentos especiais! Saber que vocês existiam, me fazia ter certeza, que não importava o que acontecesse, eu nunca estaria sozinha! Vocês fazem parte dessa conquista!

Aos doutorandos que fazem parte do grupo de pesquisa, muito obrigada por dividir comigo a experiência de vocês. Agradeço especialmente à Rodrigo Alves, pela amizade e por estar sempre disposto a me ouvir e me ajudar em qualquer momento.

Aos meus grandes amigos, Andréa Francisca, Bruno Marques, Karla Ximenes, Leila Batista, Marcelo Ataíde, Mávio Bispo, Rodrigo de Muta e Theresa Mônica, por serem os melhores amigos que eu poderia ter. Com vocês, o abraço vai ser sempre apertado, e o olhar e as palavras vão ser sempre verdadeiros, mesmo que não nos encontremos mais com tanta frequência. Não há felicidade maior do que saber que vocês existem e fazem parte da minha vida!

A todos os pacientes que espontaneamente aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela disponibilidade.

Aos meus professores da graduação da Universidade de Pernambuco (FOP/UPE), lembro com muito carinho de todos vocês. Obrigada por me ensinarem através da palavra e do exemplo que a busca pelo conhecimento deve ser contínua.

As palavras para expressar minha gratidão a todos vocês são muitas, porém deixo apenas o meu sincero e singelo MUITO OBRIGADA!

.

*"Quem vê a flor geralmente não imagina
a paciência tecelã que é necessária para
que a ideia da semente seja dita."*

(Ana Jácomo)

RESUMO

Buscou-se detectar a presença de polimorfismos genéticos da IL-6 (-174) em pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 1 e associar à sua condição periodontal. Para tanto, vinte e nove pacientes de ambos os sexos e idade maior que dezoito anos com diagnóstico de diabetes tipo 1 participaram do estudo. Sangramento gengival (SG), sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) foram avaliados clinicamente. Foram coletadas células da descamação da mucosa jugal para análise do polimorfismo da IL-6 (-174) através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de $NIC \geq 4mm$ e $PS \geq 4mm$, SS e SG, em relação ao genótipo. Concluiu-se que o polimorfismo da IL-6 (-174) parece não influenciar a condição periodontal de diabéticos tipo 1.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Interleucina-6. Doenças periodontais. Diabetes mellitus tipo 1.

ABSTRACT

We attempted to assess the presence of genetic polymorphisms of IL-6 (-174) in patients with type 1 diabetes and associate it with their periodontal condition. For both, twenty-nine patients of both genders and over eighteen years of age, diagnosed with type 1 diabetes participated in the study. Gingival bleeding (GB), bleeding on probing (BOP), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) were clinically assessed. Cell desquamation of oral mucosa for analysis of polymorphism of IL-6 (-174) by polymerase chain reaction (PCR) were collected. There was no statistically significant difference between the percentage of $CAL \geq 4$ mm and $PD \geq 4$ mm, BOP and GB, in relation to the genotype. Reached the conclusion that IL-6 polymorphism (-174) does not seem to influence the periodontal condition of type 1 diabetic.

Keywords: Genetic polymorphism. Interleukin-6. Periodontal diseases. Diabetes mellitus type 1.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Características da amostra dos pacientes com diabetes mellitus Tipo 1	29
Tabela 02 - Frequências Genotípicas e alélicas dos polimorfismos da IL-6 na posição -174 em pacientes com diagnósticos de diabetes mellitus tipo 1	29
Tabela 03 - Associações não ajustadas entre percentuais de sítios com $\text{NIC} \geq 4\text{mm}$ e $\text{PS} \geq 4\text{mm}$ e as variáveis explicativas	29
Tabela 04 - Associações não ajustadas entre percentuais de sítios com sangramento gengival (SG) e Sangramento à Sondagem (SS) e as variáveis explicativas	29

LISTA DE ABREVIACÕES

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Doença periodontal

HbA1c – Hemoglobina glicada

IL-6 – Interleucina 6

NIC – Nível de inserção clínica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PS – Profundidade de sondagem

SG – Sangramento gengival

SS – Sangramento à sondagem

SNP – Polimorfismo de base única

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TNF β – Fator de necrose tumoral β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. METODOLOGIA.....	17
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25
APÊNDICES	29
Apêndice A - Tabelas	29
Apêndice B - Prontuário clínico	30
Apêndice C - Termo de consentimento livre e esclarecido	34
ANEXOS	36
Anexo A - Parecer do comitê de ética	36
Anexo B - Normas da revista	39

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é considerada um distúrbio inflamatório iniciado pela presença de bactérias gram-negativas que resulta na destruição tecidual do periodonto (Kinane & Hart, 2003; Shapira, Wilensky, & Kinane, 2005). Embora grupos específicos de anaeróbios gram-negativos no biofilme dental sejam reconhecidos como seus principais agentes etiológicos, estima-se que a maior parte do dano tecidual observado seja causada de maneira indireta pela resposta do hospedeiro ante à infecção, e não pela agressão direta do agente infeccioso (Van dyke, Lester, & Shapira, 1993).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é considerado uma doença autoimune órgão-específica que resulta da destruição seletiva das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, pela infiltração progressiva de células inflamatórias, particularmente por linfócitos T auto reativos. As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células beta tenham sido destruídas (Liu & Eisenbarth, 2002).

A premissa para a inter-relação entre DP e diabetes mellitus (DM) é a presença de citocinas pró-inflamatórias, bactérias e toxinas na DP que são liberadas localmente no tecido periodontal e adentram na circulação sistêmica, influenciando tecidos e órgãos à distância. Ao mesmo tempo, as citocinas pró-inflamatórias sistemicamente envolvidas no DM infiltram-se nos tecidos periodontais e agravam a condição periodontal, resultando numa relação bidirecional (Taylor, 2001; Xiao et al., 2009).

Embora a periodontite seja uma doença multifatorial e fatores ambientais e microbianos possam iniciar e modificar a progressão da doença, resultados de vários estudos sugerem que a gravidade e progressão da DP possam estar associadas com polimorfismos do gene das citocinas (Takashiba & Naruishi, 2006; Yoshie, Kobayashi, Tai, & Galicia, 2007). Estas desempenham um papel fundamental na resposta imune e podem conduzir a uma imunidade protetora ou a destruição de tecidos pela produção de seus diferentes níveis (Gemmell & Seymour, 2004).

Traços geneticamente transmissíveis, como polimorfismos genéticos, podem acentuar a resposta do hospedeiro frente a um desafio bacteriano e são responsáveis pela variação da susceptibilidade individual à periodontite (Michalowicz et al., 2000; Yoshie, Kobayashi, Tai, & Galicia, 2007). Indivíduos que apresentam aspectos clínicos semelhantes podem responder de forma diferente para a mesma terapia periodontal, evidenciando a importância dos fatores

do hospedeiro na patogênese das DP. A resposta do hospedeiro envolve complexa interação entre as células, matriz extracelular e citocinas circulantes (Irwin & Myrillas, 1998).

A presença da DP pode resultar em um aumento sistêmico dos níveis de citocinas inflamatórias tais como: TNF- α , TNF- β , interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa e fibrinogênio. Pacientes diabéticos apresentam altos níveis destes marcadores inflamatórios no sangue, os quais estão relacionados à resistência à insulina. Desta forma, a presença da DP resulta em elevação dos níveis sanguíneos destes marcadores, o que induz resistência à insulina, prejudicando o controle glicêmico (Mealey & Oates, 2006; Page, 1998).

A IL-6 é um dos mediadores mais importantes da resposta inflamatória na qual pode desempenhar um papel pro-inflamatório ou anti-inflamatório (Seruga, Zhang, Bernstein, & Tannock, 2008; Woods, Brull, Humphries, & Montgomery, 2000), tendo funções diversas, inclusive diferenciação e ativação de macrófagos e células T, e crescimento e diferenciação terminal de células B. Esta citocina multifuncional apresenta papel importante na resposta imune, na hematopoiese e no metabolismo ósseo (Gemmell, Marshall, & Seymour, 1997). É um mediador principal na resposta do hospedeiro a dano e infecção: níveis altos de IL-6 foram observados em pacientes com infecções, trauma, doenças inflamatórias crônicas e neoplasia (Hirano, Akira, Taga, & Kishimoto, 1990). Além disso, é fortemente relacionada com remodelação e reabsorção óssea, além de degradação de colágeno (Roodman et al., 1992; Naruishi et al., 2001; Omori, Naruishi, Nishimura, Yamada-Naruishi, & Takashiba, 2004), e tem se mostrado fundamental na resposta inflamatória a agentes infecciosos (especialmente bactérias gram-negativas) (Franch-Chillida, Nibali, Madden, Donos, & Brett, 2010).

Os polimorfismos que mais foram estudados nos últimos anos foram os polimorfismos de base única (SNPs) -174(G/C), -572(G/C), -1363(G/T), -6106(A/T) e -1480(C/G), e suas combinações (haplótipos) (Kalburgi, Bathia, Bilichodmath, Patil, Mangalekar, & Bath, 2010). Os resultados de alguns estudos apoiam a hipótese de uma possível associação entre polimorfismos de IL-6, em especial na posição -174 (G/C), e a DP, gerando uma resposta inflamatória mais pronunciada em indianos, caucasianos e brasileiros (Franch-Chillida, Nibali, Madden, Donos, & Brett, 2010; Tervonen, Raunio, Knuuttila, & Karttunen, 2007; Kalburgi, Bathia, Bilichodmath, Patil, Mangalekar, & Bath, 2010; Trevilatto, Scarel-Caminaga, de Brito, de Souza, & Line, 2003). Outros estudos mostraram existir associação entre as variantes genéticas de IL-6 e a detecção subgingival de bactérias periodontopatogênicas na periodontite (Nibali et al., 2008) e em indivíduos periodontalmente saudáveis (Nibali et al., 2010), podendo o polimorfismo atuar como fator de risco para periodontite (Galícia et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo detectar a presença do SNP -174 no gene da IL-6 (-174) em pacientes com diagnóstico de DM tipo 1 e associar à sua condição periodontal.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo do tipo série de casos, entre os meses de março e outubro de 2013, na clínica odontológica da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizada na cidade do Recife, estado de Pernambuco, situada na região nordeste do Brasil. Um total de 29 pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico de DM1, provenientes dos serviços de endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães, Hospital Barão de Lucena e Hospital das Clínicas participaram da pesquisa. Os pacientes que apresentavam complicações sistêmicas em decorrência do DM, haviam feito uso de antibiótico ou sido submetidos a tratamento periodontal nos últimos seis meses, bem como grávidas ou lactantes, e fumantes foram excluídos do estudo. Para serem incluídos, os pacientes deveriam ter no mínimo dezoito anos, não apresentar dentes decíduos e ter o diagnóstico de DM1. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CCAE 11078412.4.0000.5208.

Exame Clínico Periodontal

O exame clínico foi realizado por um único examinador, em ambiente de consultório com luz artificial e usando como instrumentos: espelho bucal e sonda periodontal milimetrada tipo Williams (Trinity®, Brasil). Seis sítios de cada dente foram examinados (mesial, médio e disto-vestibular, e mesial, médio e disto-lingual ou palatino), com exceção dos terceiros molares. Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: sangramento gengival (a presença / ausência de sangramento foi registrada após 30 segundos da inserção da sonda periodontal 1-2 mm intrasulcular e ter percorrido da face distal para mesial, com respectivas pontuações de 1 e 0), profundidade de sondagem (a distância entre a margem da gengiva e a porção mais apical da bolsa ou sulco, medida em milímetros), sangramento à sondagem (a presença / ausência de sangramento foi registrada após 30 segundos transcorridos da profundidade de sondagem, com respectivas pontuações de 1 e 0), e nível de inserção clínica (medida que corresponde à distância da junção amelocementária até a porção mais apical do sulco ou bolsa periodontal, obtida através do somatório das medidas de profundidade de sondagem e recessão gengival).

Obtenção das amostras e Extração do DNA

Procedeu-se a coleta de células da descamação da mucosa jugal com o auxílio de um citobrush, estas células foram transportadas para um tubo para microcentrífuga contendo 1ml de solução salina e armazenadas a -20°C para posterior extração e análise do DNA.

O DNA foi extraído de amostras dos participantes, utilizando-se o Kit QIAamp DNA (Qiagen®), de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, o DNA foi mantido a -20°C até processamento por PCR.

Processamento através da técnica de PCR

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) com o seguinte protocolo de reação: 6 µL de água, 1 µL de primer forward, 1 µL de primer reverse, 10 µL de Master Mix e 2 µL de DNA da amostra, sendo 20 µL o volume final. Em todas as reações de amplificação, foi utilizada uma reação da amplificação sem amostra de DNA como controle negativo para verificação da possibilidade de contaminação.

Para a amplificação da região -174 do gene IL-6 foram utilizados os seguintes iniciadores previamente descritos por Depboylu et al. (2004): sequência forward 5´- TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG -3´ e reverse 5´- TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA -3.

As condições de amplificação foram as seguintes: 1ª fase - “hot start” (94° C por 3 minutos); 2ª fase – dividida em três etapas e realizada por 40 ciclos – 1) desnaturação do DNA alvo por aquecimento (94°C por 30 segundos), 2) anelamento do primer (58°C por 30 segundos), 3) extensão (72° C por 35 segundos); e 3ª fase - extensão final (72° C por 3 minutos).

Para a análise do polimorfismo pela técnica da restrição do fragmento (RFLP), 8 µl do produto de amplificação foi submetido à digestão enzimática (Overnigth 37° C) com 2U da enzima de restrição Hsp92II (PROMEGA, Madison, WI, USA) em um volume total de 10 µl.

Após essa etapa, 10 µl dos produtos da PCR foram adicionados a 4 µl do corante fluorescente gel red (Biotium, Brasil) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100 pb ladder (LGC

Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese. O perfil obtido para o alelo G foi 244pb + 56 pb, e para o alelo C foi 133 pb + 111 pb e 56 pb.

Análises estatísticas

O número de sítios com $PS \geq 4\text{mm}$ e $NIC \geq 4\text{mm}$ foi calculado como porcentagem de sítios afetados em relação ao número total de sítios medidos.

Características dos sujeitos foram expressas em média ($\pm$ Desvio-padrão). Ambas as associações brutas e ajustadas entre o percentual de extensão do $NIC \geq 4\text{mm}$, $PS \geq 4\text{mm}$, SG (%) e SS (%) e seus determinantes foram calculadas usando análise de regressão linear. Foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas dos pacientes. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p\text{-valor} < 0,05$. O software utilizado foi o SPSS 17.0.

3. RESULTADOS

Quarenta e dois pacientes com diagnóstico de DM tipo 1 compareceram à clínica de odontologia da UFPE, destes, treze foram excluídos por não atenderem aos critérios da pesquisa. Os vinte e nove pacientes incluídos no estudo apresentavam média de idade de $28,0 \pm 10,4$ anos, com idade mínima de 18 e máxima de 59 anos. O sexo feminino foi maioria com 72,4%, e a duração média do DM foi de $11,2 \pm 9,5$ anos. Quanto ao estado de saúde periodontal, $2,1 \pm 3,5\%$ dos sítios apresentaram Profundidade de Sondagem (PS) $\geq 4\text{mm}$, e $4,5 \pm 5,1\%$ com Nível de Inserção Clínica (NIC) $\geq 4\text{mm}$. Em relação à saúde gengival, $35,6 \pm 18,7\%$ dos sítios apresentaram Sangramento Gengival e $48,2 \pm 22,5\%$ dos sítios apresentaram Sangramento à Sondagem (Tabela 01).

A tabela dois apresenta as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos da IL-6 na posição -174 em pacientes com diagnósticos de diabetes mellitus tipo 1.

As associações não ajustados entre o ponto de NIC $\geq 4\text{mm}$ e PS $\geq 4\text{mm}$ são mostrados na Tabela 03. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de NIC $\geq 4\text{mm}$ e PS $\geq 4\text{mm}$ em relação às variáveis: genótipo, idade, duração do DM.

As associações não ajustados entre o percentual de SG e SS são mostrados na Tabela 04. Embora 100% dos pacientes tenha apresentado pelo menos um sítio com SG e SS, não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de SG e SS e as variáveis: genótipo, duração do DM e idade.

4. DISCUSSÃO

A progressão das doenças periodontais é modificada por diversos fatores incluindo fatores locais, sistêmicos e ambientais. Variações interindividuais na experiência da DP também têm sido explicadas através de variações genéticas na resposta imuno-inflamatória (Albandar, 2002).

A prevalência e a severidade da periodontite tem sido relacionada com o aumento da idade – adultos mais velhos são mais propensos a desenvolver periodontite moderada ou grave em comparação aos adultos jovens (Eke, Dye, Wei, Thorton-Evans, & Genco, 2012). De acordo com Rajendran, Priyadharshini, & Arora (2013) o envelhecimento está associado com alterações histológicas e clínicas em tecidos orais. O afinamento do epitélio e a diminuição da queratinização ocorrem com o envelhecimento gengival e os componentes celulares do tecido conjuntivo gengival diminuem com a idade. Estas alterações estruturais e funcionais nos tecidos gengivais juntamente com um declínio da resposta imune podem resultar num aumento da susceptibilidade dos idosos a infecções microbianas. Costa, Guimarães, de Souza, Nóbrega, & Bezerra (2010) sugerem que o polimorfismo genético de IL-6 (-174) pode estar associado com periodontite crônica numa população altamente homogênea de mulheres anciãs brasileiras.

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de $NIC \geq 4mm$ e $PS \geq 4mm$ em relação à idade e ao genótipo dos pacientes. Esse achado pode estar relacionado ao fato de ter-se trabalhado com uma população de adultos jovens com média de idade de $28,0 \pm 10,4$ anos e, portanto, é provável que a maioria ainda não tenha desenvolvido tais alterações relacionadas ao envelhecimento. Esses dados também sugerem que o diabetes tipo 1 não promove início precoce da doença periodontal, mesmo em indivíduos com o polimorfismo genético da IL-6 (-174).

Para pacientes diabéticos tipo 1, Karjalainen, Knuuttila, & von Dickhoff (1994) relataram que a presença de complicações crônicas estão associadas com o aumento da gravidade da doença periodontal. A prevalência de $PS \geq 4mm$ em superfícies com cálculo subgengival aumentou com as complicações ($p = 0,01$). Isso pode ter sido resultado de alterações biológicas relacionadas com as complicações, reduzindo a resistência dos pacientes aos fatores etiológicos locais. Esta pode ser mais uma possível explicação para o reduzido percentual de sítios com $PS \geq 4mm$ encontrados neste estudo, uma vez que, com o objetivo de obter-se uma amostra mais homogênea, diminuindo o número de vieses na pesquisa, um dos critérios de exclusão adotado foi que o paciente apresentasse complicações sistêmicas em decorrência do diabetes.

Em contraste com a periodontite, a gengivite afeta crianças, adultos e idosos em proporções quase iguais (LI et al., 2010). No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de sangramento gengival e sangramento à sondagem e a idade pacientes diabéticos tipo 1. Em relação ao genótipo, esta associação também não foi significativa, sugerindo que diferentes níveis de IL-6 não afetaria a saúde gengival dos pacientes. Este fato está em concordância com o estudo de Wahaidi, Kowolik, Eckert, & Galli, (2011) onde não houve associação entre gengivite experimental e os níveis sistêmicos de IL-6 em uma população de adultos saudáveis entre 18 e 30 anos.

O terceiro inquérito nacional de nutrição e saúde (NHANES III) estima que aproximadamente 54% da população dos Estados Unidos a partir dos treze anos de idade tenha pelo menos um sítio com sangramento gengival (Tomar & Asma, 2000). Apesar de não haver correlação estatística entre o percentual de SG e SS e as variáveis analisadas, neste estudo 100% dos pacientes apresentaram pelo menos um sítio com SG e SS, sugerindo uma possível predisposição à inflamação gengival em pacientes diabéticos tipo 1. Este achado está de acordo com uma pesquisa com adultos, entre 18 e 50 anos de idade, realizada por Silvestre, Miralles, Llambes, Bautista, Solá-Izquierdo, & Hernández-Mijares (2009), onde comparou-se 90 indivíduos com diabetes tipo 1 e 90 indivíduos saudáveis que apresentavam condições de higiene bucal semelhante (já que não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao índice de placa), e observou-se maior índice de sangramento gengival ($p < 0,01$) no grupo de pacientes com diabetes. A análise de regressão mostrou associação entre o índice de sangramento gengival e a probabilidade do sujeito ser diabético.

Muitos estudos tem relatado a correlação entre fatores relacionados ao diabetes, incluindo a duração do diabetes e a saúde periodontal. No entanto, os resultados têm sido conflitantes. Em um estudo transversal, realizado no Chile, com 100 diabéticos tipo 1, entre 18 e 30 anos de idade, encontrou-se prevalências de gengivite e periodontite de 22% e 41%, respectivamente. Os autores observaram que o grupo com doença periodontal apresentava maior número de indivíduos com diabetes de duração superior a 10 anos (55% versus 28%) em comparação com o grupo sem doença periodontal. Tais achados sugeriram que a duração prolongada do diabetes fosse um possível fator de risco para a doença periodontal ($p = 0,0001$) (Pávez, Araya, Rubio, Ríos, Meza, & Martínez, 2002). Por outro lado, Solskone (1998) e Sandberg, Sundberg, Fjellstrom, & Wikblad (2000) não encontraram correlação entre o tempo de diabetes e a prevalência e gravidade da doença periodontal. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados neste estudo, uma vez que, embora os pacientes apresentassem uma

duração média de $11,2 \pm 9,5$ anos de diabetes, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a duração do diabetes e os parâmetros clínicos avaliados.

Nota-se uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade à DP e ao DM, principalmente focando-se em genes relacionados ao sistema imunoinflamatório, particularmente das citocinas. Num estudo com uma população brasileira, Moreira *et al.* (2007) demonstraram a existência de correlação direta entre o polimorfismo genético de IL-6 (-174) e a severidade da periodontite. Até o momento, poucos estudos tem sido feitos para investigar se existe associação entre o polimorfismo genético de genes das citocinas e a DP em diabéticos tipo 1. Raunio, Knuuttila, Hiltunen, Karttunen, Vainio, & Tervonen (2009) em um estudo envolvendo pacientes com DM1, realizaram exames clínicos periodontais em oitenta pacientes que também tiveram o nível de hemoglobina glicada mensurado (HbA1c). Vários polimorfismos foram estudados, mas, somente o genótipo GG do polimorfismo -174 no gene IL-6 mostrou ser um forte fator de suscetibilidade para DP entre os pacientes com DM1. Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a gravidade da DP e o genótipo.

O número de pessoas empregadas neste estudo foi menor que em outros estudos sobre o polimorfismo da IL-6. Esta pode ser uma provável explicação para os nossos resultados diferirem da literatura. Além disso, os resultados conflitantes entre diferentes estudos podem ser explicados pelo efeito sinérgico entre os diferentes SNPs (Kalburgi, Bathia, Bilichodmath, Patil, Mangalekar, & Bath, 2010).

5. CONCLUSÃO

De acordo com presente estudo, o polimorfismo da IL-6 (-174) parece não influenciar a severidade da DP em diabéticos tipo 1. Contudo, outros estudos relacionados com a expressão da IL-6 poderiam contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da periodontite.

REFERÊNCIAS

- Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 29, 177–206.
- Costa, A.M., Guimarães, M. C., de Souza, E.R, Nóbrega, O. T., & Bezerra, A.C. (2010). Interlukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor-alpha (G- 308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontology*, 27(1), 70-75.
- Depboylu, C., Lohmuller, F., Gocke, P., Du, Y., Zimmer, R., Gasser, T., et al. (2004). An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, 17(3), 170–173.
- Eke, P.I., Dye, B. A., Wei, L., Thorton-Evans, G.O, & Genco, R.J. (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*, 91(10), 914–920.
- Franch-Chillida, F., Nibali, L., Madden, I., Donos, N., & Brett, P. (2010). Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol.*, 37(2), 137-144.
- Galícia, J.C., Tai, H., Komatsu, Y., Shimada, Y., Ikezawa, I., &Yoshie, H. (2006). Interleukin-6 receptor gene polymorphisms and periodontitis in a non-smoking Japanese population. *J Clin Periodontol.*, 33 (10), 704-709.
- Gemmell, E., Marshall, R. I., & Seymour, G. J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 14, 112-143.
- Gemmell, E., & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 35, 21–41.
- Hirano, T., Akira, S., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*, 11(12), 443-449.
- Irwin, C. R., & Myrillas, T. T. (1998). The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral dis.*, 4(1), 43–47.
- Kalburgi, N. B., Bathia, A., Bilichodmath, S., Patil, S. R, Mangalekar, S. B., & Bath, K. (2010). Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *J Oral Sci.*, 52, 431-437.
- Karjalainen, K. M., Knuuttila, M. L. E., & von Dickhoff, K. J. (1994). Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J. Periodontol.*, 65(11), 1067-1072.
- Kinane, D. F., & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14(6), 430–449.

Liu, E., & Eisenbarth, G. S. (2002). Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 31(2), 391-410.

Li, Y., Lee, S., Hujoel, P., Su, M., Zhang, W., Kim, J. et al. (2010) Prevalence and severity of gingivitis in American adults. *Am J Dent*, 23(1), 9–13.

Mealey, B. L., & Oates, T. W. (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J. Periodontol.*, 77(8), 1289-303.

Moreira, P. R., Lima, P. M., Sathler, K. O., Imanishi, S. A., Costa, J. E., Gomes, R. S., et al. (2007). Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 148(1), 119-126.

Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E. et al. (2000). Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(11), 1699–1707.

Naruishi, K., Takashiba, S., Nishimura, F., Chou, H. H., Arai, H., Yamada, H., et al. (2001). Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res.*, 80(5), 1421–1424.

Nibali, L., Griffiths, G. S., Donos, N., Parkar, M., D’Aiutu, F, Tonetti, M. S., et al. (2008). Association between interleukin-6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 35, 193–198.

Nibali, L. , O’Dea, M., Bouma, G., Parkar, M., Thrasher, A. J., Burns, S., et al. (2010). Genetic variants associated with neutrophil function in aggressive periodontitis and healthy controls. *J Periodontol.*, 81(4), 527-534.

Omori, K., Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., & Takashiba, S. (2004). High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem.*, 279(8), 6643–6649.

Page, R.C. (1998). The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol.*, 3(1), 108-20.

Pávez, V. C., Araya, V. Q., Rubio, A. G., Ríos, L. S., Meza, P. R., & Martínez, B. R. (2002). Estado de salud periodontal em diabéticos tipo 1, de 18 a 30 años de edad, de Santiago de Chile. *Rev. med. Chile*, 130(4).

Rajendran, M., Priyadharshini, V., & Arora, G. (2013). Is immunesenescence a contributing factor for periodontal diseases? *J Indian Soc Periodontol*, 17(2), 169–174.

Raunio, T., Knuuttila, M., Hiltunen, L., Karttunen, R., Vainio, O., & Tervonen, T. (2009). IL-6 -174 genotype associated with the extent of periodontal disease in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol.*, 36(1), 11-17.

- Roodman, G. D., Kurihara, N., Ohsaki, Y., Kukita, A., Hosking, D., Demulder, A., et al. (1992). Interleukin-6 – a potential Autocrine Paracrine factor in Pagets-disease of bone. *Journal of Clinical Investigation*, 89(1), 46–52.
- Sandberg, G. E., Sundberg, H. E., Fjellstrom, C.A., & Wikblad, K. F. (2000). Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract*, 50(1), 27–34.
- Seruga, B., Zhang, H., Bernstein, L. J., & Tannock, I. F. (2008). Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 8(11), 887-899.
- Shapira, L., Wilensky, A., & Kinane, D. F. (2005). Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J. Clin. Periodontol*, 32(6), 72–86.
- Silvestre, F. J., Miralles, L., Llambes, F., Bautista, D., Solá-Izquierdo, E., & Hernández-Mijares, A. (2009). Type 1 diabetes mellitus and periodontal disease: relationship to different clinical variables. *Med. oral patol. oral cir. bucal*, 14(4), 175-179.
- Solskone, W.A. (1998). Epidemiological and clinical aspects of periodontal disease in diabetics. *Ann Periodontol*, 3(1), 3–12.
- Takashiba, S., & Naruishi, K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 40, 94–106.
- Taylor, G. W. (2001) Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol.*, 6(1), 99-112.
- Tervonen, T., Raunio, T., Knuuttila, M., & Karttunen, R. (2007). Polymorphisms in the CD14 and IL- 6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.*, 4(5), 377-383.
- Trevilatto, P. C., Scarel-Caminaga, R. M., de Brito, R. B. Jr, de Souza, A. P., & Line, S. R. (2003). Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.*, 30(5), 438-442.
- Van dyke, T. E., Lester, M. A., & Shapira, L. (1993) The role of the host response in periodontal disease progression: implication for future treatment strategies. *J Periodontol.*, 64(8), 792-806.
- Wahaidi, V. Y., Kowolik, M. J., Eckert, G. J., & Galli, D. M. (2011). Endotoxemia and the host systemic response during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, 38(5), 412–417.
- Woods, A., Brull, D. J., Humphries, S. E., & Montgomery, H. E. (2000). Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur. Heart J.*, 21(19), 1574-1583.
- Xiao, L. M., Yan, Y. X., Xie, C. J., Fan, W. H., Xuan, D. Y., Wang, C. X., et al. (2009). Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a Chinese population. *Oral Dis.*, 15(8), 547-553.

Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., & Galicia, J. C. (2007). The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology 2000*, 43, 102–132.

APÊNDICES

Apêndice A - Tabelas

Tabela 01 – Características da amostra dos pacientes com diabetes mellitus do Tipo 1

Variáveis	N(% pacientes)	Média ± Dp
Idade		28,0 ± 10,4
Anos de Diabetes		11,2 ± 9,5
<i>Parâmetros Periodontais (Média % de sítios ± Dp)</i>		
PS ≥ 4mm	16 (55,2%)	2,1 ± 3,5
NIC ≥ 4mm	25 (86,2%)	4,5 ± 5,1
Sangramento Gengival (SG)	29 (100%)	35,6 ± 18,7
Sangramento à Sondagem (SS)	29 (100%)	48,2 ± 22,5

Tabela 02 – Frequências Genótípicas e alélicas dos polimorfismos da IL-6 na posição -174 em pacientes com diagnósticos de diabetes mellitus tipo 1

Diabéticos (n=27)	
Genótipos	
GG	12 (44,4%)
GC+CC	15 (55,6%)
Alélicas	
G	39 (72,2%)
C	15 (27,8%)

Tabela 03 – Associações não ajustadas entre percentuais de sítios com NIC ≥ 4mm e PS ≥ 4mm e as variáveis explicativas

	NIC ≥ 4mm (%)			PS ≥ 4mm(%)		
	β	IC(95%)	p	β	IC(95%)	p
Genótipo*	-1,10	-5,80 - 3,60	0,631	-1,53	-3,77 - 0,71	0,170
Idade	0,04	-0,25 - 0,32	0,783	0,02	-0,12 - 0,15	0,804
Anos com Diabetes	-0,13	-0,46 - 0,20	0,416	-0,05	-0,20 - 0,11	0,552

Variáveis contínuas: Idade, Anos com Diabetes / *Genótipo: GG versus GC/CC

Tabela 04 – Associações não ajustadas entre percentuais de sítios com sangramento gengival (SG) e Sangramento à Sondagem (SS) e as variáveis explicativas

	SG (%)			SS(%)		
	β	IC(95%)	p	β	IC(95%)	p
Genótipo	8,70	-7,22 - 24,61	0,268	12,55	-4,97 - 30,06	0,151
Anos com Diabetes	-0,56	-1,65 - 0,53	0,295	-0,68	-1,88 - 0,52	0,249
Idade	0,12	-0,83 - 1,07	0,795	0,25	-0,79 - 1,30	0,618

Variáveis contínuas: Idade, Anos com Diabetes / *Genótipo: GG versus GC/CC

Apêndice B - Prontuário clínico

PRONTUÁRIO Nº: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PRONTUÁRIO CLÍNICO**ARQUIVO DO GRUPO DE PESQUISAS EM PERIODONTIA****ANAMNESE****IDENTIFICAÇÃO****Dados pessoais:**

Nome: _____
Data de nascimento: _____ Sexo: () Feminino () Masculino
Est.Civil: _____ Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____
Escolaridade: _____ Renda (em salários): _____
Endereço: _____ nº: _____
Bairro: _____ CEP: _____ Cidade: _____
Telefone(s) para contato: _____
Referência pessoal: _____ Fone: _____

HISTÓRIA MÉDICA**Antecedentes familiares:**

Condição Sistêmica (Alterações em decorrência do diabetes? Outras? Há quanto tempo é diabético?):

Medicamentos utilizados:

Fez uso de antibiótico nos últimos seis meses?

Está grávida ou lactante?

Vícios

() Nunca fumou

() Ex-fumante _____ (anos que parou)

() Fumante _____ (quantos cigarros por dia)

() Outros _____

HISTÓRIA ODONTO-ESTOMATOLÓGICA

Com qual frequência você visita o seu dentista?

Quando foi sua última consulta?

Foi submetido a tratamento periodontal nos últimos seis meses?

Faz uso de algum tipo prótese e/ou aparelho ortodôntico?

EXAME FÍSICO

ÍNDICE DE SANGRAMENTO GENGIVAL

Sangramento: Faces _____ % _____

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

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

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

RECESSÃO GENGIVAL, PROFUNDIDADE DE SONDAGEM E NÍVEL DE INSERÇÃO CLÍNICA

Dente	Recessão Gengival (mm)						Profundidade de Sondagem (mm)						NIC (mm)		
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina			V	P	
	D	C	M	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

Sangramento: Faces _____ % _____

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

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Elementos:

ANOTAÇÕES

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Apêndice C - Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o (a) Sr. (a) para participar da nossa pesquisa intitulada “**Associação entre o polimorfismo da IL-6 e a condição periodontal em diabéticos tipo 1**”, que é coordenada pela pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Seguem abaixo informações adicionais sobre a pesquisa.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira (Pesquisadora de Pós-Doutorado em Odontologia da UFPE). Endereço: *Campus* Univesitário da UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Prótese e Cirurgia Bucomaxilofacial (Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE) – Av. Prof^o Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP 50670-901, Recife/PE. Telefone: (81) 2126-8817.

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar a presença de pequenas variações genéticas que são encontradas em proteínas da imunidade inata (defesa natural do paciente) e a presença de microrganismos (bactérias) relacionados à doença periodontal.

BENEFÍCIOS: Você receberá orientações de higiene oral e como tratar a doença periodontal presente e prevenir sua progressão. Também receberá uma profilaxia (escovação) dental e caso necessite de tratamento odontológico será orientado (a) a procurar o serviço de Odontologia da UFPE.

RISCOS: Você poderá correr o risco de, durante o exame clínico, se sentir constrangido (a) devido às perguntas em relação à sua história médica, além do constrangimento durante o exame intrabucal, caso apresente ausências dentárias. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, o qual fará o seu exame em local apropriado (Clínica de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE) e estará sob a orientação do professor responsável. Também serão colhidas amostras da mucosa oral (bochecha) por meio de um citobrush (escova específica para esse fim), sendo um procedimento não-invasivo tipo “esfregaço” e que apresenta mínimo risco para você. Todos os procedimentos serão realizados respeitando os critérios de biossegurança necessários.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a pesquisadora Dra. Renata Cimões Jovino Silveira, no *Campus* Univesitário da UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Prótese e Cirurgia Bucomaxilofacial, Cidade Universitária, CEP 50670-901 – Recife/PE, ou pelo telefone (81) 2126-8817. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê

de Ética em Pesquisa da UFPE, localizado no *Campus* Universitário da UFPE, Avenida da Engenharia s/n – 1º andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, pelo telefone (81) 2126-8588 ou pelo e-mail: cepccs@ufpe.br.

Eu, _____ RG.Nº. _____

Abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo participar desta pesquisa, bem como autorizo toda a documentação necessária, a divulgação e a publicação da mesma, em periódicos científicos, na área de Odontologia.

DIREITOS:

1. A garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outras questões relacionadas com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso me traga prejuízo;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. Disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito por parte da instrução à saúde, em casos de danos (constrangimentos referentes ao exame clínico, de acordo com o citado acima no tópico de *Riscos*) que sejam justificados e causados diretamente pela pesquisa;
5. Compromisso de obter informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar participando;
6. Em caso de gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa;
7. A garantia de que os materiais coletados, como células da mucosa oral, serão devidamente armazenados em freezers à temperatura de -20°C aproximadamente, por um período de três anos, sob a responsabilidade da pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira.

Tendo ciência do exposto acima, desejo participar da pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador Assinatura da Testemunha Assinatura da Testemunha

Contatos:

- Mestranda Marília Lins e Silva: (81) 9783-1115; marilialinsesilva@gmail.com;
- Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira: (81) 2126-8817 (Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da UFPE);
- Comitê de Ética em Pesquisa (Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126 8588)

ANEXOS

Anexo A - Parecer do comitê de ética

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre o polimorfismo da IL-6 e a condição periodontal em diabéticos tipo 1

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11078412.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 194.658

Data da Relatoria: 06/02/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPE, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença de polimorfismos genéticos da IL-6 (-174) em pacientes com diabetes tipo 1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A amostra será constituída por 150 indivíduos com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, o estudo será do tipo série de casos. O projeto será desenvolvido nas instalações da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, e os pacientes serão selecionados entre aqueles que estão em atendimento no serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UFPE e Hospital Agamenon Magalhães.

Crítérios de inclusão: Não apresentar dentes decíduos; Aceitar participar da pesquisa; Ter idade de no mínimo 18 anos e no máximo 35 anos; Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1.

Crítérios de exclusão: Apresentar complicação sistêmica do diabetes (Ex.: Retinopatia, nefropatia, cardiopatia); Estar grávida ou lactante; Ter feito uso de antibiótico nos últimos 6 meses; Ter se

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

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

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



submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses.

Metodologia

Avaliação clínica

Análise do polimorfismo para IL-6 (-174) a partir da coleta de células de descamação da mucosa jugal

Extração do DNA e Processamento por PCR

Análise Microbiológica

Análise estatística

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:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

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

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

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



RECIFE, 06 de Fevereiro de 2013

Assinador 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 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Anexo B - Normas da revista

Journal of Diabetes and its complications

The primary purpose of *Journal of Diabetes and its Complications* is to act as a source of information, usable by those caring for patients with diabetes mellitus who are thereby at risk for development of those complications which all too often appear with time. While our primary aim is to assist the practitioner in his/her care of such patients, and to afford access to information that may allow the prevention of such complications, it is the Editors' wish to function as a forum for that information which, while still experimental, may shed light upon current thinking of those active in the fields appropriate to the aims of *Journal of Diabetes and its Complications*.

In addition to general articles on clinical aspects of diabetes mellitus, *Journal of Diabetes and its Complications* also presents articles on basic research in all areas of diabetes and its related syndromes. Topics covered relevant to the diabetic patient will include diagnosis, pathogenesis, and clinical management of the following: diabetic retinopathy, neuropathy and nephropathy; peripheral vascular disease and coronary heart disease; gastrointestinal disorders, renal failure and impotence; and hypertension and hyperlipidemia. *Journal of Diabetes and its Complications* will also publish papers on the general pathogenesis and prevention of diabetes.

Criteria for initial considerations for papers submitted will be originality, statistical probability of all data, and applicability to the aims of the Journal as a whole. Additional weight will be afforded to those submissions that are concise and comprehensible. All potentially acceptable manuscripts will be subjected to the process of peer review. To aid with the peer-review process, at least five suggested reviewers whose expertise falls within the scope of the submitted manuscript must be provided. For each suggested reviewer include full names, addresses (physical and email), phone and fax numbers.

Editor-in-Chief	Vivian	Fonseca	MD
Professor	of	Medicine	and
Tullis	Tulane	Alumni	Chair
Chief,	Section	of	in
Tulane	University	Health	Sciences
1430	Tulane	Avenue	-
New	Orleans,	LA	SL
USA			

Manuscript

Manuscripts should be submitted online at <http://ees.elsevier.com/jdc> and the instructions on the site should be followed closely. Authors may submit manuscripts and track their progress to final decision. Reviewers can download manuscripts and submit their reports to the Editors.

The Editorial Office can be emailed at: JDiabComplic@elsevier.com

Journal

All manuscripts submitted to *Journal of Diabetes and its Complications* should report original research not previously published or being considered for publication elsewhere, make explicit any conflict of interest, identify sources of funding and generally be of a high ethical standard.

Submission

Principles

Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression. Submission of a paper to *Journal of Diabetes and its Complications* is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere.

Authorship

The Corresponding Author must submit a completed Author Consent Form with their manuscript. All authors must sign the Author Consent Form.

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

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Ethics

Work on human beings that is submitted to the journal should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki "Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects", adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964 (and its successive amendments). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Patients and Study Participants

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent which should be documented in your paper.

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patient's photographs, pedigree, images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in the submissions unless the information is essential for scientific purposes and written informed consent has been obtained for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the journal on request.

Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. Complete anonymity is difficult to achieve. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note.

Clinical

Trials

All randomised controlled trials submitted to *Journal of Diabetes and its Complications* whose primary purpose is to affect clinical practice (phase 3 trials) must be registered in accordance with the principles outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE; <http://www.icmje.org/>). ICJME-approved registries currently include the following: 'ClinicalTrials.gov'; 'www.ISRCTN.org'; 'www.actr.org.au'; 'www.umin.ac.jp'; and

'www.trialregister.nl'. Please include the unique trial number and registry name on manuscript submission.

Conflict of Interest Statement
All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work, all within three years of beginning the work submitted. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This statement will be included in the published article.

Article Types
N.B. For reasons of available space, manuscripts that exceed the required word limits (below) will be declined automatically. All articles other than *Editorials* and *Letters to the Editor* are subject to full peer review.

1. **Editorials** are either written or commissioned by the Editors and should not exceed 1000 words (not including a maximum of 20 references; one small figure can be included).
2. **Commentaries** (1000 words not including a maximum of 20 references and one small figure) offer a stimulating, journalistic and accessible insight into issues of common interest. They are usually commissioned by the Editors but unsolicited articles will be considered. Debates comprise two commentaries of opposing or contrasting opinion written by two different groups of authors. Controversial opinions are welcomed as long as they are set in the context of the generally accepted view.
3. **Original Research Articles** should be a maximum of 5000 words. The word limit includes a combined total of five figures or tables with legends, but does not include up to 50 references and an abstract of up to 200 words structured according to Aims, Methods, Results, Conclusions and Keywords. Divide the manuscript into the following sections: Title Page; Structured Abstract; Introduction; Subjects, Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; figures and tables with legends.
4. **Brief Reports** should not exceed 1000 words, including a summary of no more than 50 words (but not including up to 20 references) and may be a preliminary report of work completed, a final report or an observation not requiring a lengthy write-up.
5. **Review articles** should be a maximum of 5000 words, including a summary of no more than 200 words (not including up to 75 references) with subheadings in the text to highlight the content of different sections. The word limit includes a combined total of five figures or tables with legends. Reviews are generally commissioned by the Editors but unsolicited articles will be considered.
6. **Letters to the Editor** should be no more than 400 words.

Brief Reports and Letters to the Editor will only be published electronically but will be listed in the print Table of Contents. These articles can be cited by Digital Object Identifier (DOI) rather than page number.

NEW SUBMISSIONS:

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Simplified Submission service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References:

There are no strict requirements on reference formatting. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Author(s) name(s), journal title / book title, article title, year of publication, volume and issue / book chapter and the pagination must be present. The reference style required by the journal will be applied to the published version by Elsevier.

Formatting

requirements:

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections. It is not necessary to format your manuscript in double column layout, even if the journal has a double column layout.

The Abstract, of no more than 200 words, should be written with particular care. In the first sentence state what has been done. Special technical features of the methods should then be noted. The results should be summarized, and the most important data and supporting statistical correlations should be included. In the final sentence, the authors should emphasize the importance they attach to their observations. Key Words should be provided in the manuscript; normally 3-5 should be included.

The Introduction should be brief and set out the purposes for which the study has been performed.

The Materials and Methods should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well-accepted techniques are used.

The Results should be presented precisely and concisely. Keep discussion of their importance to a minimum in this section of the manuscript.

The Discussion should relate directly to the study being reported with clear conclusions plus a perspective on possible future research. Do not include a general review of the topic.

REVISED SUBMISSIONS:

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

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

Manuscript Style and Format

Headlines and subheadlines should be employed liberally in the Methods, Results, and Discussion sections. Use short paragraphs whenever possible. Clarity of expression, good syntax and the avoidance of jargon is appreciated by the editors and readers. Abbreviations should be explained in the text.

The Title Page should include authors' names, highest earned degrees, academic addresses, address for correspondence, and grant support. Authorship should be assumed only by those

workers who have contributed materially to the work and its report. Colleagues who have otherwise assisted or collaborated should be recognized in the Acknowledgment section, as should sources of funding. The title should be informative and concise. Avoid use of extraneous words such as "study," "investigation," etc. If data from the manuscript have been presented at a meeting, list the full name, date and location of the meeting and reference any previously published abstracts in the bibliography.

Figures must be suitable for high-quality reproduction. Lettering should be complete, of professional quality, and of a size appropriate to that of the illustration or drawing, with the necessary reduction in size taken into account. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, Elsevier will ensure that these figures appear free-of-charge in color in the electronic version of your accepted article, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. Color illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please go to <http://ees.elsevier.com/jdc> and click on the Artwork Guidelines.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

The Language of the journal is English. Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Publisher

Services

Proofs will be sent to the authors for careful checking. Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage. Corrected proofs should be returned to the publisher within stated deadlines.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Fast-track Publication. The journal aims for prompt publication of all accepted papers. Submissions containing new and particularly important data may be fast-tracked for peer review and publication; this is a limited facility and is strictly at the discretion of Editors.

Page Charges will not be made.

Offprints/Reprints. The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Special

Subject

Repositories

Certain repositories such as PubMed Central ('PMC') are authorized under special arrangement

with Elsevier to process and post certain articles. The following agreements have been established for authors whose articles have been accepted for publication in an Elsevier journal and whose underlying research is supported by one of the following funding bodies:

- National Institutes of Health: Elsevier will send a version of the author's accepted manuscript that includes author revisions following peer-review for public access posting 12 months after final publication. Because the NIH 'Public Access' policy is voluntary, authors may elect not to deposit such articles in PMC. If you wish to 'opt out' and not deposit to PMC, you may indicate this by sending an e-mail to NIHauthorrequest@elsevier.com. More information regarding the agreement between Elsevier and the National Institutes of Health can be found at <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/nihauthorrequest>
- The Wellcome Trust: Elsevier will send to PMC the version of the author's manuscript that reflects all author-agreed changes including those made post peer review, for public access posting immediately after final publication. Authors are required to initially subsidize their manuscript with fees reimbursed by the Wellcome Trust. Wellcome Trust authors, whose manuscripts are subsidised, will have the corresponding articles made free to non-subscribers on ScienceDirect <http://www.sciencedirect.com> and Elsevier's electronic publishing platforms. More information regarding the agreement between Elsevier and The Wellcome Trust can be found at <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/wellcometrustauthors>

Further information for authors can be found at <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors>