



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

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DO INFLAMASSOMA,
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE EM UMA AMOSTRA DE
PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO**

RECIFE

2021

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DO INFLAMASSOMA,
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE EM UMA AMOSTRA DE
PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Área de Concentração: Clínica Integrada.

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

Co-orientadores: Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva.

RECIFE

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

D541a Dias, Rayanne Soraia Aguiar de Melo.
 Associação de polimorfismos de genes do inflamassoma, diabetes mellitus tipo 2 e periodontite em uma amostra de pacientes do Nordeste brasileiro / Rayanne Soraia Aguiar de Melo Dias. – 2021.
 95 f. : tab. ; 30 cm.

 Orientadora : Renata Cimões Jovino Silveira.
 Co-orientador : Ronaldo Celerino da Silva.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco , Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia. Recife , 2021.
 Inclui referências , apêndices e anexos.

 1. Diabetes Mellitus Tipo 2. 2. Periodontite. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4. Inflamação. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (Orientadora). II. Silva, Ronaldo Celerino da (Co-orientador). III. Pinho, Roberto Carlos Mourão (Co-orientador). IV. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2021-216)

RAYANNE SORAIA AGUIAR DE MELO DIAS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DO INFLAMASSOMA,
DIABETES MELLITUS TIPO 2 E PERIODONTITE EM UMA AMOSTRA DE
PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Bruna de Carvalho Farias Vajgel (UFPE)

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (UFPE)

Prof. Dr. Irani de Farias Cunha Júnior (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Leila Santana Coimbra (Centro Universitário Tiradentes – UNIT)

Antes de tudo, dedico esse trabalho à Deus e a Nossa Senhora, meu sustento diário, mais uma vez. Obrigada por me carregarem no colo até aqui!

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu esposo Saulo, companheiro de vida, agradeço pela paciência e pelo amor a mim dedicados. Obrigada pela positividade de sempre e por acreditar que sou capaz.

Ao meu filho Arthur, motivo maior da minha existência, obrigada por me ensinar tanto, por me fazer superar limites e me tornar uma pessoa melhor.

A toda minha família, que são minha base, minha essência e meus valores. Obrigada pela presença e pela torcida.

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

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

Ao meu amigo e Prof. Roberto Mourão, minha admiração e gratidão por todo ensinamento e pelo exemplo de caráter, retidão e fé dentro do universo da pós-graduação.

Ao Prof. Ronaldo Celerino, por mais uma vez permitir que eu pudesse continuar os estudos dentro da genética, além de estar sempre disponível e acessível. Meu obrigada por todo aprendizado e toda dedicação a este trabalho.

Aos colegas de turma, obrigada pela convivência, risadas e troca de saberes. Foi enriquecedor estar com cada um de vocês. Em especial a amiga Camila Agra, que dividiu parte da execução desse trabalho, assim como as alegrias e as tristezas que ele trouxe. Obrigada, amiga!

Todo o meu agradecimento aos funcionários da Pós-Graduação, que sempre atenciosamente me atenderam. Obrigada!

Ao Hospital Agamenon Magalhães e ao Prof. Dr. Francisco Bandeira, pela oportunidade de poder realizar as coletas que fizeram parte desse trabalho e de outros anteriores.

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

Aos alunos de graduação que estiveram comigo, obrigada pela grandiosa participação de vocês, que me fez sentir na prática a docência e o valor que cada aluno tem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), obrigada pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

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

RESUMO

Estudos recentes continuam confirmando uma relação bidirecional entre periodontite crônica (PC) e diabetes mellitus (DM), além da relação dessas patologias com a resposta imune e processos inflamatórios. Sabe-se que a ativação desses processos inflamatórios se dá através do inflamassoma, um complexo protéico oligomérico implicado no sistema imune inato que é ativado pela presença de patógenos e/ou danos celulares, liberando interleucinas pró-inflamatórias. O objetivo desse trabalho foi avaliar a associação do inflamassoma, através de polimorfismos nos genes *NLRP3* (rs35829419), *CASP1* (rs61751523) e *IFI16* (rs6940) na presença da periodontite em pacientes diabéticos ou não. Através de rigorosos critérios de inclusão e exclusão, inicialmente foram selecionados 285 pacientes, divididos em três grupos: diabéticos tipo 2 com periodontite (DM2+P=111), pacientes com periodontite (P=102) e pacientes controle, saudáveis para essas duas condições (CS=72). As genotipagens foram realizadas por PCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®), mas não foram exitosas para todos os indivíduos selecionados. Algumas distribuições alélicas não estiveram dentro do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi observada associação estatisticamente significativa dos polimorfismos estudados com a presença de DM2 e de periodontite. Entretanto, uma relação significativa para o gene *CASP1* no grupo de pacientes com periodontite (OR=0.13, p=0.027) foi observada, onde a presença de genótipos variantes foi mais frequente no estágio II do que no estágio III da doença periodontal, sugerindo que a presença dessa variante pode diminuir o avanço da doença periodontal. Nesse sentido, é importante que novos estudos genéticos avancem em relação ao papel do inflamassoma na periodontite, principalmente em pacientes diabéticos.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2; periodontite; polimorfismo de nucleotídeo único; inflamação.

ABSTRACT

Recent studies confirm a bidirectional relation between chronic periodontitis (CP) and diabetes mellitus (DM), as well as the relation between these mentioned diseases with the immune response and inflammatory processes. It is well known that the activation of such inflammatory processes happens through the inflammasome, a multiprotein oligomer of the innate immune system, which is activated by the presence of pathogens and/or cell damage, releasing proinflammatory interleukins. This study aims to evaluate the role of the inflammasome and such evaluation was done through the analysis of polymorphisms in NLRP3 (rs35829419), CASP1 (rs61751523) and IFI16 (rs6940) genes. Initially, it was selected 285 patients, chosen under strict criteria. They were divided in three groups: patients with type 2 diabetes and periodontitis (DM2+P=111), patients with periodontitis only (P=102) and a control group, healthy for both conditions (CS=72). Genotyping was performed by qPCR (real time polymerase chain reaction), using allele specific TaqMan® probes, but they weren't successful for all of the selected individuals. Some of the allelic distributions were not under the Hardy-Weinberg Equilibrium and it was not observed statistically significant association between the studied polymorphisms and the presence of DM2 and periodontitis. However, it was observed a significant relation of CASP1 gene in the group of patients with periodontitis (OR=0.13, p=0.027), in which the presence of variant genotypes was more frequent in stage II than in stage III of the periodontal disease, suggesting that the presence of this variant can decrease the progression of the periodontal disease. Therefore, it is important that new genetic studies advance towards the understanding of the role of inflammasome in periodontitis, mainly in diabetic patients.

Key words: diabetes mellitus, type 2; periodontitis; polymorphism, single nucleotide; inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Associação Americana de Periodontia
AIM2	Absent in melanoma 2 (Interferon-inducible protein AIM2 conhecida como Absent in melanoma 2 ou AIM2)
AR	Artrite Reumatóide
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (Proteína associada a apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase)
CASP1	Caspase-1
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	Utah Residents with Northern and Western European Ancestry (Residentes de Utah com descendência do norte e ocidente europeus)
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAMP	Padrões Moleculares Associados aos Danos
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DP	Doença Periodontal
EHW	Equilíbrio de Hradý-Weinberg
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
IFI16	Interferon-inducible protein 16
IL- 1	Interleucina -1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-18	Interleucina - 18

LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipossacarídeo
MAF	Minim Allele Frequency (Frequência alélica mínima)
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensageiro)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação de Biotecnologia)
NIC	Nível de Inserção Clínica
NLR	Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor (Receptor contendo repetição de domínio de ligação de nucleotídeo rico em leucina)
NLRC4	NLR, CARD domain containing 4
NLRP1	NLR, pyrin domain containing 1
NLRP3	NLR, pyrin domain containing 3
OR	Odds ratio
P	Periodontite
PAMP	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PCR	Polymerase Chain Reation (Reação em Cadeia da Polimerase)
PE	Pernambuco
PPV	Presença de Placa Visível
Pro-IL-18	Pro-interleucina-18
ProIL-1 β	Prointerleucina-1 beta
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PS	Profundidade de Sondagem
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de único nucleotídeo)
SS	Sangramento à Sondagem

STROBE	Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTR	Untranslated region (Região não traduzida)
YRI	Yoruba residents in Ibadan, Nigeria (Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	METODOLOGIA	18
2.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	18
2.2	POPULAÇÃO ALVO E TAMANHO AMOSTRAL	18
2.3	TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	18
2.4	SELEÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS.....	18
2.5	INSTRUMENTOS DE PESQUISA	20
2.5.1	Entrevista.....	20
2.5.2	Exame clínico	20
2.6	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DO DNA.....	21
2.7	SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS E GENOTIPAGEM.....	21
2.8	ANÁLISE DOS DADOS	22
3	AVALIAÇÃO DE SNPs NOS GENES NLRP3, CASP1 E IFI16 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS II E CONTROLES SAUDÁVEIS	24
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	57
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA	61
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	65
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO...	74
	ANEXO C – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO	95

1 INTRODUÇÃO

As doenças bucais estão entre as mais prevalentes em todo o mundo e leva a sérios problemas de saúde e econômicos, reduzindo a qualidade de vida das pessoas afetadas. As principais enfermidades são a cárie dentária, a doença periodontal e o câncer de lábios e cavidade oral (1).

A doença periodontal (DP) é considerada uma doença inflamatória induzida e mantida pela microbiota do biofilme dental. A resposta inflamatória na gengiva é considerada o estágio inicial do processo (gengivite), que com o tempo se transforma em uma fase destrutiva, a periodontite, caracterizada pela perda de inserção e perda óssea. Levantamentos epidemiológicos mundiais indicam que cerca de 10% das pessoas na faixa etária de 40–50 anos ou mais exibirão periodontite grave com o risco potencial de perder dentes durante sua vida (2).

O biofilme bacteriano, principalmente as bactérias anaeróbicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* e *Treponema denticola*), é a etiologia primária das doenças periodontais. Entretanto, essas doenças são o resultado de uma interação complexa entre os produtos bacterianos e a resposta do hospedeiro, os quais são modificados por fatores comportamentais e/ou sistêmicos (3), como o diabetes mellitus (DM).

O fato de que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), especialmente o não controlado, é um fator de risco para doença periodontal há muito é reconhecido. Essa doença resulta da ação insuficiente da insulina (4) e teve sua prevalência triplicada em todo o mundo entre 2006 e 2017 (5). Em pacientes com diabetes geralmente ocorre redução do fluxo salivar, associada à medicamentos e à neuropatia diabética que afeta as glândulas salivares. Com isso pode ser observado o aumento da cárie, ardor bucal, alterações do paladar; além do retardo no reparo de feridas bucais (5).

Nesse contexto, sabe-se que o DM pode causar alterações metabólicas sistêmicas em vários tecidos, incluindo o ligamento periodontal, o que pode modificar a reação inflamatória local e levar a um estado pró-inflamatório do periodonto humano (6,7).

Além dos efeitos sistêmicos do DM, evidências recentes sugerem que as alterações locais nos tecidos periodontais são caracterizadas por interações aumentadas entre leucócitos e células endoteliais, além de funções leucocitárias alteradas (6). Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: IL-1 β , IL-6 e TNF- α) levam à inflamação crônica de baixo grau e ativação da imunidade inata (8).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do corpo contra patógenos. Atua através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), expressos nas células imunes, além das mesoteliais e epiteliais. Existem cinco famílias de PRRs capazes de detectar uma vasta gama de componentes microbianos através dos chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMP), que são sequências moleculares específicas de cada microrganismo; e dos padrões moleculares associados aos danos (DAMP), que são componentes da célula hospedeira produzidos durante a inflamação (lesão/ estresse celular) ou derivado do ambiente, sendo este último muito importante na resposta inflamatória não-infecciosa. A ligação ao PRR induz cascatas de sinalização, produzindo múltiplos efeitos, incluindo ativação de células imunes inatas e produção de citocinas/ quimiocinas para o recrutamento de células imunes para o local da infecção ou do dano tecidual (9).

Uma função chave do sistema imunológico inato é a ativação do inflamassoma. Em resposta a PAMPs ou DAMPs, PRRs induzem a oligomerização de proteínas no citosol, formando essas plataformas protéicas. Existem múltiplos inflamassomas, nomeados de acordo com o sensor PRR que induz sua ativação. Nesse processo há a ativação de caspases celulares que, por sua vez, induzem a maturação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β e interleucina-18, juntamente com a indução de morte celular induzida (piroptose) (9,10).

O inflamassoma foi nomeado pela primeira vez em 2002 como uma plataforma molecular que desencadeia a ativação da caspase-1 (CASP1) e o processamento de proIL-1 β e proIL-18 (Tschopp, Burns e Martinon, 2002). Trata-se de um complexo multiprotéico intracelular composto pelo “receptor contendo repetição de domínio de ligação de nucleotídeo rico em leucina” (NLR - nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor), pela proteína adaptadora “proteína associada a apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase” (ASC - apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) e procaspase-1 (10).

As NLRs são uma grande família de proteínas intracelulares que regulam positiva ou negativamente a imunidade inata. Elas são encontradas em todas as espécies animais e o genoma humano codifica 23 NLRs. Com poucas exceções, as proteínas NLR têm organização de domínio tripartido, incluindo um domínio N-terminal variável, o domínio central de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina no terminal C. Eles são divididos em quatro subfamílias dependendo do seus domínios N-terminais (9).

Vários tipos de NLRs estão envolvidos na ativação dos inflamassomas, mas o NLRP3 (do inglês, NLR, pyrin domain containing 3) é o mais bem estudado (10), além do NLRP1 (do inglês,

NLR, pyrin domain containing 1), o NLRC4 (do inglês, NLR, CARD domain containing 4) e o AIM2 (do inglês, absent in melanoma 2) (11).

A descoberta do inflamassoma desencadeou várias pesquisas para esclarecer quais mecanismos bioquímicos controlam a ativação de caspases inflamatórias, a produção de citocinas inflamatórias e piroptose, mas também atraiu pesquisadores de várias disciplinas biomédicas para caracterizar o papel desses mecanismos imunológicos nas doenças humanas (12).

Embora já seja bem reconhecido que os inflamassomas são ativados nas células mielóides, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, eles também podem ser ativados nos queratinócitos, fibroblastos gengivais e dérmicos, além de células epiteliais da mucosa (9), o que aumenta o leque de interrogações sobre o papel dessa plataforma multiprotéica no curso das doenças que envolvem inflamação.

A ativação exacerbada do inflamassoma é, muitas vezes, considerada a principal culpada pelo dano tecidual nas infecções sistêmicas graves, bem como em infecções crônicas inflamatórias, metabólicas, cardiovasculares e nas doenças neurodegenerativas (12).

A desregulação inflamatória parece levar a uma alteração na eliminação bacteriana e na função da barreira epitelial/ mucosa, traduzidas em predisposição à doença. A morbidade clínica de algumas entidades impulsionadas pelo inflamassoma, como a doença periodontal, apoia ainda mais esse conceito (9).

A interleucina-1 β (IL-1 β), uma citocina pró-inflamatória, induz a produção de mediador inflamatório, formação de osteoclastos, expressão de metaloproteinase de matriz e morte celular em tecidos periodontais, resultando na destruição do osso alveolar e do tecido conjuntivo periodontal. Ela é produzida extracelularmente após a proIL-1 β (Pro-interleucina-1 β) ser ativada pela caspase-1, que é estimulada pelo complexo multiprotéico inflamassoma (10).

Estudo recente; baseado na expressão gênica em amostras de tecido gengival de pacientes com gengivite, periodontite e controles, concluiu que a doença periodontal inflamatória pode causar uma redução de reguladores do inflamassoma, que por sua vez permite o aumento da expressão e atividade de NLRP3 e IL-1 β , levando, assim, à destruição periodontal (13).

Em 2017, estudo realizado para comparar os níveis salivares de NLRP3, ASC, caspase-1 e IL-1 β de pacientes com periodontite e controles, bem como elucidar sua associação com o estado clínico periodontal, indicou a possibilidade de que os níveis salivares de NLRP3, ASC e IL-1 β , mas não de caspase-1, atuem como indicadores fortes, independentes da quantidade e

extensão da degradação periodontal e podem ser potencialmente usados para prevenção e terapia deste grupo de doenças (14).

Embora algumas variantes imunogênicas tenham sido associadas à periodontite, a imunopatogênese dessa doença ainda não foi totalmente compreendida (15). Somado a isso, diferentes grupos étnicos podem ter diversos graus de suscetibilidade à doença devido à influência de polimorfismos genéticos (16).

Os componentes do inflamassoma NLRP3 são um dos principais alvos de ensaios clínicos que avaliam o tratamento para uma série de doenças, incluindo insuficiência cardíaca, osteoartrite, leucemia, psoríase, diabetes e esteatose/ hepatite não alcoólica (17).

Os principais mecanismos e sinalização molecular da indução da inflamação no DM2 também não são todos conhecidos. Há indícios de que os sensores intracelulares DAMPs desempenham papéis importantes na indução/ estimulação da inflamação crônica na DM2. O NLRP3 participa da patogênese da DM2 através de dois mecanismos principais: indução da inflamação por meio da ativação de Pro-IL-1 β e Pro-interleucina-18 (Pro-IL-18) para produzir IL-1 β e IL-18 ativados, que são as vias principais de inflamação crônica na DM2; e indução de piroptose, por meio da ativação da caspase-1 nas células beta pancreáticas (18). Há uma importante contribuição da IL-1 β , derivada de macrófagos, na inflamação pós-prandial aguda e aumento da secreção de insulina pós-prandial, ratificando a influência desse mediador imunoinflamatório na patogenia do DM (19).

Para pacientes com DM2 e DP, o estado hiperglicêmico pode exacerbar a inflamação do tecido gengival, ativando a via NLRP3. Se essa resposta inflamatória do hospedeiro for além do normal, poderá haver uma maior degradação do tecido periodontal (20).

Há indícios de que, mesmo quando a inflamação está presente apenas nos tecidos gengivais e ainda não envolve reabsorção óssea, os níveis de *NLRP3* já estão com sua expressão aumentada 7,7 vezes mais em amostras gengivais de gengivite em comparação com controles saudáveis (21). Amostras de saliva de indivíduos com periodontite também demonstram níveis significativamente aumentados de *NLRP3* em comparação com indivíduos saudáveis (14).

Outros estudos clínicos também exploraram a presença de *NLRP3* em relação a doença periodontal. As análises de amostras de tecido gengival humano mostraram uma expressão significativa de mRNA (Ácido ribonucleico mensageiro) de *NLRP3*, sendo quatro a sete vezes maior na periodontite quando comparadas a amostras gengivais saudáveis (21,22). Os

resultados imuno-histoquímicos confirmaram esses achados e mostraram que a expressão aumentada de NLRP3 é mais pronunciada na camada epitelial, o que poderia indicar que o NLRP3 pode auxiliar o epitélio na resistência à constante invasão bacteriana no sulco gengival e nos tecidos (9).

Adicionalmente, os seres humanos expressam quatro proteínas de ligação ao DNA que contêm domínios pirina, mas apenas *AIM2* (do inglês, absent in melanoma 2) e *IFI16* (do inglês, Interferon-inducible protein 16) formam inflamassomas. Existem poucos dados explorando o papel de *IFI16* e *AIM2* na patogênese da doença periodontal. Dados preliminares apoiam uma potencial regulação/ iniciação dos inflamassomas *IFI16* e *AIM2* em tecidos com doença periodontal (9), encontrando associação de polimorfismos de *IFI16* e *AIM2* a um maior número de microrganismos periodontais e a um aumento do percentual de parâmetros clínicos da doença periodontal, sugerindo a necessidade de novos estudos (23).

IFI16 pode desempenhar um papel importante, controlando diferentes funções celulares, incluindo: inibição de crescimento celular, regulação da apoptose celular, respostas a processos inflamatórios, entre outras. Outros achados sugerem que *IFI16* é relacionado à infecção bacteriana, doenças autoimunes, perda óssea e artrite. Em relação à Artrite Reumatóide (AR), sugerem que a DP pode estar associada a esta, ambas doenças inflamatórias, onde pode haver destruição óssea. Sabendo-se que *IFI16* é um marcador gênico de AR (24), é coerente investigar também o papel desse inflamassoma na periodontite. Além disso, recentemente, polimorfismos no gene *IFI16* (rs1101998 e rs1633256) foram associados à tuberculose no Brasil (25), outra doença muito prevalente no país e com etiologia bacteriana.

Os polimorfismos de uma única base (SNP) são o tipo mais comum de variação e estão presentes em aproximadamente 1 a cada 300 pares de bases nitrogenadas do genoma. Podem alterar a transcrição e tradução, mudando a sequência de aminoácido e consequentemente a estrutura e/ou função da proteína. Tais polimorfismos podem ser utilizados como marcadores para estudos genéticos em humanos, comparando a variação entre as populações, analisando a presença de haplótipos para determinar a ligação do desequilíbrio entre genes e como marcadores para associação com doenças (26).

Diante de tudo que foi exposto e considerando a relevância das doenças periodontais, do DM2, as evidências sobre os inflamassomas e as poucas informações específicas sobre o papel deles em indivíduos com DP e DM2, o presente estudo tem o objetivo de avaliar se polimorfismos de genes do inflamassoma (*NLRP3*, *CASP1* e *IFI16*) estão associados ao desenvolvimento da periodontite em indivíduos com DM2 ou não, em uma população do nordeste brasileiro.

2 METODOLOGIA

2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse trabalho seguiu a norma 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa em humanos, além da Declaração de Helsinque (1964) e do *STROBE* (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology). Todos indivíduos foram informados sobre o teor científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos que teriam em participar da mesma, e mediante aceitação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) concordando em participar do estudo (Apêndice A).

Todos os procedimentos utilizados no trabalho foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE - Recife/PE (registro nº 1310208) e do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), instituição coparticipante (registro nº 1368830) (ANEXO A).

2.2 POPULAÇÃO ALVO E TAMANHO AMOSTRAL

A população de estudo foi constituída por indivíduos diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e indivíduos saudáveis para essas duas condições (grupo controle) atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e na Clínica do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os indivíduos envolvidos foram oriundos do Estado de Pernambuco.

A amostragem aconteceu de forma aleatória e não-probabilística, totalizou 285 indivíduos, sendo 111 com DM2 + P, 102 com apenas P e 72 indivíduos saudáveis (grupo controle). Por se tratar de variantes nunca antes estudadas em nossa população, não foi possível realizar o cálculo amostral inicialmente.

2.3 TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo do tipo caso-controle, composto por uma etapa clínica e outra laboratorial.

As avaliações clínicas dos indivíduos, assim como a coleta de material biológico para estudo dos polimorfismos, aconteceram no Ambulatório de Endocrinologia do HAM, Recife – PE, referência no atendimento de indivíduos diabéticos, e na Clínica do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE de 2015 a 2017.

As análises laboratoriais aconteceram no Laboratório de Biologia Molecular da Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE.

2.4 SELEÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS

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

- ✓ Critérios de inclusão para o grupo com DM2 + Periodontite: ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de periodontite crônica (PC) (27,28); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (29).
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo controle: ter idade mínima de 35 anos, e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (29).
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo controle: ter idade mínima de 35 anos, não apresentar DM2 e/ou Periodontite, e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (29).
- ✓ Critérios de exclusão: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante; usar aparelho ortodôntico.

Para o grupo controle, ser portador de DM2 e/ou Periodontite também foi um critério de exclusão.

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

É importante salientar a existência de uma nova classificação (30), porém no momento da coleta ainda se utilizava a preconizada em 2015. Neste sentido, a nova classificação foi utilizada para reclassificar os pacientes com base nas informações registradas nas fichas clínicas, o que trouxe algumas limitações, devido a seu maior enfoque clínico. Apesar dos indivíduos terem sido selecionados, inicialmente, através da classificação de 2015, os grupos foram reorganizados baseado no “Novo esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantar”, publicado em março de 2018; levando, invariavelmente, a uma perda e/ou mudança nos grupos formados inicialmente.

Diante disso, para o presente estudo, considerou-se doença periodontal aqueles pacientes reclassificados como periodontite (em todos os estágios e graus) e como saúde clínica com periodonto reduzido (periodontite estável). O grupo controle foi formado por aqueles com saúde periodontal e gengival (com periodonto íntegro e com periodonto reduzido, desde que não tenha sido decorrente de doença periodontal), além daqueles com gengivite por biofilme.

Esse novo esquema de classificação já entende os indivíduos diabéticos como um grupo a parte, devido a particularidade da relação entre as duas doenças. Desse modo, no grupo de diabéticos permaneceu os indivíduos que se adequavam aos requisitos de periodontite, sendo classificados também os seus estágios e graus.

2.5 INSTRUMENTOS DE PESQUISA

2.5.1 Entrevista

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

2.5.2 Exame clínico

Para cada indivíduo foi preenchido um periograma (Apêndice B), no qual constaram dados sobre: presença de placa visível (PPV), profundidade de sondagem (PS), sangramento à sondagem (SS), perda de inserção clínica (ou nível de inserção clínica – NIC), mobilidade e presença de envolvimento de furca.

Para cada dente, foram sondados seis sítios: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual. O exame foi realizado com luz artificial e usando odontoscópio e sonda periodontal milimetrada tipo Carolina do Norte (Trinity®), além dos equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, luvas, óculos, jaleco). Durante todo o

processo, três examinadores e anotadores calibrados fizeram os exames clínicos e o registro nas fichas dos indivíduos (valores de concordância Kappa $0,40 < k < 0,75$) (31).

2.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DO DNA

Após o exame clínico, foi realizada a coleta de saliva em tubos do tipo Falcon (15 ml) estéreis, solicitando ao indivíduo cuspir por 3 minutos (32). Esse material foi devidamente identificado, armazenado em condições refrigeradas e transportado para o Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, onde eram condicionados em freezer a -20°C até isolamento do material genético.

Para extração do DNA foi utilizado o kit para isolamento de DNA genômico Wizard® (PROMEGA), (seguindo o protocolo do fabricante para amostras de sangue). O DNA genômico isolado foi quantificado e verificado quanto a sua pureza, através do espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fischer®), considerando a razão entre as absorbâncias 260/280nm e 260/230nm. As amostras consideradas satisfatórias apresentaram valor igual ou superior a 50ng/ul de DNA, a razão 260/280 nm entre 1.8 e 2.2 e a razão 260/230 ao redor de 2.0. Por fim, as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C .

2.7 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS E GENOTIPAGEM

A seleção dos polimorfismos nos genes *NLRP3*, *CASP1* e *IFI16*, que formam complexos protéicos chamados inflamassoma, foi baseada nos valores das frequências alélicas mínimas (do inglês “Minim Allele Frequency – MAF”) superiores a 0,1 (10%) nas populações caucasiana (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry - CEU) e africana (Yoruba in Ibadan, Nigeria -YRI), de acordo com as bases de dados NCBI, e 1000genomes (33). Além disso, considerou-se a importância funcional das variantes e seu papel na inflamação, atestadas por estudos da literatura (15,34–36)

Foram selecionados três polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes *NLRP3* (rs35829419), *CASP1* (rs61751523) e *IFI16* (rs6940) (Quadro 1).

Quadro 1. Caracterização dos polimorfismos estudados.

Genes	Localização citogenética	SNP	Variação	Tipo de SNP	Consequência na proteína
<i>NLRP3</i>	1q44	rs35829419	A/C	Não-sinônimo	Q (Gln) > K (Lys)
<i>CASP1</i>	11q22.3	rs61751523	C/T	Não-sinônimo	K (Lys) > R (Arg)
<i>IFI16</i>	1q23.1	rs6940	A/T	Não-sinônimo	T (Thr) > S (Ser)

A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®) (Quadro 2) e o termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®). As reações foram preparadas com volume total de 5 µl, contendo aproximadamente 1µl de DNA molde por reação (com concentração de 25ng/µl), 1,25µl de água, 2,5µl do TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 0,25µl de cada sonda diluída a 20x (Applied Biosystems®) e acondicionadas em placas ópticas de 96 poços. Em cada placa foi incluído um controle negativo (água ultrapura) para atestar a ausência de contaminação durante o preparo da reação. As amplificações seguiram as condições térmicas padrão para sondas, em 50 ciclos.

Quadro 2. Sondas alelo-específicas para os SNPs estudados.

Gene /SNPs ID	Nº do ensaio	Sequência das sondas
NLRP3/ rs35829419	C__25648615_10	GGAAGGCCGACACCTTGATATGGTG[A/C]AGTG TGTCTCCCAAGCTCCTCTCA
CASP1/ rs61751523	C__64657193_10	AAAATCCTTCTCTATGTGGGCTTTC[C/T]TAATA GCATCATCCTCAAACCTCTTC
IFI16/ rs6940	<u>C 7483779 10</u>	ACTCAATCCTGATTCAAGTATGGAA[A/T]CTTCA CCAGACTTTTTCTTCTAAAA

2.8 ANÁLISE DE DADOS

As frequências alélicas e genotípicas, para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer (37). As distribuições dos genótipos e sua aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada grupo e para cada SNP foi verificada através do teste Qui-Quadrado.

As possíveis associações entre os grupos e as frequências alélicas e genotípicas foram realizadas através do teste Exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência 2 x 2, no programa R project (38) .

As variáveis categóricas foram comparadas através do Teste Exato de Fisher. Já as variáveis quantitativas foram inicialmente verificadas quanto sua distribuição normal através do Teste de Shapiro-Wilk, e posteriormente, comparadas por meio de análises univariadas através do Teste de Mann-Whitney utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0.1.

3 AVALIAÇÃO DE SNPs NOS GENES NLRP3, CASP1 E IFI16 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS II E CONTROLES SAUDÁVEIS

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica e multifatorial, que figura entre as mais prevalentes do mundo, estando relacionada a diversos fatores, como: infecções, respostas inflamatórias, higiene oral, tabagismo, envelhecimento e predisposição individual. Em resposta a infecção por patógenos, é desencadeada uma inflamação crônica pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, levam à destruição do osso e tecidos conjuntivos adjacentes aos dentes ¹. A resposta hospedeira é responsável por cerca de 50% da destruição tecidual associada à doença periodontal (DP) ².

Dentre os diversos fatores de risco para o desenvolvimento da periodontite, destaca-se o diabetes mellitus tipo II (DM2). Essas duas doenças crônicas são muito prevalentes em humanos e estão relacionadas. Tal relação é considerada uma “relação de mão dupla”, com o DM2 aumentando o risco de DP e a DP afetando, adversamente, o controle glicêmico e contribuindo para a gravidade das complicações do DM2 ³. Ademais, é provável que haja uma variabilidade individual no grau em que o controle glicêmico influencia o estado periodontal ⁴.

A imunidade inata e a adaptativa são fundamentais para a resposta hospedeira frente a invasão microbiana na periodontite. A primeira é iniciada pela interação de estruturas moleculares produzidas por bactérias presentes no biofilme dental e os receptores de reconhecimento de patógenos ⁵, gerando uma resposta inflamatória, pela liberação de citocinas. Nas doenças inflamatórias, como aterosclerose, diabetes e obesidade, existe um estímulo crônico que inicia e induz a ativação desse processo ⁶.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias conhecidas, pode-se citar a IL-1 β (Interleucina-1 β) e a IL-18 (Interleucina-18), que são liberadas pelo hospedeiro, promovendo a inflamação do tecido periodontal ⁷ e a ativação da resposta imune adaptativa. Essas moléculas são produzidas como precursores inativos, pro-IL-1 β e pro-IL-18, em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). DAMPs e PAMPs são detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em células da imunidade inata, incluindo os receptores do tipo NOD ou receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs do inglês *NOD-like receptors*/ Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor) ⁸.

A conversão de pró-IL-1 β e pró-IL-18, através da clivagem pela enzima caspase-1, em suas formas biologicamente ativas, ocorre devido à ativação do inflamassoma ⁹, um complexo multiprotéico de sinalização e regulação dos processos imunológicos inatos desencadeados em resposta as infecções e substâncias estranhas; do qual, a atividade excessiva, pode ser prejudicial, sendo associada a doenças autoimunes e auto inflamatórias ^{10,11}.

Vários tipos diferentes de inflamassomas já foram identificados, incluindo NLRP2 (NLR, pyrin domain containing 2), NLRP3 (NLR, pyrin domain containing 3), AIM2 (Absent in melanoma 2) e IFI16 (interferon gamma inducible protein 16) ¹².

A relação entre inflamassomas e doença periodontal tem sido bastante avaliada na literatura ^{6,13-19}. A expressão gengival de alguns inflamassomas aumentaram na presença de DP em comparação à controles saudáveis ²⁰. Por exemplo, a superexpressão e os níveis salivares de NLRP3, o mais estudado dos inflamassomas, já se mostraram significativamente elevados em indivíduos com periodontite ¹⁷.

O NLRP3 é codificado pelo gene de mesmo nome, localizado no cromossomo 1 ²¹, apresenta uma série de polimorfismos, os quais já foram descritos e associados com diferentes doenças autoimunes e auto inflamatórias, sendo considerado um ponto chave de sinalização na resposta imune ²². Ele tem sido implicado em uma ampla gama de doenças, incluindo doença de Alzheimer, DM2 e doenças infecciosas. Uma variedade de estímulos pode ativar esse inflamassoma, então, compreendê-los permite o desenvolvimento de inibidores específicos para tratar doenças relacionadas ao NLRP3 ²³. Recentemente; algumas vias terapêuticas, baseadas na inibição do inflamassoma NLRP3, foram eficazes no tratamento da periodontite diabética experimental e doenças inflamatórias ^{19,24}.

Adicionalmente, NLRP3 participa não apenas da indução da inflamação crônica, mais na gênese de várias complicações em diabéticos ²⁵, ratificando que a regulação positiva pode levar a um aumento na produção de IL-1 β ^{20,26}.

Outro inflamassoma estudado é o IFI16 (interferon gamma inducible protein 16), codificado por gene de mesmo nome, localizado no cromossomo 1. Embora a maioria dos inflamassomas se formem no citosol, esse é ativado no núcleo celular. IFI16 é uma proteína multifuncional devido à sua capacidade de se ligar a várias proteínas alvo e, por sua vez, modular uma variedade de funções celulares, incluindo regulação do ciclo celular, apoptose/ piroptose, respostas à danos no DNA e inflamação. Alterações que afetem a expressão ou a função da mesma podem levar à predisposição e desenvolvimento da doença periodontal ⁶. Marchesan et al. (2017) observaram haplótipos associados com aumento do sangramento à sondagem e dos

níveis de microrganismos periodontais, sendo o polimorfismo rs6940 considerado como provavelmente prejudicial para a função da proteína ¹⁴.

A proteína CASP-1 atua como ponto em comum entre os dois inflamassomas e efetua o processamento das citocinas pro-inflamatórias em suas formas ativas. Variações genéticas no gene CASP-1, localizado no cromossomo 11 ²⁷, pode alterar a função de clivagem e promover a indução da morte celular por piroptose, com consequente desequilíbrio da resposta inflamatória ²⁸. As citocinas processadas pela caspase-1, particularmente IL-1 β , podem modular a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, afetando a renovação e a reabsorção óssea inflamatória na periodontite ¹⁸

A relevância dos inflamassomas para a resposta imune é demonstrada pela associação entre polimorfismos em genes que codificam seus componentes protéicos e condições inflamatórias autoimunes ¹⁸. Essas alterações genéticas e o aumento da expressão tecidual de proteínas relacionadas, são clinicamente correlacionadas a fenótipos de doenças ⁶, fazendo-se necessário a identificação de fatores genéticos que controlam a inflamação oral ¹.

A variação na susceptibilidade humana à periodontite há muito tempo é aceita. Além disso, os processos inflamatórios e imunológicos nessa doença são complexos e, embora várias informações estejam disponíveis, muitas questões permanecem ⁷. Sabendo-se que influências ambientais, mas também genéticas desempenham um papel no processo de susceptibilidade e considerando a periodontite como um excelente modelo para estudar o papel dos inflamassomas, devido à abundância de PAMPs e DAMPs e à elevada proporção de macrófagos no microambiente tecidual ¹⁸, o presente trabalho se propôs a investigar a relação entre polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes *NLRP3*, *CASP1* e *IFI16* na presença da periodontite em indivíduos com ou sem diabetes em uma população do nordeste brasileiro.

METODOLOGIA

População, desenho, coleta de amostras biológicas e considerações éticas

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle onde a amostragem aconteceu de forma aleatória e não-probabilística, totalizando 285 indivíduos, sendo 111 com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) + Periodontite (P), 102 com apenas Periodontite (P) e 72 indivíduos controles saudáveis (CS) oriundos do Estado de Pernambuco, Brasil.

Os indivíduos foram recrutados durante o período de 2015 a 2017 no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e na Clínica Escola do Programa de

Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), seguindo os critérios de inclusão e exclusão abaixo:

- Critérios de inclusão para o grupo com DM2 + P: ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de periodontite crônica (PC) ^{29,30}; idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) ³¹.
- Critérios de inclusão para o grupo com apenas P: ter o diagnóstico clínico de PC ^{29,30}; ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) ³¹.
- Critérios de inclusão para o grupo CS: ter idade mínima de 35 anos, e, no mínimo, ter 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) ³¹.
- Critérios de exclusão geral: ter feito uso de antibióticos nos últimos 6 meses; fazer uso de anti-inflamatórios de forma crônica; apresentar condições que comprometam a imunidade sistêmica; estar grávida ou lactante; ter se submetido a tratamento periodontal nos últimos 6 meses; ser fumante e usar aparelho ortodôntico.
- Para o grupo apenas com P, ser portador de DM2 também foi um critério de exclusão. Assim como apresentar DM2 e/ou P o foi para o grupo controle.

Para cada indivíduo foi preenchido um periograma e o diagnóstico clínico de periodontite foi realizado com base na classificação vigente no momento das coletas ^{32,33}. Posteriormente, os grupos foram reorganizados considerando o “Novo esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantar” ³⁴.

Todos os procedimentos metodológicos e clínicos realizados neste estudo foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE - Recife/PE (registro nº 1310208) e do HAM (registro nº 1368830). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) concordando em participar da pesquisa. Além disso, seguiu-se a norma 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa em humanos; a Declaração de Helsinque (1964) e o STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology).

Coleta das amostras biológicas, extração de DNA e genotipagem

A obtenção do material genético de cada indivíduo foi realizada a partir da coleta de

amostras de saliva, em tubos de 15ml estéreis tipo Falcon. Para isso, foi solicitado ao indivíduo cuspir no tubo durante 3 minutos ³⁵.

Para extração do DNA da saliva foi utilizado o kit para isolamento de DNA genômico Wizard® (PROMEGA) (seguindo o mesmo protocolo do fabricante para amostras de sangue). Em seguida, o DNA isolado foi quantificado e verificado quanto sua pureza, através do espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fischer®).

Para a genotipagem, inicialmente, foi efetuada a seleção dos polimorfismos, baseando-se nos valores das frequências alélicas mínimas (do inglês “Minim Allele Frequency – MAF”) superiores a 0,1 (10%) nas populações caucasiana (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry - CEU) e/ou africana (Yoruba in Ibadan, Nigeria -YRI) e também de acordo com as bases de dados NCBI e 1000genomes ³⁶. Além disso, considerou-se a importância funcional das variantes e seu papel na inflamação, atestadas por estudos da literatura ^{18,23,37,38}. Foram selecionados três polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) não-sinônimos nos genes *NLRP3* (rs35829419), *CASP1* (rs61751523) e *IFI16* (rs6940).

A genotipagem foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®) e o termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®).

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas, para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer ³⁹. A distribuição dos genótipos e sua aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada grupo e para cada SNP foi verificada através do teste Qui-Quadrado.

As possíveis associações entre os grupos e as frequências alélicas e genotípicas foram realizadas através do teste Exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência 2 x 2, no programa R ⁴⁰.

As variáveis categóricas foram comparadas através do Teste Exato de Fisher. Já as variáveis quantitativas foram, inicialmente, verificadas quanto sua distribuição normal através do Teste de Shapiro-Wilk, e posteriormente, comparadas por meio de análises univariadas através do Teste de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0.1. Para todas as análises, o nível de significância foi de $\alpha < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados descritivos do estudo, encontram-se na tabela 1. Diferenças significativas foram evidenciadas entre os grupos quanto ao sexo, idade, estado civil, renda, histórico de tabagismo, escolaridade e características intraorais (número de dentes, profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, sangramento à sondagem e presença de placa visível).

O sexo feminino foi predominante em todos os grupos, com frequências superiores a 72%. No entanto, o sexo masculino foi significativamente mais frequente entre os indivíduos com DM2+P (27%; $p=0,005$) e com apenas P (23,8%; $p=0,021$) em relação aos controles saudáveis (10,4%).

Em relação a idade, observou-se que tanto os indivíduos DM2+P (59 anos; $p=0,0001$) quanto os indivíduos com apenas P (52 anos; $p=0,0001$) apresentaram uma maior mediana de idade em comparação aos controles saudáveis (47 anos), diferindo estatisticamente.

Quanto ao estado civil, a maioria dos indivíduos dos três grupos eram de casados. A comparação entre os grupos DM2+P e P, revelou, curiosamente, que indivíduos solteiros eram mais comuns no grupo apenas com periodontite (33%) do que entre os indivíduos DM2+P (19,8%; $p=0,025$).

A renda também se mostrou significativamente diferente entre os grupos. Controles saudáveis apresentaram uma mediana de 2 salários-mínimos, enquanto indivíduos DM2+P ($p=0,0001$) e P ($p=0,0002$), 1 salário mínimo.

Ratificando uma informação já bem reconhecida, na variável “histórico de tabagismo”, observou-se que o fato de já ter fumado foi significativamente mais comum entre indivíduos dos grupos DM2+P ($p=0,0002$) e P ($p=0,009$), quando comparados ao grupo saudável.

Quanto a escolaridade, a maioria dos indivíduos dos três grupos possuíam o ensino médio completo. A baixa escolaridade (analfabeto e fundamental incompleto) foi significativamente mais frequente entre indivíduos DM2+P (9% e 26,1%, respectivamente) em relação aos indivíduos com apenas P (0,9%; $p=0,003$ e 14,7%; $p=0,025$, respectivamente) e controles saudáveis (1,3%; $p=0,019$ e 6,5%; $p=0,001$, respectivamente). Indivíduos com ensino fundamental completo foram significativamente mais frequentes entre DM2+P (14,4%) em comparação com controles saudáveis (3,9%; $p=0,009$). Por outro lado, indivíduos com alta escolaridade (pós-graduação) foram significativamente mais frequentes entre os controles saudáveis (14,3%) que em indivíduos com DM2+P (1,8%; $p=0,031$).

Em relação às características clínicas intraorais, também se observaram diferenças significativas entre os 3 grupos. Entre os indivíduos DM2+P, observou-se um menor número de dentes, uma maior profundidade de sondagem e uma maior perda de inserção clínica, diferindo significativamente em relação aos indivíduos do grupo P ($p < 0,05$) e controles saudáveis ($p < 0,05$). Indivíduos com apenas P apresentaram valores superiores do percentual de sangramento à sondagem, diferindo significativamente dos controles saudáveis.

Quanto a presença de placa visível, o maior percentual foi identificado no grupo DM2+P, o que não diferiu significativamente do grupo com apenas P. Mas ambos (DM2+P e P), mostraram diferença significativa comparados aos controles saudáveis.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DM2+P e P em relação ao estágio, grau e extensão da doença periodontal.

Na tabela 2, encontram-se as distribuições alélicas e genotípicas para os SNPs em *NLRP3*, *CASP1* e *IFI16* nos três grupos estudados. As distribuições genotípicas foram condizentes com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para os SNPs rs35829419 (controles saudáveis), rs61751523 (DM2+P) e rs6940 (P).

Para todas as variantes estudadas foram observadas diferenças percentuais em relação a distribuição alélica e genotípica entre os indivíduos DM2+P, P e controles saudáveis, no entanto, estas não foram estatisticamente significativas.

Também analisamos a presença dos genótipos variantes em relação às características clínicas intraorais e aquelas relacionadas à nova classificação clínica da periodontite. Os resultados foram apresentados na tabela 3 e como material suplementar nas tabelas S1, S2, S3, S4 e S5. Dentre todas as características analisadas, diferenças significativas só foram observadas para o estágio da doença periodontal entre indivíduos com apenas periodontite em relação às variantes de *CASP1* (Tabela 3).

A presença dos genótipos variantes para o gene *CASP1* (CT+CC) foi significativamente mais frequente entre indivíduos com apenas periodontite no estágio II (28,6%) em comparação com indivíduos com periodontite no estágio III (4,7%, $p = 0,027$).

DISCUSSÃO

A periodontite é a sexta das doenças mais prevalentes globalmente ³. Um dos seus principais fatores de risco ⁴¹, o diabetes, teve sua prevalência triplicada em todo o mundo de 2006 a 2017, onde o tipo 2 responde por 90% dos casos ³ e tem a periodontite como a sexta complicação mais presente ².

Embora os componentes do biofilme bacteriano sejam semelhantes em indivíduos diabéticos e não diabéticos, há um aumento da resposta imune inflamatória nestes primeiros, particularmente durante episódios de hiperglicemia, resultando, assim, numa produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias ². Essas citocinas são produtos da ativação de inflamassomas, que tanto respondem à presença das bactérias periodontopatogênicas (PAMPs) como ao dano tecidual causado pelo estado inflamatório crônico na diabetes (DAMPs) ⁴². Neste sentido, o presente trabalho avaliou a relação entre polimorfismos em genes que codificam proteínas do inflamassoma e a presença de periodontite em pacientes diabéticos ou não.

Os dados descritivos das características clínico-epidemiológicas indicaram uma forte influência das variáveis na doença periodontal. O sexo masculino se mostrou como fator de risco para periodontite, seja ela associada ou não a DM2. Historicamente, o sexo feminino tem o hábito de maior cuidado com as questões de saúde, o que pode explicar essa associação ⁴³; inclusive no Brasil, já foi visto que o maior número de diagnósticos de doenças crônicas é realizado em mulheres, por não se ter uma boa adesão do sexo masculino aos serviços de saúde, se tornando um grande desafio da saúde pública ⁴⁴.

Indivíduos mais velhos também apresentaram uma maior susceptibilidade à periodontite e/ou ao diabetes, sendo esperada essa relação, visto que as doenças crônicas têm o tempo como fator importante para o desenvolvimento e a progressão ⁴⁵.

A renda ⁴⁶ e a escolaridade ⁴⁴ são fatores sociais de risco para a saúde. Na população de estudo, indivíduos controles saudáveis apresentaram uma maior renda, da mesma forma que um alto grau de escolaridade, esta também foi associada com uma menor susceptibilidade à DM2+P. Enquanto o analfabetismo e a baixa escolaridade aumentaram a chance da presença de DM2+P em relação aos outros dois grupos.

Liu et al. (2018) investigaram diferentes variáveis em relação a periodontite e diabetes tipo 2, e constatou que disparidades de gênero foram encontradas, mesmo após regressão logística com ajustes para dados demográficos, socioeconômicos e comportamentais. Mais especificamente, semelhante ao presente trabalho, dadas as diferenças metodológicas, as taxas

de prevalência mais altas de periodontite moderada-grave foram em indivíduos com maior idade, do sexo masculino, com baixa renda e menor escolaridade ⁴⁷.

O histórico de tabagismo também foi considerado na anamnese dos indivíduos e os resultados corroboraram com a literatura, onde o fato de ser fumante ou já ter fumado está associado a uma maior susceptibilidade à periodontite ⁴⁸ em diabéticos e não diabéticos, devido aos diversos efeitos do tabaco nos tecidos bucais (comprometimento do reparo tecidual e o aumento da perda óssea alveolar). Adicionalmente, as proporções de citocinas pró-inflamatórias aumentam ainda mais em indivíduos com periodontite associada à fatores de risco, como: o tabagismo, contribuindo para uma carga inflamatória sistêmica e aumento do risco de complicações em todo organismo ⁴⁹.

Quanto as características intraorais, o maior número de dentes e o menor índice de placa visível esteve no grupo de pacientes saudáveis. As maiores médias de profundidade de sondagem e perda de inserção foram no grupo DM2+P, assim como estudo recente realizado no sudeste do Brasil ⁵⁰. O maior percentual de sangramento esteve para o grupo apenas com periodontite, onde o mais esperado seria para o grupo DM2+P. Outros fatores podem ter influenciado, como o controle do diabetes e da doença periodontal, visto que tais indivíduos eram acompanhados em hospital de referência para o diabetes no estado de Pernambuco, o que pode ser relacionado com a ausência de diferenças entre os indivíduos DM2+P e P quanto ao estágio, grau e extensão da periodontite.

A análise dos SNPs estudados com a DM2 e a periodontite não evidenciou diferenças significativas, apesar das diferenças percentuais. Em relação ao SNP rs35829419 de *NLRP3*, em trabalho anterior, também não foram encontrados registros de sua associação com a periodontite, no entanto foi associado a risco aumentado de complicações macrovasculares em indivíduos diabéticos⁵¹.

Sabe-se que a expressão de NLRP3 e IL-1 β no epitélio gengival oral de indivíduos com periodontite crônica e diabetes mellitus tipo 2 é significativamente aumentada, sugerindo que um estado hiperglicêmico pode exacerbar o estado de inflamação do tecido gengival ao ativar a via do inflamassoma NLRP3 ⁵².

O uso de inibidores de NLRP3 em estudos clínicos na DM2 e prevenção de suas complicações estão sendo explorados ²⁵. Avaliação experimental sugeriu que a piroptose mediada por NLRP3 tem um papel significativo na periodontite associada ao diabetes em camundongos, indicando ser essa a razão principal da inflamação exacerbada, além de pontuar

a melhora pelo tratamento com metformina ⁵³, o antidiabético mais usado no Brasil, que tem sido alvo de trabalhos avaliando sua ação anti-inflamatória, via NLRP3, na periodontite relacionada ao diabetes ⁵⁴.

Adicionalmente, é importante pontuar que a maioria dos registros prévios são estudos *in vitro* ⁵⁵ e/ou relacionados mais diretamente às interleucinas ⁵⁰; onde, por exemplo, polimorfismos do gene da IL-18, que é produto da ativação dos inflamassomas, também não foram associados com a doença periodontal ⁵⁶.

Sobre o SNP rs6940 de *IFI16*, uma variação não-sinônima que, quando presente, pode alterar a função da proteína final, não foram encontrados estudos relacionados ao diabetes; porém, avaliação de haplótipos, rs6940 e rs1057028, foram significativamente associados com aumento do sangramento à sondagem e das concentrações de patógenos periodontais ¹⁴. Adicionalmente, o haplótipo rs6940T-rs855873G foi identificado como fator de risco para a doença de Beçet, na qual já foi proposto o papel de agentes infecciosos orais no desencadeamento da doença ⁵⁷.

Avaliando a relação dos genótipos com os estádios da periodontite, observou-se que a presença dos genótipos variantes do SNP rs61751523 em *CASP1*, no grupo com apenas periodontite, foi mais comum em indivíduos no estágio II que ao III da doença, sugerindo que essas variantes podem diminuir a velocidade da progressão da doença, sendo um fator de menor susceptibilidade na população estudada. Por se tratar de um SNP não-sinônimo e alterar a sequência de aminoácidos da proteína, sua presença pode diminuir a ação da enzima e, conseqüentemente, a clivagem de pro-IL-1 β , a secreção de IL-1 β madura e a morte celular induzida por caspase-1, entre outras funções. Entretanto, autores já afirmaram que as variantes na caspase-1 humana, incluindo rs61751523, não necessariamente previne doenças auto inflamatórias moderadas e graves ²⁸, o que não extingue a possibilidade de diminuir ou tornar mais lenta a progressão da periodontite.

Por outro lado, Aral et al. (2020) não identificaram diferenças nos níveis de caspase-1 entre indivíduos com gengivite, periodontite crônica e periodontite agressiva em comparação com indivíduos saudáveis, embora uma tendência para níveis aumentados, tenha sido observada nos grupos de doenças ⁵⁸. Adicionalmente, Cheng et al. (2017) observaram em um estudo experimental, que a hipóxia associada a periodontite levou ao aumento da maturação da IL-1 β e da morte celular, induzidas por caspase-1 em espécimes de periodontite ¹³.

O aumento da transcrição do inflamassoma em resposta aos biofilmes supragengivais é compatível com os eventos inflamatórios iniciais na doença periodontal, enquanto a diminuição da transcrição em resposta aos biofilmes subgengivais corrobora com a baixa da resposta imune do hospedeiro, em favor da sobrevivência e persistência do patógeno ⁵⁹, caracterizando a cronicidade da doença, na maioria dos casos. Isso pode sugerir que a expressão dos componentes do inflamassoma pode variar de acordo com o tempo de progressão da doença.

Algumas distribuições genotípicas não estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que pode ter influenciado nas análises. É possível que nos grupos DM2+P (*CASP-1*) e P (*IFI16*) a divergência do equilíbrio aconteceu devido a própria doença, a qual pode promover seleção em direção a um genótipo. Ademais, o tamanho amostral também pode ter influenciado, principalmente os controles saudáveis (*NLRP3*), devido a pequena quantidade. O número amostral baixo pode estar relacionado aos rigorosos critérios de inclusão e exclusão utilizados no estudo, que apesar de caracterizar bem os grupos, evitando vieses na pesquisa, dificultaram a formação de grupos mais numerosos, principalmente em relação ao grupo de indivíduos saudáveis.

Além disso, a adequação a Nova Classificação para Doenças Periodontais ³⁴, também se apresentou como uma dificuldade, visto que as coletas finalizaram antes de sua publicação. Entretanto, isso tornou a amostra mais fidedigna à realidade clínica da doença, principalmente para análises genéticas. Porém, como ainda são poucos os trabalhos com diabetes e doença periodontal utilizando a nova classificação, houve uma restrição para a comparação dos nossos resultados com outros anteriores. Isso é compreensível, pois as pesquisas em periodontia estão num período de transição e adaptação à nova classificação, o que não inviabiliza a qualidade das mesmas ²⁶.

Por fim, diante das evidências científicas apresentadas, novas pesquisas precisam ser realizadas. O presente trabalho leva a sugerir a “caspase-1” como tema importante para outras descobertas. Considerando que essa enzima é ponto em comum entre os inflamassomas, o achado atual é algo relevante e ainda não encontrado na literatura.

CONCLUSÃO

O presente estudo ratifica que fatores epidemiológicos, clínicos e genéticos influenciam no contexto da periodontite, seja na presença ou ausência de diabetes.

Entretanto, não foram encontradas evidências estatísticas da associação dos polimorfismos estudados com a susceptibilidade à diabetes e à periodontite. Porém, para o gene CASP1, a presença de variantes pode estar relacionada a um menor avanço da doença periodontal, dado nunca antes observado.

Diante dos conhecimentos já disponíveis, é importante que estudos continuem sendo executados, buscando esclarecer os fatores genéticos envolvidos na etiologia e desenvolvimento da periodontite, principalmente em pacientes diabéticos; visto a relação dessas patologias, o caráter multifatorial de ambas e a possibilidade de oferecer um tratamento individualizado e eficaz a cada paciente.

‘Não houve conflitos de interesse nesse trabalho.’

REFERÊNCIAS

1. Ianni M, Bruzzesi G, Pugliese D, Porcellini E, Carbone I, Schiavone A, et al. Variations in inflammatory genes are associated with periodontitis. *Immun Ageing*. 2013;10(1):39.
2. Hanes PJ, Krishna R. Characteristics of inflammation common to both diabetes and periodontitis: Are predictive diagnosis and targeted preventive measures possible?. Vol. 1, *EPMA Journal*. EPMA J; 2010. p. 101–16.
3. Genco RJ, Borgnakke WS. Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies. Vol. 83, *Periodontology* 2000. Blackwell Munksgaard; 2020. p. 40–5.
4. Mealey BL, Oates TW. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 2006;77(8):1289–303.
5. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. Vol. 41, *Journal of Periodontal Research*. J Periodontal Res; 2006. p. 361–73.

6. Marchesan JT, Girnary MS, Moss K, Monaghan ET, Egnatz GJ, Jiao Y, et al. Role of inflammasomes in the pathogenesis of periodontal disease and therapeutics. *Periodontol* 2000. 2020;82(1):93–114.
7. Kinane DF, Lappin DF. Immune processes in periodontal disease: a review. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 2002;7(1):62–71.
8. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlari T, et al. Inflammasomes: Current understanding and open questions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011;68(5):765–83.
9. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 821–32.
10. Conforti-Andreoni C, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The inflammasomes in health and disease: From genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):135–45.
11. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:137–61.
12. Lamkanfi M, Dixit VM. In Retrospect: The inflammasome turns 15. Vol. 548, *Nature*. Nature Publishing Group; 2017. p. 534–5.
13. Cheng R, Liu W, Zhang R, Feng Y, Bhowmick NA, Hu T. *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide combines hypoxia to induce caspase-1 activation in periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 14(7).
14. Marchesan JT, Jiao Y, Moss K, Divaris K, Seaman W, Webster-Cyriaque J, et al. Common Polymorphisms in IFI16 and AIM2 Genes Are Associated With Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2017;88(7):663–72.
15. García-Hernández AL, Muñoz-Saavedra ÁE, González-Alva P, Moreno-Fierros L,

Llamosas-Hernández FE, Cifuentes-Mendiola SE, et al. Upregulation of proteins of the NLRP3 inflammasome in patients with periodontitis and uncontrolled type 2 diabetes. *Oral Dis.* 2019;25(2):596–608.

16. Isaza-Guzmán DM, Hernández-Viana M, Bonilla-León DM, Hurtado-Cadavid MC, Tobón-Arroyave SI. Determination of NLRP3 (rs4612666) and IL-1B (rs1143634) genetic polymorphisms in periodontally diseased and healthy subjects. *Arch Oral Biol.* 2016;65:44–51.
17. Isaza-Guzmán DM, Medina-Piedrahíta VM, Gutiérrez-Henao C, Tobón-Arroyave SI. Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status. *J Periodontol.* 2017; 88(12):1329–38.
18. Rocha FRG, Delitto AE, de Souza JAC, González-Maldonado LA, Wallet SM, Rossa Junior C. Relevance of Caspase-1 and Nlrp3 Inflammasome on Inflammatory Bone Resorption in A Murine Model of Periodontitis. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–11.
19. Zhou X, Zhang P, Wang Q, Ji N, Xia S, Ding Y, et al. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA-related kinase 7(Nek7) expression. *J Periodontol.* 2019.
20. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 2009 Sep;157(3):415–22.
21. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(4).
22. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. Vol. 13, *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc

Immunology; 2016. p. 148–59.

23. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019;10(2).
24. He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun.* 2018;9(1).
25. Sepehri Z, Kiani Z, Afshari M, Kohan F, Dalvand A, Ghavami S. Inflammasomes and type 2 diabetes: An updated systematic review. Vol. 192, *Immunology Letters.* Elsevier B.V.; 2017. p. 97–103.
26. Aral K, Berdeli E, Cooper PR, Milward MR, Kapila Y, Karadede Ünal B, et al. Differential expression of inflammasome regulatory transcripts in periodontal disease. *J Periodontol.* 2019 Oct 17;00:1–11.
27. Dong LM, Brennan P, Karami S, Hung RJ, Menashe I, Berndt SI, et al. An analysis of growth, differentiation and apoptosis genes with risk of renal cancer. *PLoS One.* 2009 Mar 24;4(3).
28. Luksch H, Romanowski MJ, Chara O, Tüngler V, Caffarena ER, Heymann MC, et al. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Caspase-1 Differ Considerably in Structure and the Ability to Activate Interleukin-1 β . *Hum Mutat.* 2013;34(1):122–31.
29. Armitage GC. Development of a classification system for current nursing research. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1–6.
30. American Academy of Periodontology. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2015;86(7):835–8.
31. Cიმões R, Siqueira RAC, Souza PRE de, Crovella S, Donos N. A fast method for DEFB1-

- 44C / G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. *Acta Stomatol Croat.* 2014;48(3):208–15.
32. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2015 Jul;86(7):835–8.
 33. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1–6.
 34. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S. Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S1–8.
 35. Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R, Biasotto M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. *Arch Oral Biol.* 2015;60(7):1054–8.
 36. Consortium T 1000 GP. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68–73.
 37. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):1–24.
 38. De Alencar JB, Zacarias JMV, Tsuneto PY, De Souza VH, De Oliveira E Silva C, Visentainer JEL, et al. Influence of inflammasome NLRP3, and IL1B and IL2 gene polymorphisms in periodontitis susceptibility. *PLoS One.* 2020;15(1):1–17.
 39. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics.* 2001;17(8):738–9.

40. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
41. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21–31.
42. Olsen I, Yilmaz Ö. Modulation of inflammasome activity by *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis and associated systemic diseases. Vol. 8, *Journal of Oral Microbiology*. Co-Action Publishing; 2016. p. 1–11.
43. Galdas PM, Cheater F, Marshall P. Men and health help-seeking behaviour: Literature review [Internet]. Vol. 49, *Journal of Advanced Nursing*. J Adv Nurs; 2005. p. 616–23.
44. Enes CC, Nucci LB. Gender and schooling inequalities in risk and protective factors for chronic diseases among Brazilian adults. *J Public Health (Oxf)*. 2018;40(3):e211–8.
45. Jowsey T. Time and chronic illness: a narrative review. Vol. 25, *Quality of Life Research*. Springer International Publishing; 2016. p. 1093–102.
46. Kim S, Lee B, Park M, Oh S, Chin HJ, Koo H. Prevalence of chronic disease and its controlled status according to income level. *Med (United States)*. 2016;95(44).
47. Liu Y, Yu Y, Nickel JC, Iwasaki LR, Duan P, Simmer-Beck M, et al. Gender differences in the association of periodontitis and type 2 diabetes. *Int Dent J*. 2018;68(6):433–40.
48. de Araújo Nobre M, Maló P. Prevalence of periodontitis, dental caries, and peri-implant pathology and their relation with systemic status and smoking habits: Results of an open-cohort study with 22009 patients in a private rehabilitation center. *J Dent*. 2017;67:36–42.
49. Miranda TS, Heluy SL, Cruz DF, da Silva HDP, Feres M, Figueiredo LC, et al. The ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in the serum of chronic periodontitis

patients with and without type 2 diabetes and/or smoking habit. *Clin Oral Investig*. 2019 ;23(2):641–50.

50. Cirelli T, Nepomuceno R, Rios ACS, Orrico SRP, Cirelli JA, Theodoro LH, et al. Genetic polymorphisms in the Interleukins IL1B, IL4, and IL6 are associated with concomitant periodontitis and type 2 diabetes mellitus in Brazilian patients. *J Periodontal Res*. 2020; 55(6):918–30.
51. Klen J, Goričar K, Janež A, Dolžan V. NLRP3 inflammasome polymorphism and macrovascular complications in type 2 diabetes patients. *J Diabetes Res*. 2015.
52. Huang X, Yang X, Ni J, Xie B, Liu Y, Xuan D, et al. Hyperglucose Contributes to Periodontitis: Involvement of the NLRP3 Pathway by Engaging the Innate Immunity of Oral Gingival Epithelium. *J Periodontol*. 2015;86(2):327–35.
53. Zhou X, Wang Q, Nie L, Zhang P, Zhao P, Yuan Q, et al. Metformin ameliorates the NLPP3 inflammasome mediated pyroptosis by inhibiting the expression of NEK7 in diabetic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2020;116.
54. Tan Y, Chen J, Jiang Y, Chen X, Li J, Chen B, et al. The anti-periodontitis action of metformin via targeting NLRP3 inflammasome. *Arch Oral Biol*. 2020;114.
55. Aral K, Milward MR, Cooper PR. Inflammasome dysregulation in human gingival fibroblasts in response to periodontal pathogens. *Oral Dis*. 2020 Dez.
56. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2005;32(5):530–4.
57. Ortiz-Fernández L, García-Lozano JR, Montes-Cano MA, Conde-Jaldón M, Ortego-Centeno N, García-Hernández FJ, et al. Variants of the IFI16 gene affecting the levels of expression of mRNA are associated with susceptibility to Behet disease. *J Rheumatol*.

2015;42(4):695–701.

58. Aral K, Berdeli E, Cooper PR, Milward MR, Kapila Y, Karadede Ünal B, et al. Differential expression of inflammasome regulatory transcripts in periodontal disease. *J Periodontol.* 2020;91(5):606–16.
59. Bostanci N, Meier A, Guggenheim B, Belibasakis GN. Regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasome gene expression levels in gingival fibroblasts by oral biofilms. *Cell Immunol.* 2011;270(1):88–93.

TABELAS

Tabela 1. Caracterização clínico-epidemiológica de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite, com apenas periodontite e controles saudáveis do Estado de Pernambuco.

Variáveis Clínico-epidemiológicas	Indivíduos			Testes Univariados OR (IC95%), p-value		
	DM2+P (n = 111)	P (n=109)	CS (n=77)	DM2+P vs P	DM2+P vs CS	P vs CS
Sexo[#]						
Feminino	81 (73.0)	83 (76.2)	69 (89.6)		Referência	
Masculino	30 (27.0)	26 (23.8)	8 (10.4)	1.18 (0.62-2.28), 0.644	3.18 (1.31-8.56), 0.005*	2.69 (1.09-7.32), 0.021*
Idade^a						
Mediana (IQR)	59 (52-65)	52 (45-59)	47 (40-56)	< 0.0001*	<0.0001*	0.0054*
Estado Civil[#]						
Casado	69 (62.2)	52 (47.7)	38 (49.4)		Referência	
Solteiro	22 (19.8)	36 (33.0)	23 (29.9)	0.46 (0.23-0.92), 0.025*	0.53 (0.24-1.13), 0.102	1.14 (0.56-2.37), 0.735
Divorciado	9 (8.1)	11 (10.1)	11 (14.3)	0.62 (0.21-1.78), 0.341	0.45 (0.15-1.32), 0.133	0.73 (0.26-2.08), 0.633
Viúvo	10 (9.0)	10 (9.2)	4 (5.2)	0.76 (0.26-2.19), 0.630	1.37 (0.36-6.41), 0.769	1.82 (0.48-8.54), 0.393
Não-informado	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (1.3)	nc	nc	nc
Renda (salário-mínimo) ^a						
Mediana (IQR)	1 (1-2)	1 (1-2.9)	2 (1.1-4.5)	0.8571	<0.0001*	0.0002*
Histórico de Tabagismo[#]						
Não	67 (60.4)	75 (68.8)	66 (85.7)		Referência	
Sim	44 (39.6)	34 (31.2)	11 (14.3)	1.45 (0.80-2.63), 0.207	3.91 (1.80-9.15), 0.0002*	2.71 (1.22-6.41), 0.009*
Escolaridade[#]						
Analfabeto	10 (9.0)	1 (0.9)	1 (1.3)	13.2 (1.73-597.78), 0.003*	9.77 (1.27-445.48), 0.019*	0.74 (0.01-59.68), 1.000
Fundamental Incompleto	29 (26.1)	16 (14.7)	5 (6.5)	2.43 (1.08-5.62), 0.025*	5.70 (1.88-21.15), 0.001*	2.35 (0.73-9.01), 0.138
Fundamental Completo	16 (14.4)	13 (11.9)	3 (3.9)	1.66 (0.65-4.30), 0.280	5.24 (1.32-30.62), 0.009*	3.17 (0.78-18.68), 0.095
Médio Incompleto	9 (8.1)	8 (7.3)	5 (6.5)	1.51 (0.46-5.03), 0.592	1.79 (0.48-7.53), 0.389	1.18 (0.31-5.01), 1.000
Médio Completo	34 (30.6)	46 (42.2)	34 (44.1)		Referência	
Superior Incompleto	2 (1.8)	5 (4.6)	3 (3.9)	0.54 (0.05-3.57), 0.695	0.67 (0.05-6.24), 1.000	1.23 (0.22-8.46), 1.000
Superior Completo	6 (5.4)	9 (8.2)	15 (19.5)	0.90 (0.24-3.16), 1.000	0.40 (0.11-1.27), 0.131	0.45 (0.15-1.24), 0.105
Pós-graduação	2 (1.8)	10 (9.2)	11 (14.3)	0.27 (0.03-1.41), 0.117	0.18 (0.02-0.94), 0.031*	0.67 (0.23-1.97), 0.466
Não sabe	3 (2.7)	1 (0.9)	0 (0.0)	nc	nc	nc

Número de Dentes^a						
Mediana (IQR)	15 (11-21)	20 (13.5-23.5)	22 (17-25.5)	0.0004*	<0.0001*	0.0259*
Profundidade de Sondagem (mm)^a						
Mediana (IQR)	2.41 (2.01-2.83)	2.14 (1.92-2.47)	1.92 (1.75-2.02)	0.008*	<0.0001*	<0.0001*
Nível de Inserção Clínica (mm)^a						
Mediana (IQR)	3.5 (2.79-4.89)	3.11 (2.56-3.86)	2 (1.86-2.19)	0.0086*	<0.0001*	<0.0001*
Índice de Sangramento (%)^a						
Mediana (IQR)	6.67 (1.04-19.44)	12.5 (3.06-25.48)	2.63 (0.0-8.92)	0.0139*	0.0003*	<0.0001*
Índice de Placa (%)^a						
Mediana (IQR)	21.87 (7.95-34.0)	19.74 (8.07-33.01)	12.5 (2.64-24.4)	0.7559	0.0017*	0.0020*
Estádio de Periodontite[#]						
I	5 (4.5)	9 (8.2)	-	0.54 (0.13-1.92), 0.399	-	-
II	13 (11.7)	18 (16.5)	-	0.70 (0.29-1.66), 0.425	-	-
III	63 (56.7)	61 (56.0)	-	Referência	-	-
IV	30 (27.0)	21 (19.3)	-	1.38 (0.68-2.83), 0.405	-	-
Grau de Periodontite[#]						
A	0 (0.0)	8 (7.4)	-	nc	-	-
B	66 (59.5)	65 (59.6)	-	Referência	-	-
C	45 (40.5)	36 (33.0)	-	1.23 (0.68-2.23), 0.482	-	-
Extensão de Periodontite[#]						
Localizada	19 (17.1)	21 (19.3)	-	0.87 (0.41-1.82), 0.728		
Generalizada	92 (82.9)	88 (80.7)	-	Referência		

IQR = Interquartil; n= número amostral; nc= não-calculado; *= p-value significativo (p<0.05); IC95% = Intervalo de Confiança de 95%; OR = Odds ratio; DM2+P = Diabetes Mellitus tipo 2 + Periodontite; P= Periodontite; CS = Controle Saudável; # = Teste Exato de Fisher; ^a = Teste de Mann-Whitney

Tabela 2. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas de SNPs nos genes *NLRP3*, *CASP1* e *IFI16* em indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P), com apenas periodontite (P) e controles saudáveis (CS) de uma população do Nordeste brasileiro.

Genes (SNPs) Alelos/ Genótipos	Indivíduos			Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value		
	DM2+P n (%)	P n (%)	CS n (%)	DM2+P vs CS	P vs CS	DM2+P vs P
<i>NLRP3</i> (rs35829419)						
C	216 (96,8)	195 (96,5)	134 (96,7)		Referência	
A	7 (3,2)	7 (3,5)	6 (4,3)	0.72 (0.20-2.67), 0.574	0.80 (0.22-2.96), 0.777	0.90 (0.26-3.08), 1.000
CC	101 (93,5)	94 (93,1)	65 (92,9)		Referência	
AC	7 (6,5)	07 (6,9)	4 (5,7)	1.12 (0.27-5.45), 1.000	1.21 (0.29-5.86), 1.000	0.93 (0.27-3.24), 1.000
AA	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	nc	nc	nc
EHW	0,121	0,130	6,447			
<i>CASP1</i> (rs61751523)						
T	198 (94,3)	150 (93,8)	118 (95,2)		Referência	
C	12 (5,7)	10 (6,2)	6 (4,8)	1.19 (0.40-3.97), 0.807	1.31 (0.42-4.52), 0.796	0.91(0.35-2.42), 0.828
TT	93 (88,6)	71 (88,8)	56 (90,3)		Referência	
CT	12 (11,4)	8 (10,0)	6 (9,7)	1.20 (0.39-4.13), 0.801	1.05 (0.30-3.90), 1.000	1.14 (0.40-3.41), 0.816
CC	0 (0,0)	1 (1,2)	0 (0,0)	nc	nc	nc
EHW	3,857	1,721	0,160			
<i>IFI16</i> (rs6940)						
A	155 (91,2)	156 (86,7)	58 (85,3)		Referência	
T	15 (8,8)	24 (13,3)	10 (14,7)	0.56 (0.22-1.48), 0.241	0.89 (0.38-2.22), 0.837	0.63 (0.29-1.30), 0.234
AA	71 (83,5)	70 (77,8)	26 (76,5)		Referência	
AT	13 (15,3)	16 (17,8)	6 (17,6)	0.79 (0.25-2.83), 0.780	0.99 (0.32-3.43), 1.000	0.80 (0.33-1.93), 0.685
TT	1 (1,2)	4 (4,4)	2 (5,9)	0.17 (0.003-3.73), 0.187	0.74 (0.10-8.70), 0.665	0.25 (0.01-2.59), 0.366
EHW	0,208	4,793	2,990			

*p-value significativo (<0.05); EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; nc= não calculado; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; CS= Indivíduos controles saudáveis.

Tabela 3. Distribuição de genótipos variantes de SNPs nos genes *NLRP3*, *IFI16* e *CASP1* de acordo com os estádios da doença periodontal em indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P) e com apenas periodontite (P).

Genes/ Genótipos variantes	Estádios da Doença Periodontal				Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value					
	I n (%)	II n (%)	III n (%)	IV n (%)	I vs II	I vs III	I vs IV	II vs III	II vs IV	III vs IV
DM2+P										
<i>NLRP3</i> (rs35829419)										
-	5 (100,0)	12 (100,0)	59 (93,7)	25 (89,3)	Referência					
+	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (6,3)	3 (10,7)	nc	ns	ns	ns	ns	ns
<i>IFI16</i> (rs6940)										
-	4 (80,0)	5 (71,4)	43 (84,3)	19 (86,4)	Referência					
+	1 (20,0)	2 (28,6)	8 (15,7)	3 (13,6)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>CASP1</i> (rs61751523)										
-	5 (100,0)	10 (100,0)	54 (88,5)	24 (82,8)	Referência					
+	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (11,5)	5 (17,2)	nc	ns	ns	ns	ns	Ns
P										
<i>NLRP3</i> (rs35829419)										
-	9 (100,0)	16 (94,1)	50 (92,6)	19 (90,5)	Referência					
+	0 (0,0)	1 (5,9)	4 (7,4)	2 (9,5)	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
<i>IFI16</i> (rs6940)										
-	8 (88,9)	10 (66,7)	39 (81,3)	13 (72,2)	Referência					
+	1 (11,1)	5 (33,3)	9 (18,7)	5 (27,8)	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
<i>CASP1</i> (rs61751523)										
-	8 (100,0)	10 (71,4)	41 (95,3)	12 (80,0)	Referência					
+	0 (0,0)	4 (28,6)	2 (4,7)	3 (20,0)	ns	ns	ns	0.13 (0.01 - 1.03), 0.027*	ns	Ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns= não significativo; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Distribuição de genótipos variantes de SNPs nos genes *NLRP3*, *IFI16* e *CASP1* de acordo com o grau e extensão da doença periodontal em indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P) e apenas com periodontite (P).

Gene (SNP) Genótipo variante	Doença Periodontal								
	Grau						Extensão		
	A n (%)	B n (%)	C n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value			Localizada n (%)	Generalizada n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), (p-value)
				A vs B	A vs C	B vs C			
Diabetes Mellitus Tipo 2 + Periodontite									
NLRP3 (rs35829419)									
-	0 (0,0)	61 (93,8)	40 (93,0)		Referência		18 (94,7)	83 (93,3)	Referência
+	0 (0,0)	4 (6,2)	3 (7,0)	nc	nc	ns	1 (5,3)	6 (6,7)	ns
IFI16 (rs6940)									
-	0 (0,0)	46 (88,5)	25 (75,8)		Referência		12 (85,7)	59 (83,1)	Referência
+	0 (0,0)	6 (11,5)	8 (24,2)	nc	nc	ns	2 (14,3)	12 (16,9)	ns
CASP1 (rs61751523)									
-	0 (0,0)	58 (93,5)	35 (81,4)		Referência		17 (100)	76 (86,4)	Referência
+	0 (0,0)	4 (6,5)	8 (18,6)	nc	nc	ns	0 (0,0)	12 (13,6)	ns
Periodontite									
NLRP3 (rs35829419)									
-	7 (87,5)	59 (96,7)	28 (87,5)		Referência		19 (95,0)	75 (92,6)	Referência
+	1 (12,5)	2 (3,3)	4 (12,5)	ns	ns	ns	1 (5,0)	6 (7,4)	ns
IFI16 (rs6940)									
-	5 (71,4)	43 (78,2)	22 (78,6)		Referência		13 (72,2)	57 (79,2)	Referência
+	2 (28,6)	12 (21,8)	6 (21,4)	ns	ns	ns	5 (27,8)	15 (20,8)	ns
CASP1 (rs61751523)									
-	5 (83,3)	48 (94,1)	18 (78,3)		Referência		15 (93,8)	56 (87,5)	Referência
+	1 (16,7)	3 (5,9)	5 (21,7)	ns	ns	ns	1 (6,2)	8 (12,5)	ns

*p-value significativo (<0,05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns=não é significativo; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC

Tabela S2. Distribuição dos genótipos variantes de SNPs nos genes *NLRP1*, *CASP1* e *IFI16* de acordo com as variáveis clínicas intraorais entre indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P), com apenas periodontite (P) e controles saudáveis (CS) de uma população do Nordeste brasileiro.

Variáveis Clínicas Intraorais			<i>NLRP3</i> (rs35829419)						<i>IFI16</i> (rs6940)						<i>CASP1</i> (rs61751523)					
			Indivíduos			Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value			Indivíduos			Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value			Indivíduos			Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value		
			DM2+ P n (%)	P n (%)	CS n (%)	DM2 vs CS	P vs CS	DM2+P vs P	DM2+ P n (%)	P n (%)	CS n (%)	DM2 vs CS	P vs CS	DM2+P vs P	DM2+ P n (%)	P n (%)	CS n (%)	DM2 vs CS	P vs CS	DM2+P vs P
Número de Dentes	<20	-	72 (91,1)	51 (92,7)	27 (90,0)		Referência		54 (83,1)	39 (79,6)	13 (81,3)		Referência		68 (87,2)	37 (86)	20 (83,3)		Referência	
		+	7 (8,9)	4 (7,3)	3 (10,0)	ns	ns	ns	11 (16,9)	10 (20,4)	3 (18,7)	ns	ns	ns	10 (12,8)	6 (14)	4 (16,4)	ns	ns	ns
	≥20	-	29 (100)	43 (93,5)	38 (95,0)		Referência		17 (85)	31 (75,6)	12 (70,6)		Referência		25 (92,6)	34 (91,9)	36 (94,7)		Referência	
		+	0 (0,0)	3 (6,5)	2 (5,0)	ns	ns	ns	3 (15)	10 (24,4)	5 (29,4)	ns	ns	ns	2 (7,4)	3 (8,1)	2 (5,3)	ns	ns	ns
Profundidade de Sondagem (mm)	<4	-	98 (93,3)	92 (92,9)	65 (92,9)		Referência		69 (84,1)	68 (77,3)	26 (76,5)		Referência		90 (88,2)	70 (88,6)	56 (90,3)		Referência	
		+	7 (6,4)	7 (7,1)	5 (7,1)	ns	ns	ns	13 (15,9)	20 (22,7)	8 (23,5)	ns	ns	ns	12 (11,8)	9 (11,4)	6 (9,7)	ns	ns	ns
	≥ 4	-	3 (100)	2 (100)	0 (0,0)		Referência		2 (66,7)	2 (100)	0 (0,0)		Referência		3 (100)	1 (100)	0 (0,0)		Referência	
		+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc
Índice de Sangramento	<10%	-	64 (92,8)	41 (97,6)	51 (92,7)		Referência		50 (86,2)	25 (69,4)	23 (79,3)		Referência		60 (88,2)	33 (94,3)	48 (94,1)		Referência	
		+	5 (7,2)	1 (2,4)	4 (7,3)	ns	ns	ns	8 (13,8)	11 (30,6)	6 (20,7)	ns	ns	ns	8 (11,8)	2 (5,7)	3 (5,9)	ns	ns	ns
	≥10%	-	37 (94,9)	53 (89,8)	14 (93,3)		Referência		21 (77,8)	45 (83,3)	3 (60,0)		Referência		33 (89,2)	38 (84,4)	8 (72,7)		Referência	
		+	2 (5,1)	6 (10,2)	1 (6,7)	ns	ns	ns	06 (22,2)	9 (16,7)	2 (40,0)	ns	ns	ns	4 (10,8)	7 (15,6)	3 (27,3)	ns	ns	ns
Placa Visível	Presente	-	84 (92,3)	82 (93,2)	53 (93,0)		Referência		58 (81,7)	62 (78,5)	22 (81,5)		Referência		76 (87,4)	64 (90,1)	43 (89,6)		Referência	
		+	7 (7,7)	6 (6,8)	4 (7,0)	ns	ns	ns	13 (18,3)	17 (21,5)	5 (18,5)	ns	ns	ns	11 (12,6)	7 (9,9)	5 (10,4)	ns	ns	ns
	Ausente	-	17 (100)	12 (92,3)	12 (92,3)		Referência		13 (92,9)	8 (72,7)	4 (57,1)		Referência		16 (94,1)	7 (77,8)	13 (92,9)		Referência	
		+	0 (0,0)	1 (7,7)	1 (7,7)	ns	ns	ns	1 (7,1)	3 (27,3)	3 (42,9)	ns	ns	ns	1 (5,9)	2 (22,2)	1 (7,1)	ns	ns	ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns= não significativo; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC.

Tabela S3. Distribuição dos genótipos variantes dos genes *NLRP1*, *CASP1* e *IFI16* de acordo com os estádios da doença periodontal entre indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P) e com apenas periodontite (P).

Genes (SNPs) Genótipos variantes	Estádios da Periodontite											
	I		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	II		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	III		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	IV		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value
	DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)	
NLRP3 (rs35829419)												
-	5 (100,0)	9 (100,0)	Referência	12 (100,0)	16 (94,1)	Referência	59 (93,7)	50 (92,6)	Referência	25 (89,3)	19 (90,5)	Referência
+	0 (0,0)	0 (0,0)	ns	0 (0,0)	1 (5,9)	ns	4 (6,3)	4 (7,4)	ns	3 (10,7)	2 (9,5)	ns
IFI16 (rs6940)												
-	4 (80,0)	8 (88,9)	Referência	5 (71,4)	10 (66,7)	Referência	43 (84,3)	39 (81,3)	Referência	19 (86,4)	13 (72,2)	Referência
+	1 (20,0)	1 (11,1)	ns	2 (28,6)	5 (33,3)	ns	8 (15,7)	9 (18,7)	ns	3 (13,6)	5 (27,8)	ns
CASP1 (rs61751523)												
-	5 (100,0)	8 (100,0)	Referência	10 (100,0)	10 (71,4)	Referência	54 (88,5)	41 (95,3)	Referência	24 (82,8)	12 (80,0)	Referência
+	0 (0,0)	0 (0,0)	ns	0 (0,0)	4 (28,6)	ns	7 (11,5)	2 (4,7)	ns	5 (17,2)	3 (20)	ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns= não significativo; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC

Tabela S4. Distribuição dos genótipos variantes dos genes *NLRP1*, *CASP1* e *IFI16* de acordo com o grau e extensão da doença periodontal entre indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P) e com apenas periodontite (P).

Gene (SNPs)/ Genótip os variantes	Doença Periodontal														
	Grau									Extensão					
	A		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p- value	B		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	C		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	Localizada		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	Generalizada		Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value
	DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)		DM2+P n (%)	P n (%)	
NLRP3 (rs35829419)															
-	0 (0,0)	7 (87,5%)	Referência	61 (93,8)	59 (96,7)	Referência	40 (93)	28 (87,5)	Referência	18 (94,7)	19 (95)	Referência	83 (93,3)	75 (92,6)	Referência
+	0 (0,0)	1 (12,5%)	nc	4 (6,2)	2 (3,3)	ns	3 (7)	4 (12,5)	ns	1 (5,3)	1 (5)	ns	6 (6,7)	6 (7,4)	ns
IFI16 (rs6940)															
-	0 (0,0)	5 (71,4%)	Referência	46 (88,5)	43 (78,2)	Referência	25 (75,8)	22 (78,6)	Referência	12 (85,7)	13 (72,2)	Referência	59 (83,1)	57 (79,2)	Referência
+	0 (0,0)	2 (28,6%)	nc	6 (11,5)	12 (21,8)	ns	8 (24,2)	6 (21,4)	ns	2 (14,3)	5 (27,8)	ns	12 (16,9)	15 (20,8)	ns
CASP1 (rs61751523)															
-	0 (0,0)	5 (83,3%)	Referência	58 (93,5)	48 (94,1)	Referência	35 (81,4)	18 (78,3)	Referência	17 (100,0)	15 (93,8)	Referência	76 (86,4)	56 (87,5)	Referência
+	0 (0,0)	1 (16,7%)	nc	4 (6,5)	3 (5,9)	ns	8 (18,6)	5 (21,7)	ns	0 (0,0)	1 (6,3)	ns	12 (13,6)	8 (12,5)	ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns= não significativo; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC

Tabela S5. Distribuição de genótipos variantes de SNPs nos genes *NLRP3*, *IFI16* e *CASP1* de variáveis clínicas intraorais em indivíduos com diabetes tipo 2 e periodontite (DM2+P), apenas com periodontite (P) e controles saudáveis (CS).

Gene (SNPs)/ Genótipos variantes	Número de Dentes			Profundidade de sondagem			Índice de Sangramento			Placa Visível		
	<20 n (%)	≥20 n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	<4 n (%)	≥4 n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	<10% n (%)	≥10% n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p-value	Presente n (%)	Ausente n (%)	Teste Exato de Fisher OR (IC95%), p- value
DM2+P												
NLRP3												
-	72 (91,1)	29 (100,0)	Referência	98 (93,3)	3 (100,0)	Referência	64 (92,8)	37 (94,9)	Referência	84 (92,3)	17 (100,0)	Referência
+	7 (8,9)	0 (0,0)	ns	7 (6,7)	0 (0,0)	ns	5 (7,2)	2 (5,1)	ns	7 (7,7)	0 (0,0)	ns
IFI16												
-	54 (83,1)	17 (85,0)	Referência	69 (84,1)	2 (66,7)	Referência	50 (86,2)	21 (77,8)	Referência	58 (81,7)	13 (92,9)	Referência
+	11 (16,9)	3 (15,0)	ns	13 (15,9)	1 (33,7)	ns	8 (13,8)	6 (22,2)	ns	13 (18,3)	1 (7,1)	ns
CASP1												
-	68 (87,2)	25 (92,6)	Referência	90 (88,2)	3 (100,0)	Referência	60 (88,2)	33 (89,2)	Referência	76 (87,4)	16 (94,1)	Referência
+	10 (12,8)	2 (7,4)	ns	12 (11,8)	0 (0,0)	ns	8 (11,8)	4 (10,8)	ns	11 (12,6)	1 (5,9)	ns
P												
NLRP3												
-	51 (92,7)	43 (93,5)	Referência	92 (92,9)	2 (100,0)	Referência	41 (97,6)	53 (89,8)	Referência	82 (93,2)	12 (92,3)	Referência
+	4 (7,3)	3 (6,5)	ns	7 (7,1)	0 (0,0)	ns	1 (2,4)	6 (10,2)	ns	6 (6,8)	1 (7,7)	ns
IFI16												
-	39 (79,6)	31 (75,6)	Referência	68 (77,3)	2 (100,0)	Referência	25 (69,4)	45 (83,3)	Referência	62 (78,5)	8 (61,5)	Referência
+	10 (20,4)	10 (24,4)	ns	20 (22,7)	0 (0,0)	ns	11 (30,6)	9 (16,7)	ns	17 (21,5)	3 (38,5)	ns
CASP1												
-	37 (86,0)	34 (91,9)	Referência	70 (88,6)	1 (100,0)	Referência	33 (94,3)	38 (84,4)	Referência	64 (90,1)	7 (77,8)	Referência
+	6 (14,0)	3 (8,1)	ns	9 (11,4)	0 (0,0)	ns	2 (5,7)	7 (15,6)	ns	7 (9,9)	2 (22,2)	ns
CS												
NLRP3												
-	27 (90,0)	38 (95,0)	Referência	65 (92,6)	0 (0,0)	Referência	51 (92,7)	14 (93,3)	Referência	53 (93,0)	12 (92,3)	Referência
+	3 (10,0)	2 (5,0)	ns	5 (7,4)	0 (0,0)	nc	4 (7,3)	1 (6,7)	ns	4 (7,0)	1 (7,7)	1

<i>IFI16</i>												
-	13 (81,3)	12 (70,6)	Referência	26 (76,5)	0 (0,0)	Referência	23 (79,3)	3 (60,0)	Referência	22 (81,5)	4 (57,1)	Referência
<i>CASP1</i>	3 (18,8)	5 (29,4)	ns	8 (23,5)	0 (0,0)	nc	6 (20,7)	2 (40,0)	ns	5 (18,5)	3 (42,9)	ns
-	20 (83,3)	36 (94,7)	Referência	56 (90,3)	0 (0,0)	Referência	48 (94,1)	8 (72,7)	Referência	43 (89,6)	13 (92,9)	Referência
+	4 (16,7)	2 (5,3)	ns	6 (9,7)	0 (0,0)	nc	3 (5,9)	3 (27,3)	ns	5 (10,4)	1 (7,1)	ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; ns= não significativo; DM2+P= Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P= Indivíduos com apenas periodontite; nc=não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: *NLRP3* – AA+AC; *IFI16* – AT+TT; *CASP1* – CT+CC.

REFERÊNCIAS

1. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. Vol. 394, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 249–60.
2. Dahlen G, Fejerskov O, Manji F. Current concepts and an alternative perspective on periodontal disease. Vol. 20, *BMC Oral Health*. BioMed Central Ltd; 2020.
3. Hanes PJ, Krishna R. Characteristics of inflammation common to both diabetes and periodontitis: Are predictive diagnosis and targeted preventive measures possible?. Vol. 1, *EPMA Journal*. EPMA J; 2010. p. 101–16.
4. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010;1801(3):289–98.
5. Genco RJ, Borghnakke WS. Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies. Vol. 83, *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard; 2020. p. 40–5.
6. Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015 Oct ;69(1):221–54.
7. Chang PC, Chien LY, Chong LY, Kuo YP, Hsiao JK. Glycated matrix up-regulates inflammatory signaling similarly to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*. 2013 Apr;48(2):184–93.
8. Odegaard JI, Chawla A. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(3).
9. Marchesan JT, Girnary MS, Moss K, Monaghan ET, Egnatz GJ, Jiao Y, et al. Role of inflammasomes in the pathogenesis of periodontal disease and therapeutics. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):93–114.
10. Shibata K. Historical aspects of studies on roles of the inflammasome in the pathogenesis of periodontal diseases. Vol. 33, *Molecular Oral Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 203–11.
11. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Vol. 140, *Cell*. 2010. p. 821–32.

12. Lamkanfi M, Dixit VM. In Retrospect: The inflammasome turns 15. Vol. 548, Nature. Nature Publishing Group; 2017. p. 534–5.
13. Aral K, Berdeli E, Cooper PR, Milward MR, Kapila Y, Karadede Ünal B, et al. Differential expression of inflammasome regulatory transcripts in periodontal disease. J Periodontol. 2019 Oct 17;00:1–11.
14. Isaza-Guzmán DM, Medina-Piedrahíta VM, Gutiérrez-Henao C, Tobón-Arroyave SI. Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status. J Periodontol. 2017 Dec;88(12):1329–38.
15. De Alencar JB, Zacarias JMV, Tsuneto PY, De Souza VH, De Oliveira E Silva C, Visentainer JEL, et al. Influence of inflammasome NLRP3, and IL1B and IL2 gene polymorphisms in periodontitis susceptibility. PLoS One. 2020;15(1):1–17.
16. Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M. Genome-wide association studies in diverse populations. Vol. 11, Nature Reviews Genetics. Nat Rev Genet; 2010. p. 356–66.
17. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Vol. 17, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Publishing Group; 2018. p. 588–606.
18. Sepehri Z, Kiani Z, Afshari M, Kohan F, Dalvand A, Ghavami S. Inflammasomes and type 2 diabetes: An updated systematic review. Vol. 192, Immunology Letters. Elsevier B.V.; 2017. p. 97–103.
19. Gomes BF, Accardo C de M. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus. Vol. 17, Einstein (Sao Paulo, Brazil). NLM (Medline); 2019. p. 1-5.
20. Huang X, Yang X, Ni J, Xie B, Liu Y, Xuan D, et al. Hyperglucose Contributes to Periodontitis: Involvement of the NLRP3 Pathway by Engaging the Innate Immunity of Oral Gingival Epithelium. J Periodontol. 2015 Feb;86(2):327–35.
21. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. Clin Exp Immunol. 2009 Sep;157(3):415–22.

22. Xue F, Shu R, Xie Y. The expression of NLRP3, NLRP1 and AIM2 in the gingival tissue of periodontitis patients: RT-PCR study and immunohistochemistry. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun 1;60(6):948–58.
23. Marchesan JT, Jiao Y, Moss K, Divaris K, Seaman W, Webster-Cyriaque J, et al. Common Polymorphisms in IFI16 and AIM2 Genes Are Associated With Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2017 Jul 1;88(7):663–72.
24. Li R, Tian C, Postlethwaite A, Jiao Y, Garcia-Godoy F, Pattanaik D, et al. Rheumatoid arthritis and periodontal disease: What are the similarities and differences? Vol. 20, *International Journal of Rheumatic Diseases*. Blackwell Publishing; 2017. p. 1887–901.
25. Cubillos-Angulo JM, Arriaga MB, Melo MGM, Silva EC, Alvarado-Arnez LE, de Almeida AS, et al. Polymorphisms in interferon pathway genes and risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in contacts of tuberculosis cases in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2020 Mar 1;92:21–8.
26. Jurevic RJ, Chrisman P, Mancl L, Livingston R, Dale B a. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet Test.* 2002;6(4):261–9.
27. Armitage GC. Development of a classification system for current nursing research. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1–6.
28. American Academy of Periodontology. American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2015;86(7):835–8.
29. Cimões R, Siqueira RAC, Souza PRE de, Crovella S, Donos N. A fast method for DEFB1-44C / G SNP Genotyping in Brazilian Patients with Periodontitis. *Acta Stomatol Croat.* 2014;48(3):208–15.
30. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S. Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45(Suppl 20):S1-S8.
31. Bello DMA, Araújo NC, Siqueira RAC de, Souza PRE de, Cimões R.

COMPARAÇÃO DE CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PERIODONTITE EM DIABÉTICOS. *Braz J Periodontol.* 2016;26(03):14–8.

32. Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R, Biasotto M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Impact of DEFB1 gene regulatory polymorphisms on hBD-1 salivary concentration. *Arch Oral Biol.* 2015;60(7):1054–8.
33. Consortium T 1000 GP. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68–73.
34. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):1–24.
35. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis [Internet].* 2019;10(2).
36. Rocha FRG, Delitto AE, de Souza JAC, González-Maldonado LA, Wallet SM, Rossa Junior C. Relevance of Caspase-1 and Nlrp3 Inflammasome on Inflammatory Bone Resorption in A Murine Model of Periodontitis. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–11.
37. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics.* 2001;17(8):738–9.
38. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E CIRURGIA BUCO-FACIAL

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE CRÔNICA COM A QUALIDADE DE VIDA, A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D E POLIMORFISMOS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2”** que está sob a responsabilidade da pesquisadora Renata Cimões Jovino Silveira (Professora da Pós-Graduação em odontologia da UFPE); Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da UFPE – Avenida Professor Moraes Rego, 1235 – Recife – PE, CEP: 50670-901; telefone: (81)21268817; e-mail: renata.cimoes@globo.com Telefone para contato: 21268817. Também participam dessa pesquisa: Rayanne Soraia Aguiar de Melo Dias (mestranda em odontologia UFPE-999495129), Felipe Rodrigues de Almeida (mestrando em odontologia UFPE - 999728554), Roberto Carlos Mourão Pinho (doutorando em odontologia UFPE - 988098147) e Professor Francisco Bandeira (Chefe do setor de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães- 31841601).

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a associação entre a periodontite crônica (chamada popularmente de piorréia), a deficiência da vitamina D e a presença de alterações genéticas que estão ligadas ao sistema de defesa do nosso corpo em pacientes diabéticos tipo 2, bem como a percepção de qualidade de vida dos mesmos. Cada paciente será avaliado através de um exame clínico, onde será medida a profundidade da gengiva ao redor dos dentes, observando se haverá algum sangramento e se há placa bacteriana visível (que se formam dos restos de comida deixados pela má escovação) e a altura do osso ao redor dos dentes. No mesmo momento serão coletadas amostras de saliva (o paciente cospe num tubinho estéril o que conseguir) e amostras de células da parte interna da bochecha da boca (esfregando levemente com uma escova pequena). Os pacientes também responderão a um questionário para avaliação da percepção de qualidade de vida.

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

Ao paciente submetido à pesquisa, poderá ocorrer o risco de, durante o exame clínico e/ou ao responder ao questionário de 14 perguntas sobre qualidade de vida, ficar constrangido e ocorrer sangramento gengival e/ou desconforto leve (esses dois últimos no caso do exame clínico). Esses sintomas e o constrangimento serão minimizados com a realização do exame e do questionário em local reservado, por profissional qualificado e respeitando a individualidade de cada paciente.

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

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

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

indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

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

(Pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

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

Local e data _____



Assinatura do participante: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA

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

FICHA CLÍNICA

Nº do paciente: _____ Prontuário: _____

1. Nome: _____

2. Nacionalidade: _____

3. Sexo: _____

4. Idade: _____

5. Estado civil: _____

6. Fone: _____ cel: _____

7. Renda (salários): _____

8. Hábito de fumar:

() nunca fumou

() ex-fumante: _____ (anos que parou)

() fumante: _____ (quantos por dia)

9. Escolaridade:

I. () Não sabe ler ou escrever

II. () 1º grau incompleto

III. () 1º grau completo

IV. () 2º grau incompleto

V. () 2º grau completo

VI. () Universidade incompleta

VII. () Universidade completa

VIII. () Pós-graduação

IX. () Não sei

10. Tipo de diabetes: _____

11. Diabético há quanto tempo: _____

12. Medicamentos que utiliza: _____

13. Usa insulina? Tipo e dose? Há quanto tempo? _____

FICHA PERIODONTAL

PACIENTE: _____

DATA: _____

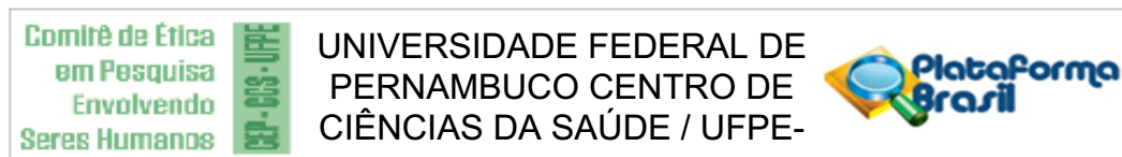
Dente	Sondagem (mm)						Recessão Gengival (mm)						Furca			Mob
	Vestibular			Palatina			Vestibular			Palatina						
	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	M	D	P	
18																
17																
16																
15																
14																
13																
12																
11																
21																
22																
23																

24																
25																
26																
27																
28																
38																
37																
36																
35																
34																
33																
32																
31																
41																
42																
43																
44																
45																
46																
47																
48																

SANGRAMENTO: Faces _____ % _____



ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49166415.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.310.208

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

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

Objetivos Específicos:

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

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

Bairro: Cidade Universitária

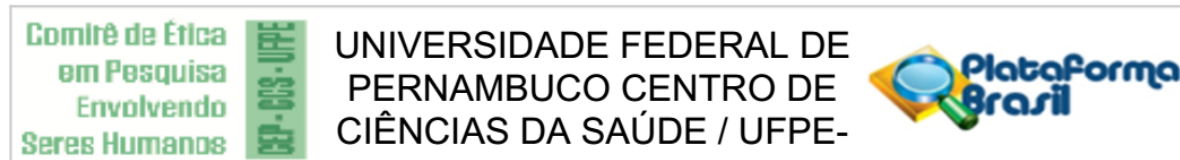
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão adequados para a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

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

Bairro: Cidade Universitária

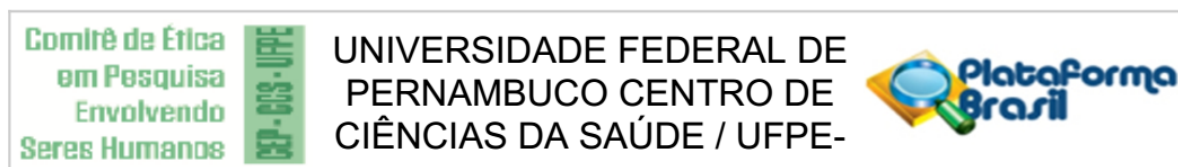
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

- 1- Os currículos de todos os pesquisadores estão anexados;
- 2- Folha de Rosto devidamente preenchida e carimbada;
- 3- O cronograma e orçamento estão adequadas a proposta;
- 4- A Carta de Anuência do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães, permitindo a coleta do material biológico nos Diabéticos.
- 5- Carta de anuência do Laboratório de Biologia Molecular, no Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, onde serão processados os materiais;
- 6- Carta de anuência da Clínica da Pós-graduação em odontologia-UFPE;
- 7- Carta de Anuência do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva;
- 8- O TCLE em linguagem clara e acessível aos participantes.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

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

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

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

Bairro: Cidade Universitária

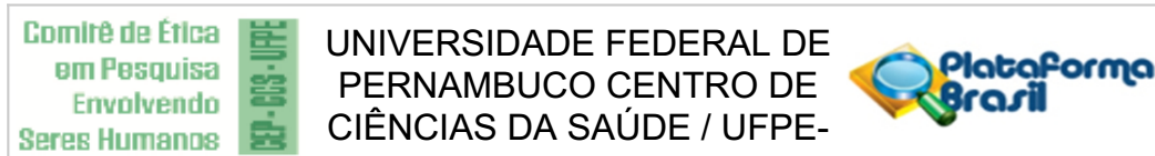
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.310.208

Resolução CNS/MS Nº 466/12).

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/10/2015 17:29:13		Aceito
Outros	carta_resposta.docx	09/10/2015 17:28:00	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/10/2015 17:12:55	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/10/2015 17:12:19	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	09/09/2015 21:51:45	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	02/09/2015 15:27:31	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Roberto.pdf	22/08/2015 15:10:56	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Renata.pdf	22/08/2015 15:10:15	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Rayanne.pdf	22/08/2015 15:09:06	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Francisco.pdf	22/08/2015 15:08:42	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Felipe.pdf	22/08/2015 15:07:40	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Questionario_qualidade_vida_ANEXO_A.docx	22/08/2015 14:48:31	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Ficha_clinica_APENDICE_B.docx	22/08/2015 14:48:05	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	22/08/2015 14:45:02	Renata Cimdões Jovino Silveira	Aceito

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

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



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



Continuação do Parecer: 1.310.208

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

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

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49166415.0.3001.5197

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.368.830

Apresentação do Projeto:

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

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral

CEP: 52.051-380

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br



HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM



Continuação do Parecer: 1.368.830

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Preenche as exigências.

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral

CEP: 52.051-380

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br



HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM



Continuação do Parecer: 1.368.830

Recomendações:

Não

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em condições de ser implementado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado de acordo com a Resolução 466/2012

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/10/2015 17:29:13		Aceito
Outros	carta_resposta.docx	09/10/2015 17:28:00	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/10/2015 17:12:55	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/10/2015 17:12:19	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	14/09/2015 13:01:32		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	09/09/2015 21:53:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_ultima_versao.docx	09/09/2015 21:52:22	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	09/09/2015 21:51:45	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_APENDICE_A.docx	09/09/2015 21:51:04	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_576064.pdf	02/09/2015 15:29:02		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	02/09/2015 15:27:31	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Roberto.pdf	22/08/2015 15:10:56	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Outros	Lattes_Renata.pdf	22/08/2015 15:10:15	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral

CEP: 52.051-380

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br



HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM



Continuação do Parecer: 1.368.830

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 15 de Dezembro de 2015

Assinado por:
CARLOS ALBERTO SÁ MARQUES
(Coordenador)

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral

CEP: 52.051-380

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO

Author Guidelines

Journal of Periodontology

Author Instructions

Manuscript Categories

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- **Background:** Describes the problem being addressed.
- **Methods:** Describes how the study was performed
- **Results:** Describes the primary results.
- **Conclusion(s):** Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

REVIEW ARTICLES

The *Journal of Periodontology* is no longer accepting submissions of reviews. Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgment(s)

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to *Clinical Advances in Periodontics*. The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field. Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science. The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication. The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research. (U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval. Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication." It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the clinical situation being discussed
- Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- Results: Describes the clinical results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded, specifically clinical

implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the cases should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal of Periodontology*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

The *Journal of Periodontology* no longer accepts submissions of letters to the editor.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

SEARCH ENGINE OPTIMIZATION

For tips on Search Engine Optimization (SEO) and article discovery, please see our [SEO guide](#).

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to

identify authors and their corresponding institutions);

3. disclaimers, if any;

4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);

5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;

6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;

7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers submitted for publication. Conflicts of interest are defined as those

influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.

2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology*'s preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.

2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non–English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limioli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct

for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.

11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html>.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology's* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPORTING INFORMATION

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see **Figures** above) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary Videos

The *Journal of Periodontology* publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail julie@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on ScholarOne Manuscripts in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms,

abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Form

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in ScholarOne Manuscripts** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a **CONSORT checklist** with your manuscript. More information can be found at www.consort-statement.org.

All clinical trials must be registered prior to submission to the Journal of Periodontology at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/aboutstudies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry
- <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform
- <http://www.who.int/ictpr/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was conducted in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at [ScholarOne Manuscripts](#) by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log in to Author Services where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print on the journal's website. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed in an issue of the *Journal of Periodontology* approximately 4 to 6 months after acceptance.

Copyright Transfer Agreement (CTA)

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

OnlineOpen

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

- Creative Commons Attribution Non-Commercial License
- Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License
- Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).

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

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading.

Funding Agency Requirements

Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org. Production queries regarding accepted papers can be emailed to jperprod@wiley.com.

ANEXO C – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO

Carlos Menezes Aguiar

MANUAL PARA NORMATIZAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

RECIFE – PE

2016

Encontra-se disponível no site da Pós-Graduação de Odontologia da UFPE ou no link abaixo: <https://drive.google.com/open?id=1AQT0Ili3KIM8orF4OtojnY6KB1eFUzQD>