

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

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA E
POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 6, OSTEOPROTEGERINA E RECEPTOR
PARA VITAMINA D EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

Recife – PE

2015

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA E
POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 6, OSTEOPROTEGERINA E RECEPTOR
PARA VITAMINA D EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

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 Integrada.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Alfredo Bandeira e Farias

Recife – PE

2015

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G642a Gonzaga, Raphaella Karlla Machado.
Avaliação da associação entre periodontite crônica e polimorfismos de interleucina 6, osteoprotegerina e receptor para vitamina D em pacientes diabéticos tipo 2 / Raphaella Karlla Machado Gonzaga. – 2015. 65 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2015.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Diabetes mellitus. 2. Periodontite. 3. Polimorfismo genético. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-148)

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA E
POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 6, OSTEOPROTEGERINA E RECEPTOR
PARA VITAMINA D EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 12 de fevereiro de 2015

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS – UFPE
Presidente

Prof. Dr. LEOGENES MAIA SANTIAGO – ASCES
1º Examinador

Prof. Dr.^a FLAVIA MARIA DE MORAES RAMOS PEREZ – UFPE
2º Examinador

Recife –PE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

COLEGIADO

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof^a. Dr^a. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza dos Anjos Pontual

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

SECRETÁRIA

Oziclere Sena de Araújo

Aos meus pais, *George* e *Adriana*; à minha irmã, *Stephanie*; e ao meu namorado, *Fernando*, pelo constante apoio, motivação e suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, por sua infinita misericórdia e bondade e porque através da minha fé nEle posso vencer os obstáculos, superar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, *George e Adriana*, pelo amor incondicional, pelo incentivo constante ao meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico e pelo apoio em todas as etapas desse mestrado.

À minha irmã, *Stephanie*, por seu amor, paciência, ajuda e compreensão.

Ao meu namorado, *Fernando*, pelo carinho constante, paciência, disposição para ouvir e ajudar e por sua presença que sempre inspira calma e confiança.

A todos os que fazem parte do *Programa de Pós-graduação em Odontologia* da UFPE, por me ajudarem a obter mais essa conquista acadêmica.

À minha orientadora, *Professora Doutora Renata Cimões Jovino Silveira*, por ter desde o início me acolhido, pela ajuda imensurável, pelas oportunidades que me concedeu e por sempre apresentar soluções para os obstáculos que surgiram.

Ao *Professor Doutor Francisco Alfredo Bandeira e Farias*, por gentilmente me conceder acesso ao ambulatório de endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães e seus pacientes.

Ao *Professor Doutor Paulo Roberto Eleutério de Souza*, por ceder o laboratório Genoma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por sua calma, por sua disposição em ajudar e pelo imenso amor que tem pela docência.

A todos os que trabalham no laboratório Genoma, graduandos, mestrandos, doutorandos, técnica, pela paciência e atenção a mim dispensada, pela disposição de ensinar e ajudar. Agradeço em especial aos alunos *Erinaldo Santos e Victor Vasconcelos*, que mais de perto me auxiliaram nas etapas laboratoriais.

A *Bruna Farias e Felipe Bravo*, pela gentileza e ajuda essencial na coleta dos dados dessa pesquisa.

Aos meus *colegas de turma*, pelos bons momentos de aprendizado, crescimento e diversão que tivemos juntos. Em especial a *Bruna Paloma*, por sua solicitude e ajuda de grande valia e a *Karinne Azevedo*, por sua amizade.

A *Camila Cravo*, minha eterna dupla, por sua valiosa amizade que ultrapassa o tempo e a distância e por seu auxílio.

A *Ana Raquel Vilela* e também a *Viviane Falcão* por seu auxílio e contribuição na captação de pacientes.

Às alunas de iniciação, *Ladaha Linhares* e *Marcela Valença*, pela companhia no Hospital Agamenon Magalhães e pela ajuda valiosíssima, e sem as quais não conseguiria dar conta de tudo.

Aos *pacientes*, que doaram um pouco de seu tempo e se permitiram ser examinados.

Ao *CNPq* (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus *amigos*, os de perto, de longe, da Igreja, do colégio, da graduação, enfim todos aqueles que têm uma participação nessa conquista; obrigada por terem me ouvido, me aconselhado, me apoiado, por suas orações e palavras de ânimo e estímulo.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

RESUMO

Objetivos: Avaliar a condição periodontal de pacientes diabéticos tipo 2; detectar polimorfismos genéticos da interleucina 6 (IL-6) na posição -174, da osteoprotegerina (OPG) na posição -950 e do receptor para vitamina D (VDR) nas posições TaqI e FokI e verificar se existe associação entre a presença destes polimorfismos e a profundidade de sondagem em pacientes portadores de periodontite crônica e diabetes mellitus tipo 2. **Materiais e Métodos:** Sessenta e dois pacientes, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a trinta e cinco anos, diabéticos tipo 2, com no mínimo oito dentes presentes na boca e diagnóstico de periodontite crônica participaram do estudo. Os pacientes foram examinados clinicamente e quanto ao nível de glicemia e hemoglobina glicada. Também foi coletada saliva para análise dos polimorfismos de IL-6 na posição -174, OPG na posição -950 e VDR nas posições TaqI e FokI através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para análise estatística, os testes Exato de Fisher e de Mann Whitney foram utilizados, adotando nível de significância de 5%. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa na profundidade de sondagem em relação aos genótipos de IL-6, OPG e FokI; no entanto foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação entre a profundidade de sondagem média e os genótipos de TaqI. **Conclusões:** A profundidade de sondagem está associada à glicemia em jejum. Os polimorfismos de IL-6, OPG e FokI não estão associados à profundidade de sondagem, entretanto os genótipos de TaqI (TT) podem estar associados à profundidade de sondagem.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Periodontite. Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Aims: to evaluate the periodontal condition of patients with type 2 diabetes, to detect genetic polymorphisms of interleukin 6 (IL-6) in -174 position, of osteoprotegerin (OPG) in -950 position and of vitamin D receptor (VDR) in TaqI and FokI positions and to investigate the association between the presence of these polymorphisms and the probe depth in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. **Methods:** Sixty-two patients, of both sexes, with age equal or higher than thirty-five years, type 2 diabetics, with a minimum of eight teeth in the mouth and diagnosis of chronic periodontitis participated in the study. The patients were examined clinically and in the levels of glycemia and glicated hemoglobin. Also saliva was collected for analysis of polymorphisms of IL-6 in -174 position, of OPG in -950 position and of VDR in TaqI and FokI positions by polymerase chain reaction (PCR). For statistical analysis, Fisher's Exact test and Mann Whitney test were used, adopting a significance level of 5%. **Results:** There was no statistically significant difference in probing depth in relation to IL-6, OPG and FokI genotypes; however there was a statistically significant difference when comparing the average probing depth and TaqI genotypes. **Conclusions:** The probe depth is associated with glycemia. The polymorphisms of IL-6, OPG and FokI are not associated with probe depth, however TaqI genotypes (TT) may be associated with probe depth.

Keywords: Diabetes Mellitus. Periodontitis. Genetic Polymorphism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Descrição das variáveis.	26
Tabela 02 – Frequência dos Genótipos e Alelos dos Genes IL-6, OPG, TaqI e FokI	27
Tabela 03 – Comparação entre as médias das variáveis tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento, índice de placa e NIC segundo a profundidade de sondagem.	28
Tabela 04 – Comparação entre as médias das variáveis tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento e índice de placa segundo o nível de inserção.	28
Tabela 05 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para IL-6	29
Tabela 06 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para OPG	29
Tabela 07 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para TaqI	30
Tabela 08 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para FokI	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D₃ – 1,25-dihidroxicolecalciferol

μl – microlitro

AAP – Academia Americana de Periodontologia

AGEs – produtos finais de glicação avançada

CEP-UFPE – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco

DCV – doença cardiovascular

DM – Diabetes Mellitus

DP – doença periodontal

HbA1c – hemoglobina glicada

IC – intervalo de confiança

IDF – International Diabetes Federation

IL-6 – interleucina 6

IPV – índice de placa visível

mm - milímetro

NIC – nível de inserção clínica

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPG – osteoprotegerina

OR – odds ratio

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PS – profundidade de sondagem

RANK – receptor ativador de NF- *K*b

RANK-L – RANK ligante

RFLP – técnica da restrição do fragmento

RG – recessão gengival

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

SS – sangramento à sondagem

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TNF – fator de necrose tumoral

VDR – receptor para vitamina D

SUMÁRIO

1 PREÂMBULO	15
2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA E POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 6, OSTEOPROTEGERINA E RECEPTOR PARA VITAMINA D EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2	16
2.1 RESUMO	16
2.2 ABSTRACT	17
2.3 INTRODUÇÃO	18
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.4.1 Avaliação clínica	20
2.4.2 Obtenção das amostras e isolamento do DNA	21
2.4.3 Processamento através da técnica de PCR para IL-6	21
2.4.4 Processamento através da técnica de PCR para OPG	22
2.4.5 Processamento através da técnica de PCR para VDR (TaqI e FokI)	23
2.4.6 Análises estatísticas	24
2.5 RESULTADOS	26
2.6 DISCUSSÃO	31
2.7 AGRADECIMENTOS	36
3 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICES	43
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA	43
APÊNDICE B – FICHA PERIODONTAL	44
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	45
ANEXOS	47
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	47
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA	49

1 PREÂMBULO

Sabe-se que existem mecanismos que se inter-relacionam no decurso do diabetes mellitus e no desenvolvimento da doença periodontal. No entanto, pouco se elucidou sobre os efeitos dos polimorfismos genéticos nessa relação. Existem ainda muitos genes que precisam ser estudados e suas expressões gênicas precisam ser melhor entendidas. Diante de tudo isso, este trabalho teve como objetivo avaliar a condição periodontal de pacientes diabéticos tipo 2; detectar alguns polimorfismos genéticos da interleucina 6, da osteoprotegerina e do receptor para vitamina D e verificar se existe associação entre a presença destes polimorfismos e a profundidade de sondagem em pacientes portadores de periodontite crônica e diabetes mellitus tipo 2.

2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA E POLIMORFISMOS DE INTERLEUCINA 6, OSTEOPROTEGERINA E RECEPTOR PARA VITAMINA D EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2

2.1 RESUMO

Objetivos: Avaliar a condição periodontal de pacientes diabéticos tipo 2; detectar polimorfismos genéticos da interleucina 6 (IL-6) na posição -174, da osteoprotegerina (OPG) na posição -950 e do receptor para vitamina D (VDR) nas posições TaqI e FokI e verificar se existe associação entre a presença destes polimorfismos e a profundidade de sondagem em pacientes portadores de periodontite crônica e diabetes mellitus tipo 2. **Materiais e Métodos:** Sessenta e dois pacientes, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a trinta e cinco anos, diabéticos tipo 2, com no mínimo oito dentes presentes na boca e diagnóstico de periodontite crônica participaram do estudo. Os pacientes foram examinados clinicamente e quanto ao nível de glicemia e hemoglobina glicada. Também foi coletada saliva para análise dos polimorfismos de IL-6 na posição -174, OPG na posição -950 e VDR nas posições TaqI e FokI através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para análise estatística, os testes Exato de Fisher e de Mann Whitney foram utilizados, adotando nível de significância de 5%. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa na profundidade de sondagem em relação aos genótipos de IL-6, OPG e FokI; no entanto foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação entre a profundidade de sondagem média e os genótipos de TaqI. **Conclusões:** A profundidade de sondagem está associada à glicemia em jejum. Os polimorfismos de IL-6, OPG e FokI não estão associados à profundidade de sondagem, entretanto os genótipos de TaqI (TT) podem estar associados à profundidade de sondagem.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Periodontite. Polimorfismo Genético.

2.2 ABSTRACT

Aims: to evaluate the periodontal condition of patients with type 2 diabetes, to detect genetic polymorphisms of interleukin 6 (IL-6) in -174 position, of osteoprotegerin (OPG) in -950 position and of vitamin D receptor (VDR) in TaqI and FokI positions and to investigate the association between the presence of these polymorphisms and the probe depth in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. **Methods:** Sixty-two patients, of both sexes, with age equal or higher than thirty-five years, type 2 diabetics, with a minimum of eight teeth in the mouth and diagnosis of chronic periodontitis participated in the study. The patients were examined clinically and in the levels of glycemia and glicated hemoglobin. Also saliva was collected for analysis of polymorphisms of IL-6 in -174 position, of OPG in -950 position and of VDR in TaqI and FokI positions by polymerase chain reaction (PCR). For statistical analysis, Fisher's Exact test and Mann Whitney test were used, adopting a significance level of 5%. **Results:** There was no statistically significant difference in probing depth in relation to IL-6, OPG and FokI genotypes; however there was a statistically significant difference when comparing the average probing depth and TaqI genotypes. **Conclusions:** The probe depth is associated with glycemia. The polymorphisms of IL-6, OPG and FokI are not associated with probe depth, however TaqI genotypes (TT) may be associated with probe depth.

Keywords: Diabetes Mellitus. Periodontitis. Genetic Polymorphism.

2.3 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas que apresenta em comum a hiperglicemia (altos índices de glicose no sangue), como resultado de defeitos na ação e/ou na secreção de insulina. É representado por um grupo de desordens associadas com anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e acompanhadas de complicações renais, oftalmológicas, neurológicas, bucais, além do risco aumentado de doença cardiovascular (DCV) [1]. No Brasil, estima-se que 8,68% da população na faixa etária de 20 a 79 anos sejam portadores dessa enfermidade sistêmica [2].

A doença periodontal (DP) é uma doença infecciosa e inflamatória, caracterizada pela cascata de eventos celulares e bioquímicos, que conduzem finalmente à destruição do ligamento periodontal e à reabsorção óssea alveolar [3]. Os dados epidemiológicos estimam que cerca de 10 a 15% da população desenvolvem formas severas da doença [4, 5], enquanto que as formas moderadas ocorrem em 40% [4].

A doença periodontal é considerada a sexta complicação mais comum do diabetes [6]. Vários estudos foram realizados tentando desvendar os mecanismos que se inter-relacionam no decurso do diabetes mellitus e no desenvolvimento da doença periodontal. A prevalência e severidade da doença periodontal em indivíduos diabéticos têm se mostrado mais elevada do que na população em geral [7, 8].

O diabetes tipo 2 e condições relacionadas como a obesidade são associados a alterações fisiológicas, nutricionais e metabólicas, incluindo hiperglicemia, liberação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e hiperlipidemia. Essas alterações promovem uma série de consequências incluindo desregulação do sistema imune manifestado por um estado inflamatório de longa duração e limitação na resposta imune [9]. Estudos sugerem que a resposta imune alterada, a defesa do hospedeiro prejudicada e aumento da susceptibilidade à infecção em pacientes diabéticos podem ser responsáveis pelo risco aumentado de doença periodontal em diabéticos [10].

Além do DM, outros fatores também podem ter um papel importante na etiologia da DP, provocando alterações na resposta do hospedeiro, por exemplo, os polimorfismos genéticos. Polimorfismos genéticos são formas alélicas de um locus específico do cromossomo, que coexistem naturalmente na população humana, sendo, portanto, variações

normais. Os polimorfismos surgem como resultado de mutações, inserções ou deleções de bases nucleotídicas, podendo resultar em uma proteína não funcional ou influenciar a expressão gênica da referida proteína. Muito tem se estudado atualmente sobre os polimorfismos e sua relação com as mais diversas doenças [11].

As citocinas (como a interleucina 6 – IL-6) são glicoproteínas solúveis e biologicamente ativas secretadas por células imuno-inflamatórias do hospedeiro e que mediam a destruição periodontal em resposta a microbiota e seus produtos [12, 13]. Existem evidências que os genótipos para *IL-6-174* estão associados com doenças periodontais [14].

A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína semelhante aos membros da família de receptor para fator de necrose tumoral (TNF) [15] e as pesquisas sugerem que alterações nos níveis de OPG e do receptor ativador de NF- κ B (RANK) estão associadas à remodelação óssea, onde ocorre a diminuição de OPG e aumento da quantidade de RANK ligante (RANK-L), promovendo a atividade osteoclástica. [16, 17]. Tem-se estudado a presença de polimorfismos na região T950C do gene da OPG [18].

A ativação do receptor de vitamina D (VDR) pelo hormônio biologicamente ativo 1,25-dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) promove a diferenciação dos osteoblastos resultando em maturação da matriz e mineralização [19]. Dessa forma o VDR está envolvido em vários processos biológicos, como o metabolismo ósseo e a modulação da resposta imune. Estudos identificaram polimorfismos no VDR nas posições TaqI, ApaI, BsmI e FokI [20, 21].

Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre a profundidade de sondagem de pacientes portadores de periodontite crônica e Diabetes Mellitus tipo 2 e a presença de polimorfismos celulares (IL-6, OPG e VDR), através de um estudo tipo série de casos.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo série de casos, no período de julho de 2014 a novembro de 2014, no ambulatório de endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães, localizado na cidade do Recife, estado de Pernambuco, situado na região Nordeste do Brasil. Um total de 62 pacientes de ambos os sexos, diabéticos tipo 2 e com doença periodontal crônica participaram da pesquisa. Foram incluídos no trabalho pacientes com diagnóstico de DM tipo 2 (hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$); idade igual ou superior a 35 anos; com no mínimo oito dentes presentes, excluindo-se os terceiros molares e dentes indicados para exodontia; com diagnóstico clínico da presença de periodontite crônica, segundo a Academia Americana de Periodontologia (AAP) em 1999 [22] e que aceitaram participar do estudo. Pacientes que haviam realizado tratamento periodontal ou fizeram uso de antibióticos nos seis meses anteriores à avaliação, que utilizavam anti-inflamatórios de forma crônica, gestantes, fumantes ou que apresentavam condição sistêmica que pudesse interferir no curso da doença periodontal (condições imunológicas) foram excluídos do estudo. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CAAE 29058714.6.0000.5208.

2.4.1 Avaliação Clínica

Todos os pacientes foram avaliados por um pesquisador previamente calibrado utilizando uma sonda periodontal milimetrada do tipo Carolina do Norte (Trinity®, São Paulo, Brasil). Todos os dentes foram examinados em seis sítios por dente (mésio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, médio-lingual e mésio-lingual). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa visível (IPV); recessão gengival (RG); profundidade de sondagem (PS); sangramento à sondagem (SS) e nível de inserção clínica (NIC).

Os dados sobre o nível de glicemia e hemoglobina glicada (HbA1c) foram coletados do prontuário do paciente no mesmo momento do exame clínico. Foram considerados resultados de exames realizados até três meses antes do exame periodontal.

2.4.2 Obtenção das amostras e isolamento do DNA

No momento da avaliação, procedeu-se à coleta de saliva em tubo para microcentrífuga (*eppendorf*), que foram armazenados a -20°C para posterior isolamento e análise do DNA.

O DNA foi isolado de amostras de saliva dos participantes, utilizando-se o Kit QIAamp DNA Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Após o isolamento o DNA foi mantido a -20°C até o processamento da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.4.3 Processamento através da técnica de PCR para IL-6

Para detecção do polimorfismo de IL-6 na posição -174 (G→C) os seguintes primers foram utilizados para amplificar um fragmento contendo 300 pares de bases (pb) no local -174: forward 5'- TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG-3', e reverse 5'-TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA-3'.

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes GoTaq® Green Master Mix (Madison, WI, EUA) com o seguinte protocolo de reação: 4.4µl de água, 0.3µl de primer forward, 0.3µl de primer reverse, 5.0µl de Master Mix e 2.0µl de DNA da amostra, sendo 12.0µl 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.

O termociclador (Biocycler) foi programado da seguinte maneira: 1 – desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 2 – 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 54 segundos, extensão a 57° C por 30 segundos e anelamento a 72° C por 10 segundos; 3 – anelamento final a 72° C por 10 minutos.

Após este procedimento uma alíquota de 4.0µl do produto da PCR foi digerida a 37°C, *overnight*, utilizando a enzima de digestão HSP92II PROMEGA (Madison, WI, EUA), em um volume total de 10.0µl.

Em seguida, 10.0µl do produto da PCR digerido foi adicionado a 6.0µl do corante fluorescente GelRed™ Biotium (Califórnia, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100pb ladder (LGC Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese.

Os alelos que resultam da clivagem pela HSP92II foram designados “G” (presença de dois fragmentos de 233pb e 56pb) ou “C” (presença de quatro fragmentos de 123pb, 111pb, 56pb e 12pb).

2.4.4 Processamento através da técnica de PCR para OPG

Para a amplificação da região promotora (posição -950) do gene OPG [23] foi utilizado o seguinte par de primer, para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): sequência forward 5′-CCC AGG GGA CAG ACA CCA C-3′ e reverse 5′-GCG CGC AGC ACA GCA ACT T-3′ como descrito por Baioni e colaboradores (2008) [24].

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes GoTaq® Green Master Mix (Madison, WI, EUA) com o seguinte protocolo de reação: 4.0µl de água, 0.5µl de primer forward, 0.5µl de primer reverse, 5.0µl de Master Mix e 2.0µl de DNA da amostra, sendo 12.0µl 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.

O termociclador (Biocycler) foi programado da seguinte maneira: 1ª fase – “hot start” (95° C por 5 minutos); 2ª fase – dividida em três etapas e realizada por 35 ciclos – 1) desnaturação do DNA alvo por aquecimento (95°C por 1 minuto), 2) anelamento do *primer* (57°C por 1 minuto), 3) extensão (72° C por 1 minuto); e 3ª fase – extensão final (72° C por 7 minutos).

Para a análise do polimorfismo pela técnica da restrição do fragmento (RFLP), 4.0µl do produto de amplificação foi submetido à digestão enzimática (*Overnight* a 37° C) com a enzima de restrição HincII New EnglandBioLabs (Ipswich, MA, EUA) em um volume total de 10.0µl.

Após essa etapa, 10.0µl dos produtos da PCR foram adicionados a 6.0µl do corante fluorescente GelRed™ Biotium (Califórnia, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100pb ladder (LGC Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese.

O RFLP é formado por uma base única de transição (T/C) do gene de OPG que cria um sítio de restrição para HincII. Os alelos que resultam da clivagem pela HincII são designados “C” (presença de sítio HincII e de dois fragmentos de 248pb e 83pb) ou “T” (ausência de sítio HincII, com um fragmento de 331pb) [24].

2.4.5 Processamento através da técnica de PCR para VDR (TaqI e FokI)

Para amplificação de um fragmento de 340pb do polimorfismo TaqI do gene VDR foram utilizados os seguintes primers, para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): forward 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3' e reverse 5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC-3' [25].

Para amplificação de um fragmento de 265pb do polimorfismo FokI do gene VDR foram utilizados os seguintes primers: forward 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGG CTC-3' e reverse 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3' [26].

Tanto para as reações de PCR para TaqI quanto para as de FokI foi utilizado o conjunto de reagentes GoTaq® Green Master Mix (Madison, WI, EUA) com o seguinte protocolo de reação: 4.0µl de água, 0.5µl de primer forward, 0.5µl de primer reverse, 5.0µl de Master Mix e 2.0µl de DNA da amostra, sendo 12.0µl 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.

O termociclador (Biocycler) foi programado para TaqI e para FokI da seguinte forma: 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C; seguidos por extensão final de 5 minutos a 72°C [27].

Procedeu-se então à análise do polimorfismo pela técnica da restrição do fragmento (RFLP). Para TaqI utilizou-se a enzima de restrição TaqI PROMEGA (Madison, WI, EUA)

com 4.0µl do produto da PCR, perfazendo um volume total de 10.0µl e então o produto foi submetido à digestão enzimática durante 4 horas a 65°C. Já para FokI, 4.0µl do produto da PCR foi submetido à digestão enzimática durante 4 horas a 37°C, utilizando a enzima de restrição FokI New England BioLabs (Ipswich, MA, EUA) em um volume total de 10.0µl [27].

Após a digestão, 10.0µl do produto de PCR digerido (de TaqI ou FokI) foram adicionados a 6.0µl do corante fluorescente GelRed™ Biotium (Califórnia, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100pb ladder (LGC Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese.

Os genótipos encontrados para TaqI foram: homozigoto TT quando apresentou ausência do sítio TaqI com a presença de banda de 340pb; homozigoto tt quando da presença de sítio TaqI e dois fragmentos de 293pb e 47pb e no caso de heterozigose Tt, todos os três fragmentos (340pb, 293pb e 47pb) foram exibidos. Os genótipos encontrados para FokI foram: homozigoto FF quando da ausência do sítio FokI com uma banda não-digerida de 265pb; homozigoto ff apresentou sítio FokI com completa digestão entre as bandas 169pb e 96pb e no caso de heterozigose Ff, todas as três bandas (265pb, 169pb e 96pb) foram exibidas [28].

2.4.6 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando o software SPSS versão 20 para Windows. O teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar frequências dos genótipos (GG, GC e CC) e alelos (G e C) para os genes IL-6, comparar as frequências dos genótipos (TT TC e CC) e alelos (T e C) para os genes OPG, comparar as frequências dos genótipos (TT. Tt e tt) e alelos (T e t) para os genes TaqI e também comparar as frequências dos genótipos (FF. Ff e ff) e alelos (F e f) para os genes FokI com os valores médios de profundidade de sondagem. O odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados em relação à profundidade de sondagem. O nível de significância adotado foi de 5% (p-valor < 0,05). As comparações entre tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento (%) e índice de placa (%) com a profundidade de sondagem e nível de inserção clínica foram

feitas pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, pois os dados da amostra não seguem uma distribuição normal. Os dados foram expressos em valores absolutos, relativos e em média \pm desvio-padrão.

2.5 RESULTADOS

Sessenta e dois pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite crônica tinham idade média de $56,7 \pm 9,7$ anos dos quais 64,5% eram do sexo masculino, onde 6,5% tinham menos de 40 anos, 59,7% com idade acima de 50 anos, a profundidade de sondagem média foi de $3,1 \pm 0,7$ e o nível de inserção com média de $4,0 \pm 1,1$, como mostra a tabela 01.

Tabela 01 –Descrição das variáveis.

Variáveis	n	%	Média ± Dp
Sexo			
Masculino	40	64,5	
Feminino	22	35,5	
Idade			
35-40 anos	4	6,5	$56,7 \pm 9,7$
41-50 anos	15	24,2	
51-60 anos	21	33,9	
61-70 anos	16	25,8	
+ 71 anos	6	9,7	
Hábito de Fumar			
Não fuma	39	62,9	
Ex-fumante	23	37,1	
Profundidade de Sondagem			
PS < 4	33	53,2	$3,1 \pm 0,7$
PS ≥ 4	29	46,8	
NIC			
Moderada (3-4mm)	37	59,7	$4,0 \pm 1,1$
Grave (≥5mm)	15	24,2	

O tempo médio de diabetes foi de $10,9 \pm 8,4$ anos, a glicemia em jejum teve média de $175,9 \pm 65,6$ e HbA1C apresentou média de $8,7 \pm 2,0$, o índice de sangramento (%) teve média de $43,9 \pm 27,4$ e o índice de placa (%) apresentou média de $33,8 \pm 28,7$.

Os genótipos GG, GC e CC de IL-6 apresentaram frequência de 50,0%, 30,6% e 19,4%, respectivamente. Os genótipos TT, TC e CC de OPG apresentaram frequência de 50,0%, 35,5% e 14,5%, respectivamente. Os genótipos TT, Tt e tt de TaqI apresentaram frequência de 16,1%, 80,6% e 3,2%, respectivamente. Os genótipos FF, Ff e ff de FokI apresentaram frequência de 50,0%, 38,7% e 11,3%, respectivamente. Em relação aos alelos, o alelo G de IL-6 foi encontrado em 65,3%; o alelo T de OPG estava presente em 67,7%; o

alelo T de TaqI foi encontrado em 56,5%; por fim o alelo F de FokI estava presente em 69,4%, conforme tabela 02.

Tabela 02 – Frequência dos Genótipos e Alelos dos Genes IL-6, OPG, TaqI e FokI

Variável		N	%
IL-6			
Genótipo (n=62)	GG	31	50,0
	GC	19	30,6
	CC	12	19,4
Alelos (n=124)	G	81	65,3
	C	43	34,7
OPG			
Genótipo (n=62)	TT	31	50,0
	TC	22	35,5
	CC	9	14,5
Alelos (n=124)	T	84	67,7
	C	40	32,3
TaqI			
Genótipo (n=62)	TT	10	16,1
	Tt	50	80,6
	tt	2	3,2
Alelos (n=124)	T	70	56,5
	t	54	43,5
FokI			
Genótipo (n=62)	FF	31	50,0
	Ff	24	38,7
	ff	7	11,3
Alelos (n=124)	F	86	69,4
	f	38	30,6

A profundidade de sondagem teve associação estatisticamente significativa com as variáveis: glicemia em jejum (0,012), índice de sangramento ($p=0,000$), índice de placa ($p=0,000$) e NIC ($p=0,000$). As variáveis tempo de diabetes ($p=0,893$) e HbA1C ($p=0,142$) não tiveram associação estatisticamente significativa com a profundidade de sondagem, de acordo com tabela 03.

Tabela 03 - Comparação entre as médias das variáveis tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento, índice de placa e NIC segundo a profundidade de sondagem.

Variável	Profundidade Sondagem	Média ± Dp	p-valor ¹
Tempo de Diabetes	PS <4	10,8 ± 8,4	0,893
	PS ≥ 4	11,1 ± 8,5	
Glicemia em jejum	PS <4	156,2 ± 51,8	0,012*
	PS ≥ 4	198,4 ± 72,9	
HbA1C	PS <4	8,4 ± 1,9	0,142
	PS ≥ 4	9,0 ± 2,1	
Índice Sangramento (%)	PS <4	28,5 ± 23,6	0,000*
	PS ≥ 4	61,5 ± 20,1	
Índice Placa (%)	PS <4	19,6 ± 22,8	0,000*
	PS ≥ 4	49,9 ± 26,3	
NIC	PS <4	3,4 ± 0,6	0,000*
	PS ≥ 4	4,8 ± 1,1	

Dp=Desvio-padrão; * Estatisticamente significante; 1-Teste de Mann Whitney

O nível de inserção não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as médias das variáveis: tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento e índice de placa, conforme tabela 04.

Tabela 04 - Comparação entre as médias das variáveis tempo de diabetes, glicemia em jejum, HbA1C, índice de sangramento e índice de placa segundo o nível de inserção.

Variável	NIC	Média ± Dp	p-valor ¹
Tempo de Diabetes	Moderada	9,3 ± 7,5	0,372
	Grave	11,6 ± 8,9	
Glicemia em jejum	Moderada	180,3 ± 70,6	0,848
	Grave	171,0 ± 63,3	
HbA1C	Moderada	8,7 ± 2,3	0,620
	Grave	8,2 ± 1,0	
Índice Sangramento (%)	Moderada	42,4 ± 28,9	0,166
	Grave	53,4 ± 25,5	
Índice Placa (%)	Moderada	30,0 ± 26,8	0,072
	Grave	47,9 ± 33,5	

Dp=Desvio-padrão; * Estatisticamente significante; 1-Teste de Mann Whitney

Não foi encontrada diferença estatisticamente significante na comparação entre a profundidade de sondagem e o genótipo e alelos para IL-6 em relação ao genótipo de

referência ($p=0,421$) para o genótipo GC, ($p=0,742$) para os genótipos CC, ($p=0,884$) para o alelo C, como mostra a tabela 05.

Tabela 05 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para IL-6

IL-6	PS <4 (n=33)	PS ≥ 4 (n=29)	OR	IC 95%	P valor ¹
Genótipos					
GG	18	13	1	referência	
GC	8	11	1,90	0,60-6,05	0,421
CC	7	5	0,99	0,26-3,82	0,742
Alelos					
G	44	37			
C	22	21	1,14	0,54-2,38	0,884

OR=Razão de Chances;* Estatisticamente significante; 1-Teste Exato de Fisher

De acordo com a tabela 06, não foi encontrada diferença estatisticamente significante na comparação entre a profundidade de sondagem e o genótipo e alelos para OPG em relação ao genótipo de referência ($p=0,693$) para o genótipo TC, ($p=0,803$) para o genótipo CC, ($p=0,936$) para o alelo C.

Tabela 06 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para OPG

OPG	PS < 4 (n=33)	PS ≥ 4 (n=29)	OR	IC 95%	P valor ¹
Genótipos					
TT	17	14	1	referência	
TC	10	12	1,46	0,49-4,37	0,693
CC	6	3	0,60	0,13-2,88	0,803
Alelos					
T	44	40			
C	22	18	0,90	0,42-1,92	0,936

OR=Razão de Chances;* Estatisticamente significante; 1-Teste Exato de Fisher

Foi encontrada diferença estatisticamente significante na comparação entre a profundidade de sondagem média e o genótipo e alelos para TaqI em relação ao genótipo de referência (**$p=0,011$**) para os genótipos Tt, ou seja o genótipo de referência TT tem 13,5 vezes mais chances de ter profundidade de sondagem igual ou maior que 4mm em relação ao

genótipo Tt, não foi possível calcular a OR para os genótipos tt e ($p=0,084$) para o alelo t não encontrando diferenças estatisticamente significantes em os alelos, conforme tabela 07.

Tabela 07 – Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para TaqI

TaqI	PS < 4 (n=33)	PS ≥ 4 (n=29)	OR	IC 95%	P valor ¹
Genótipos	EHW = 0,5533		EHW = 0,0056		
TT	1	9	1	referência	
Tt	30	20	13,50	1,59-114,98	0,011*
tt	2	0	-	-	0,073
Alelos					
T	32	38			
t	34	20	2,01	0,98-4,17	0,084

OR=Razão de Chances;* Estatisticamente significativa; 1-Teste Exato de Fisher

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação entre o resultado da profundidade de sondagem e o genótipo e alelos para FokI em relação ao genótipo de referência ($p=0,645$) para o genótipo Ff, ($p=1,000$) para o genótipo ff, ($p=0,619$) para o alelo f, como mostra a tabela 08.

Tabela 08– Avaliação da profundidade de sondagem segundo o genótipo e o tipo de alelo para FokI

FokI	PS < 4 (n=33)	PS ≥ 4 (n=29)	OR	IC 95%	P valor ¹
Genótipos					
FF	15	16	1	referência	
Ff	14	10	0,67	0,23-1,96	0,645
ff	4	3	0,70	0,13-3,68	1,000
Alelos					
F	44	42			
f	22	16	0,76	0,35-1,65	0,619

OR=Razão de Chances;* Estatisticamente significativa; 1-Teste Exato de Fisher

2.6 DISCUSSÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês International Diabetes Federation) consideram o diabetes mellitus uma epidemia global, que atinge uma em cada 12 pessoas no mundo e se estima que até o ano de 2035 cerca de 205 milhões de novos casos ocorrerão [2].

A inter-relação entre diabetes e doença periodontal provê um exemplo de doença sistêmica que predispõe os indivíduos a infecção bucal e uma vez que a infecção se instala exacerba a doença sistêmica [29]. Muito se tem discutido na literatura acerca dessa relação bidirecional entre o diabetes mellitus e a doença periodontal. Os estudos demonstram que o controle glicêmico é uma importante variável nessa relação. Indivíduos com pobre controle glicêmico têm maior prevalência e severidade da doença periodontal [8, 30, 31, 32].

Assim como os estudos citados, o presente estudo encontrou associação estatisticamente significativa da glicemia em jejum com a profundidade de sondagem. No entanto, não houve associação entre o tempo de diabetes e hemoglobina glicada com a profundidade de sondagem. Esse resultado para hemoglobina glicada está de acordo com o resultado obtido em estudo realizado por Bello *et al.* (2011) [33] com 92 pacientes diabéticos, com ou sem doença periodontal, utilizando critérios de inclusão e exclusão muito próximos aos usados neste trabalho. Bello *et al.* (2011) [33] não encontraram diferença estatisticamente significativa quando foi avaliada a presença da periodontite em pacientes que apresentavam níveis de hemoglobina glicada altos.

Vários estudos investigaram a relação entre doença periodontal e polimorfismos de IL-6. Ficou demonstrado que existe associação entre as variantes genéticas de *IL-6* e detecção subgingival de bactérias periodontopatógenas em periodontite [34] e em indivíduos periodontalmente saudáveis [35]. Em estudo de Teixeira *et al.* (2014) [36] foi investigada a associação entre o polimorfismo de IL-6 na posição -174 e a periodontite em indivíduos brasileiros. Trezentos e trinta pacientes foram analisados, sendo 134 casos e 196 controles e o polimorfismo de IL-6 estava associado com periodontite quando comparada a distribuição dos genótipos entre os pacientes com periodontite e os indivíduos saudáveis. O genótipo GC aparentou ser um fator de proteção para periodontite. Em estudo realizado com indianos foi encontrada uma prevalência aumentada do genótipo GG de IL-6 em indivíduos não-fumantes e com periodontite, sugerindo que pacientes portadores do genótipo GG possam ser mais

propensos a desenvolver periodontite [3]. Outro estudo realizado com brasileiros também demonstrou que o genótipo GG estava associado estatisticamente a suscetibilidade à periodontite crônica. É possível que o alelo C represente uma função protetiva, cuja presença reduz a produção de IL-6 [37]. Entretanto o presente estudo não encontrou associação estatisticamente significativa entre doença periodontal e genótipos ou alelos de IL-6.

Uma revisão de literatura reportou que três de seis estudos com caucasianos e um dentre dois estudos com brasileiros mostraram correlação do polimorfismo de IL-6 com a suscetibilidade à periodontite crônica [38]. Uma metanálise realizada por Song e colaboradores (2013) [39] procurou evidências de associação entre polimorfismos e doença periodontal em diferentes populações. Esse estudo demonstrou que o polimorfismo de IL-6-174 pode estar associado à periodontite em brasileiros

No entanto outra revisão sistemática avaliou seis estudos do tipo caso-controle envolvendo 1093 casos de periodontite e 574 controles e observou-se que o alelo de IL-6-174 não está associado ao maior risco para periodontite crônica, mas está associado ao maior risco de periodontite agressiva [14].

Para a população de diabéticos tipo 2 não há estudos que verificaram a interação dos genótipos para polimorfismos conhecidamente influentes na doença periodontal. No entanto um estudo conduzido com diabéticos tipo 1 demonstrou que o genótipo IL-6-174 se constitui em um fator de suscetibilidade para doença periodontal em pacientes com diabetes tipo 1, onde o genótipo GG se mostrou ser um forte fator de susceptibilidade [40]. No entanto, o presente estudo não encontrou associação entre profundidade de sondagem e os genótipos e alelos de IL-6 em pacientes diabéticos tipo 2.

Como ficou demonstrado os resultados apresentados na literatura são bastante conflitantes e não há material suficiente publicado para sanar todas as dúvidas. Essas diferenças podem ser causadas também pelo tamanho das populações utilizadas nos estudos, grupos étnicos, diferenças nos critérios de diagnóstico para doença periodontal, entre outros fatores.

Quanto à análise dos polimorfismos de OPG na região T950C em um estudo do tipo caso-controle realizado com 67 participantes, sendo 32 com diagnóstico de diabetes tipo 2 a no mínimo 5 anos e periodontite (grupo teste) e 35 indivíduos saudáveis sem diabetes ou doença periodontal (grupo controle), onde foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos:

profundidade de sondagem, sangramento a sondagem e nível de inserção clínica não foi encontrada nenhuma influência clínica em relação à presença de polimorfismo na região T950C do gene de OPG no grupo teste [18].

Uma pesquisa realizada com 77 pacientes iranianos com periodontite crônica, 40 pacientes com peri-implantite e 89 pacientes saudáveis periodontalmente avaliou o polimorfismo T950C de OPG e não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos [41]. Já Baioni *et al.* (2008) [24] encontrou maior porcentagem do genótipo TT no grupo de pacientes com doença periodontal em relação ao grupo saudável e o alelo T foi o mais frequente, no entanto não houve relevância estatisticamente significativa. Esse estudo foi realizado em pacientes brasileiros com doença crônica dos rins. Os resultados do presente trabalho estão em conformidade com os outros estudos publicados, onde não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e alelos para OPG e a condição periodontal.

A vitamina D tem seu papel no metabolismo ósseo. Como a reabsorção óssea alveolar é uma característica importante da doença periodontal, é plausível que os mediadores do metabolismo ósseo como o receptor da vitamina D e seus polimorfismos tenham alguma relação com a suscetibilidade à doença periodontal. Além de mediar a homeostase óssea, a vitamina D e seu receptor também participa da fagocitose pelos monócitos e afeta a diferenciação dos monócitos [42].

Os polimorfismos do VDR têm sido relacionados à ocorrência de tuberculose e infecções crônicas causadas pelo vírus da hepatite B [43]. Isso pode indicar uma estreita relação entre os polimorfismos do VDR e ação imunológica, pois a forma ativa da vitamina D é responsável pela ativação de monócitos, estímulo de células mediadoras da imunidade e supressão da proliferação dos linfócitos [44].

Os mecanismos pelos quais os polimorfismos do VDR influenciam a periodontite crônica ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que os polimorfismos TaqI, BsmI e ApaI não modificam a proteína traduzida, enquanto que o polimorfismo FokI pode funcionar criando um códon de iniciação adicional (ACG para ATG). O SNP para TaqI pode estar associado a suscetibilidade à doença periodontal tanto como um polimorfismo único como combinado com outros polimorfismos do VDR [38, 45].

Um estudo do tipo caso-controle realizado com 168 japoneses, sendo 94 do grupo controle e 74 do grupo com doença periodontal, incluindo pacientes fumantes e diabéticos em ambos os grupos demonstrou que o genótipo TT de TaqI, bem como o alelo T teve associação estatisticamente significativa com periodontite crônica, independente do tabagismo ou diabetes. Curiosamente, o genótipo tt não foi encontrado em nenhum dos 168 indivíduos analisados. O mesmo genótipo TT foi associado em outras pesquisas à ocorrência de tuberculose ou hepatite crônica. Isso sugere que o genótipo TT e o alelo T podem aumentar a suscetibilidade não somente à doença periodontal, tuberculose e hepatite B, mas também a outras doenças infecciosas, logo se faz necessário investigar a associação dos polimorfismos do VDR também para outras doenças infecciosas [43, 44].

Os resultados encontrados no presente estudo foram semelhantes aos do estudo com japoneses [44], onde foi encontrada associação entre a profundidade de sondagem média e o genótipo TT, onde TT tem 13,5 vezes mais chances de ter profundidade de sondagem igual ou maior que 4mm em relação ao genótipo Tt, porém não foi possível observar se ocorreu associação com o genótipo tt e o alelo t não demonstrou associação significativa.

Porém, diferentemente do presente estudo e do estudo com japoneses, outro estudo realizado com 113 brasileiros demonstrou que indivíduos com qualquer forma do alelo t (Tt ou tt) possuíam 2,4 vezes mais suscetibilidade à doença periodontal e que o genótipo heterozigoto (Tt) estava presente em 59,4% do grupo de doença periodontal [20]. Outra pesquisa também reportou que a presença do alelo t de TaqI aumentou significativamente o risco de desenvolver periodontite agressiva, no entanto o genótipo não afetou a incidência de todos os casos analisados de periodontite agressiva [46]. A falta de concordância entre os resultados obtidos no presente estudo e os já citados pode se dever a vários fatores como diferenças populacionais, haja vista a grande heterogeneidade da população brasileira, a impossibilidade de estabelecer associação com genótipo tt, o tipo diferente de doença (periodontite crônica ou agressiva) ou até mesmo a diferença nos critérios diagnósticos utilizados.

Em relação a FokI do VDR, em uma pesquisa realizada com 97 homens japoneses foi encontrado o genótipo Ff como mais frequente, porém no presente estudo o genótipo mais frequente foi FF. No mesmo estudo com japoneses a presença do alelo f se mostrou um fator de risco para desenvolver periodontite crônica severa. Dessa forma os pacientes FF tinham

menor chance de desenvolver a doença que os pacientes com genótipo Ff e estes uma chance menor que os indivíduos com genótipo ff [21].

Apesar das diferenças de resultados do presente estudo com o estudo anterior, outras pesquisas, assim como esta também não encontraram associação dos genótipos ou alelos de FokI com a periodontite crônica [44, 47]. Novamente, as diferenças de tamanho de amostra, grupos étnicos ou critérios diagnósticos podem ter influenciado na diversidade dos achados.

Durante a realização da pesquisa, uma das maiores dificuldades encontradas para se obter a amostra foi a ausência do número mínimo de dentes dos pacientes, sendo o principal motivo da exclusão.

Por se tratar de um estudo de série de casos, o próprio tipo de estudo apresenta determinadas limitações como ausência de um grupo controle e o levantamento de hipóteses de relações causais, que não podem ser testadas, pois tanto a exposição quanto as doenças são medidas no mesmo ponto do tempo. Apenas indica a possibilidade de existência de determinadas associações da doença ou condições que podem causar prejuízos à saúde, com as características temporais, espaciais ou pessoais, levando os pesquisadores a formularem hipóteses para novas investigações a ser realizadas [48].

É possível também que este trabalho não tenha encontrado relação de significância entre os polimorfismos e a condição periodontal devido ao número reduzido de pacientes investigados, pois grandes populações são o pré-requisito para superar qualquer viés devido à heterogeneidade de uma amostra [49].

Finalmente, outra dificuldade encontrada para comparar os resultados achados no presente estudo foi a falta de pesquisas voltadas para a investigação de doença periodontal e polimorfismos em pacientes diabéticos tipo 2. Há pouco material publicado que possa dar suporte a uma adequada comparação e por ser um grupo especial com uma complexa e singular inter-relação diabetes mellitus-doença periodontal é importante que mais estudos sejam realizados e publicados.

Através do presente estudo conclui-se que a profundidade de sondagem está associada à glicemia em jejum e que os polimorfismos de IL-6, OPG e FokI não estão associados à profundidade de sondagem, entretanto os genótipos de TaqI (TT) podem estar associados à profundidade de sondagem.

2.7 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

O material utilizado neste estudo foi cedido pelo Programa Nacional de Pós-doutorado – PNPd – da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados com o presente estudo.

3 CONCLUSÕES

Através do presente estudo conclui-se que a profundidade de sondagem está associada à glicemia em jejum e que os polimorfismos de IL-6, OPG e FokI não estão associados à profundidade de sondagem, entretanto os genótipos de TaqI (TT) podem estar associados à profundidade de sondagem.

REFERÊNCIAS

1. Bazotte RB. Paciente diabético: Cuidados Farmacêuticos. Rio de Janeiro: MedBook, 2010.
2. IDF. Diabetes Atlas, 6^a edição, atualização de 2014. Disponível em <http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf> Acesso em 05 de janeiro de 2015.
3. Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol* 2010;37:137-44. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2009.01501.x.
4. Maffei G, Brouwer N, Dolman KM, Van der Velden U, Roos D, Loos BG. Plasma levels of mannan-binding lectin in relation to periodontitis and smoking. *J Periodontol* 2005;76:1881-89.
5. Boutaga K, Van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006;33:427-33.
6. Løe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-34.
7. American Academy of Periodontology. Position Paper: Diabetes and periodontal Diseases. *J Periodontol* 2000;71:664-78.
8. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-303.
9. Kolb H, Mandrup-Poulsen T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 2010;53:10–20.
10. Cole CM, Sundararaj KP, Leite RS, Nareika A, Slate EH, Sanders JJ *et al.* A trend of increase in periodontal interleukin-6 expression across patients with neither diabetes nor periodontal disease, patients with periodontal disease alone, and patients with both diseases. *J Periodont Res* 2008;43(6):717–22. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01082.x.
11. 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* 2011;40(4):187-94.

12. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Dental Research* 2003;82:82–90.
13. Talbert J, Elter J, Jared HL, Offenbacher S, Southerland J, Wilder RS. The effect of periodontal therapy on TNFalpha, IL-6 and metabolic control in type 2 diabetics. *J Dent Hyg* 2006;80:7.
14. Shao MY, Huang P, Cheng R, Hu T. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*2009;10(12):920-7.
15. Golmia R, Scheinberg M. Atualização em osteoprotegerina. *Einstein* 2004;2(3):220.
16. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166–9.
17. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the OPG/ RANKL system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006;41(4):354–60.
18. Perez MMC; Lucena KCR, de Souza PRE, Cimões R, Leão JC, Carvalho AAT. Analysis of the polymorphism of osteoprotegerin by polymerase chain reaction in patients with type 2 diabetes and the association with periodontal condition RGO - *Rev Gaúcha Odontol* 2013;61(1):99-105.
19. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*1991;128(3):1496–1504.
20. de Brito Júnior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75(8):1090-5.
21. Naito M, Miyaki K, Naito T, Zhang L, Hoshi K, Hara A *et al.* Association between vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men. *Int J Med Sci* 2007; 4(4): 216–222.
22. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois. *Ann Periodontol* 1999; 4:j1-112.

23. Brändström H, Stiger H, Lind F, Kahan L, Melhus T, Kindmark A. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene of osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293(1):13-7.
24. Baioni CS, Souza CM, Ribeiro APB, Luczyszyn SM, Silva MAS, Ignácio AS *et al.* Analysis of the association of polymorphism in the osteoprotegerin gene with susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. *J Periodontal Res* 2008;43(5):578-84. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01098.x.
25. Carling T, Ridefelt P, Hellman P, rastad J, Akerström G. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1772–75.
26. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 1997;12(7):1043-8.
27. Acickbas I, Sanli B, Tepeli E, Ergin S, Aktan S, Bagci H. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes (ApaI, BsmI, FokI, TaqI) in Turkish psoriasis patients. *Med Sci Monit* 2012;18(11):661-6. DOI: 10.12659/MSM.883544.
28. Bhanushali AA, Laipal N, Kulkarni SS, Chavan SS, Bagadi SS, Das BR. Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. *Indian J Hum Genet* 2009;15(3): 108-113. DOI: 10.4103/0971-6866.60186.
29. Kiran M, Arpak N, Unsal E, Erdogan MF. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes *mellitus*. *J Clin Periodontol* 2005;32(3):266-72.
30. Almas K, Al-Qahtani M, Al-Yami M, Khan N. The relationship between periodontal disease and blood glucose level among type II diabetic patients. *JCDP* 2001;2(4):1-6.
31. Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis* 2008;14(3):191-203. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2008.01442.x.
32. Weidlich P, Cimões R, Pannuti CM, Oppermann RV. Association between periodontal diseases and systemic diseases. *Braz Oral Res* 2008;22(1):32-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242008000500006>.

33. Bello DMA, Araújo NC, Gusmão ES, Souza PRE, Donos N, Cimões R. Condição periodontal e marcadores do controle metabólico em pacientes diabéticos. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2011;11(3):357-61.
34. Nibali L, Tonetti MS, Ready DR, Parkar M, Brett PM, Donos N *et al.* Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in periodontitis patients. *J Periodontol.* 2008;79:677-83. DOI: 10.1902/jop.2008.070453.
35. Nibali L, O'Dea M, Bouma G, Parkar M, Thrasher AJ, Burns S *et al.* Genetic variants associated with neutrophil function in aggressive periodontitis and healthy controls. *J Periodontol* 2010;81(4):527-34. DOI: 10.1902/jop.2010.090543.
36. Teixeira FG, Mendonça SA, Oliveira KM, dos Santos DB, Marques LM, Amorim MM *et al.* Interleukin-6 c.-174G>C polymorphism and periodontitis in a Brazilian population. *Mol Biol Int* 2014; 490308. DOI: 10.1155/2014/490308.
37. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, de 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(5):438-42. DOI: 10.1034/j.1600-051X.2003.20016.x.
38. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent* 2010;324719. DOI: 10.1155/2010/324719.
39. Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Association between tumor necrosis factor- α promoter -308 A/G, -238 A/G, interleukin-6 -174 G/C and -572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(8):5191-203. DOI: 10.1007/s11033-013-2621-4.
40. Raunio T, Knuutila M, Hiltunen L, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T. IL-6(-174) genotype associated with the extent of periodontal disease in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2009;36(1):11-7. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2008.01344.x.
41. Kadkhodazadeh M, Tabari ZA, Ardakani MR, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* 2012;5(4):381-8.

42. Selvaraj P, Chandra G, Jawahar MS, Rani MV, Rajeshwari DN, Narayanan PR. Regulatory role of vitamin D receptor gene variants of BsmI, ApaI, TaqI, and FokI polymorphisms on macrophage phagocytosis and lymphoproliferative response to Mycobacterium tuberculosis antigen in pulmonary tuberculosis. *J Clin Immunol* 2004;24(5):523-32.
43. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC *et al.* Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999;179(3):721-4.
44. Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara M, Ueda M *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sci* 2003;73(26):3313–21.
45. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11(12):1850-5.
46. Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70(9):1032-8. DOI: 10.1902/jop.1999.70.9.1032
47. Deng H, Liu F, Pan Y, Jin X, Wang H, Cao J. BsmI, TaqI, ApaI, and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor gene and periodontitis: a meta-analysis of 15 studies including 1338 cases and 1302 controls. *J Clin Periodontol* 2011;38(3):199–207 DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01685.x.
48. Marques AM, Peccin MS. Pesquisa em fisioterapia: a prática baseada em evidências e modelos de estudos. *Fisioter Pesq* 2005;11(1):43-48.
49. Schäfer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol* 2011;38(2):103-7. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01653.x.

APÊNDICES**APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA**

NOME: _____

SEXO: () Masculino () Feminino DATA: _____

IDADE: _____ PROFISSÃO: _____

ESTADO CIVIL: _____

FONE: _____ CEL: _____

RENDA (salários): _____

HÁBITO DE FUMAR:

 Nunca fumou Ex-fumante: _____ (anos que parou) Fumante: _____ (quantos por dia)

ESCOLARIDADE:

 Não sabe ler ou escrever 1º grau incompleto 1º grau completo 2º grau incompleto 2º grau completo Universidade incompleta Universidade completa Pós-graduação Não sei

DIABÉTICO HÁ QUANTO TEMPO: _____

MEDICAMENTOS QUE UTILIZA: _____

GLICEMIA EM JEJUM: _____

HbA1c: _____

NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D: _____

CALCEMIA: _____

APÊNDICE B – FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____ DATA: _____

Dente	Sondagem (mm)						Recessão Gengival (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: Faces _____ %

X X																	
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		
X X																	

PLACA: Faces _____ %

X X																	
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		
X X																	

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Avaliação da associação entre periodontite crônica, deficiência de vitamina D e polimorfismos em pacientes diabéticos tipo 2” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Raphaella Karlla Machado Gonzaga (Mestranda em Clínica Integrada na UFPE); Secretária de Pós-graduação em Odontologia da UFPE – Avenida Professor Moraes Rego, 1235 – Recife – PE, CEP: 50670-901; telefone: (81)3071-3415; e-mail: raphaellakmg@hotmail.com e está sob a orientação de: Renata Cimões Jovino Silveira (Professora de Clínica Integrada UFPE). Telefone para contato: 21268817. Também participam também desta pesquisa: Ladaha Linhares e Marcela Valença (alunas da graduação em odontologia da UFPE).

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a associação entre doenças da gengiva e a presença de alterações nas células e também os níveis de vitamina D em pacientes diabéticos tipo 2. Com esse fim será avaliado através de um exame clínico índice de placa, sangramento, profundidade de sondagem e perda de inserção; serão coletados, diretamente do prontuário do paciente, dados sobre o nível de glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c), nível sérico de vitamina D e calcemia e serão coletadas amostras da mucosa da boca para avaliação das alterações.

Para realização da pesquisa o paciente será examinado uma única vez; nesse momento serão também coletadas as amostras de mucosa da boca e os dados do prontuário do paciente.

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

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

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

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

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

(Pesquisador)

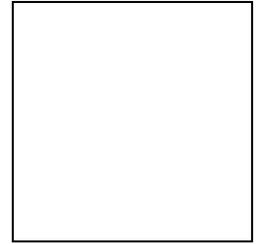
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Avaliação da associação entre periodontite crônica, deficiência de vitamina D e polimorfismos em pacientes diabéticos tipo 2”, como voluntário (a).

Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

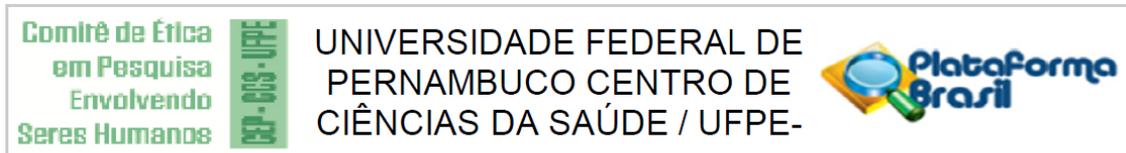


Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE CRÔNICA, DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2"

Pesquisador: Raphaella Karlla Machado Gonzaga

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29058714.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 711.678

Data da Relatoria: 03/07/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

s/recomendação.

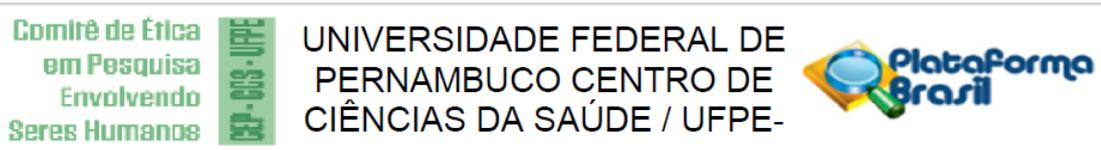
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

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



Continuação do Parecer: 711.678

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O parecer do Colegiado, deste protocolo, foi acatado 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, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 07 de Julho 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 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA

Diabetes Research and Clinical Practice

Diabetes Research and Clinical Practice is an international journal for health-care providers and clinically oriented researchers that publishes high-quality original research articles and expert reviews in **diabetes** and related areas. The role of the journal is to provide a venue for dissemination of knowledge and discussion of topics related to diabetes clinical research and patient care. Topics of focus include **translational science, genetics, immunology, nutrition, psychosocial research, epidemiology, prevention, socio-economic research, complications, new treatments, technologies** and **therapy**.

Diabetes Research and Clinical Practice is the official journal of the [International Diabetes Federation](#).

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our [author services](#).

Diabetes Research and Clinical Practice is the official journal of the International Diabetes Federation.

Journal Principles

All manuscripts submitted to *Diabetes Research and Clinical Practice* 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 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 *Diabetes Research and Clinical Practice* is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere.

Editorial Office

The full contact details for the Editorial Office are shown below:
Diabetes Research and Clinical Practice Editorial Office, Elsevier Ltd, The Boulevard,

Landford Land, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK; Phone: +44 (0) 1865 843753, E-mail: diab@elsevier.com

[Before you begin](#)

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an

electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Clinical Trials

* All randomised controlled trials submitted to Diabetes Research and Clinical Practice 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/>). ICMJE-approved registries currently include the following: <http://www.anzctr.org.au>, <http://www.clinicaltrials.gov>, <http://www.ISRCTN.org>, <http://www.umin.ac.jp/ctr/index/htm>, <http://www.trialregister.nl>, and <https://eudract.ema.europa.eu/>. Please include the unique trial number and registry name on manuscript submission.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

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

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts

and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2,500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

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.

Submission

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

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/diab>.

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 designated either (a) Basic Research (b) Clinical Research or (c) Epidemiology and 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.

Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold

face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision – numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Essential title page information

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

Structured Abstract: Original Research Articles

An abstract of no more than 250 words should be structured as per following:

- **Aims:** Reflects the purpose of the study (the hypothesis that is being tested);
- **Methods:** The setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type(s) of statistical analysis used;
- **Results:** The outcome(s) of the study and, if appropriate, its/their statistical significance;
- **Conclusions:** The significance of the results.

Abstracts for other articles (Commentaries and Reviews) should be written as a single paragraph not to exceed 200 words.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

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

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.

Artwork***Electronic artwork****General points*

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the

resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image

'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

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

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p.281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the

first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, 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 provide the data 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. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Authorship

The Corresponding Author must submit a completed Author Consent Form to DRCP 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.