



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

CAMILA AGRA SOUZA

**POLIMORFISMOS NOS GENES *CCR5*, *CCL5* E *HLA-G* EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO**

Recife
2021

CAMILA AGRA SOUZA

**POLIMORFISMOS NOS GENES *CCR5*, *CCL5* E *HLA-G* EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UMA
POPULAÇÃO 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, com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

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

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S729p	Souza, Camila Agra Polimorfismos nos genes CCR5, CCL5 e HLA-G em indivíduos com periodontite com e sem diabetes mellitus tipo 2 de uma população do nordeste brasileiro / Camila Agra Souza . – 2021. 88 f. : tab. Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira. Coorientador: 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. Periodontite. 2. Diabetes mellitus tipo 2. 3. Quimiocina CCL5. 4. Antígenos HLA-G. 5. Receptores CCR5. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (orientadora). II. Silva, Ronaldo Celerino da (coorientador). III. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 067)
-------	---

CAMILA AGRA SOUZA

POLIMORFISMOS NOS GENES *CCR5*, *CCL5* E *HLA-G* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UMA POPULAÇÃO 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, com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

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

Aprovada em 29 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA

5º

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Interno)

4º

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Interno)

3º

Profa. Dra. Bruna de Carvalho Farias Vajgel
Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Interno)

2º

Prof. Dr. Roberto Carlos Mourão Pinho
Centro Universitário FACOL (Examinador Externo)

1º

Profa. Dra. Elisa Mattias Sartori
Faculdade ILAPEO (Examinador Externo)

Dedico este trabalho:

À Deus, meu escudo e minha fortaleza.

Aos meus pais, Valdizia e Francilauda, pelo amor constante e por sempre se fazerem presentes mesmo com a distância.

Ao meu marido Pablo e ao meu filho Miguel, pelo ânimo diário e por serem o meu lar.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me erguer todas as vezes que quis desanimar, por se fazer presente nos amigos e por sempre me mostrar o caminho da verdade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Cimões, por ser exemplo de perseverança e entusiasmo. Por acreditar que poderia muito mais do que pensei ser capaz, pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Celerino, o melhor co-orientador do mundo, pela paciência sem fim e pelo carinho nos conselhos. Sem dúvidas, o maior presente destes anos de doutorado foi conhecer esse profissional dedicado, íntegro e acolhedor. Não existem palavras suficientes para agradecer por tudo que o senhor compartilhou comigo, sempre de maneira humilde e atenciosa. Muito obrigada, professor!

À mestranda Jessyka Silva, pelo compromisso com minha pesquisa laboratorial, pela paciência e calma em todos os momentos e por todo o conhecimento compartilhado. Muito obrigada!

À minha mãe, Valdizia, por ser esse brilho constante para minha vida, por torcer sempre e por me oferecer o melhor colo mesmo à distância. Como eu te amo!

Ao meu pai, Francilaudo, por nunca desacreditar, por vibrar nas pequenas conquistas e por ser esse guerreiro que me inspira a seguir. Amo você!

Ao meu querido marido, Pablo, por ter a paciência e a sabedoria de esperar cada vitória. Obrigada, meu amor!

Ao meu filho, Miguel, por ser o brilho dos dois últimos anos deste doutorado e me fazer ter a certeza que posso ser muito mais do que imagino. Você é a minha luz!

À minha família pernambucana, meus sogros Valéria e Elson, minha cunhada Marina e meu afilhado Marcelo, por serem o suporte familiar incansável em Recife. Em especial, a tia Janete, por nunca soltar a minha mão. Não conseguiria sem vocês!

À toda minha família, irmão, tios, primos e sobrinhos, por acreditarem e por serem suporte sempre.

A todos os colegas do curso de Doutorado, em especial à Rayanne Melo, por ter sido minha companhia fiel em todos os momentos desta caminhada. Tenha certeza, minha amiga, que você foi fundamental nessa conquista. Sua amizade, nossas risadas e lágrimas, serão as melhores lembranças destes anos. Conte sempre comigo!

Aos colegas do grupo de pesquisa Perio-Implante UFPE, por compartilharem conquistas, conhecimento e sorrisos.

À Pós-Graduação em Odontologia da UFPE e a todos os professores do programa.

A todos os funcionários que passaram pela pós-graduação nestes anos, especialmente Oziclere, Tamires, Tânia e Antônio, pela paciência, disponibilidade e cuidado.

À CAPES, pelo suporte financeiro na forma de bolsa de Doutorado.

Aos pacientes, pela disponibilidade e confiança.

“Sonhe sempre e seja grato
pelo sonho que já tem,
repare cada detalhe
das coisas que fazem bem,
o pouco que hoje é seu
é o muito pra alguém.”

(BESSA, 2018, p. 31)

RESUMO

Considerando o desbalanço inflamatório e imune presente em indivíduos com Periodontite (P) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), bem como a relação bidirecional das duas doenças, fica evidente a importância de estudos de fatores genéticos relacionados ao surgimento e cronicidade dessas doenças, assim como o impacto causado pela coexistência delas no indivíduo. Neste sentido, o presente estudo investigou se polimorfismos nos genes *CCR5*, *CCL5* e *HLA-G* influenciam na P em indivíduos com e sem DM2, de uma população do Nordeste brasileiro. Para este fim, 285 indivíduos, sendo 111 com DM2+P, 102 com apenas P e 72 controles saudáveis (CS). Foram estudados 4 polimorfismos: 2 SNPs em *CCL5* (rs1800825 e rs2107538), uma deleção em *CCR5* (*CCR5Δ32*) e um *indel* em *HLA-G* (*14pb indel*). As genotipagens foram realizadas por PCR convencional (*CCR5* e *HLA-G*) e PCR em tempo real, utilizando sondas alelo específicas (*CCL5*). Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os grupos quanto às variantes clínico-epidemiológicas (sexo, idade, renda, tabagismo, escolaridade, número de dentes, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de sangramento e índice de placa). Em relação às variantes genéticas, apenas o SNP *rs1800825*, em *CCL5*, foi associado com uma maior susceptibilidade de desenvolvimento de DM2 em indivíduos com P. Variantes em *HLA-G* (*indel 14pb*) foram relacionadas a uma maior susceptibilidade de desenvolvimento de DM2 e P associadas, com um maior grau e extensão da P e, ainda, à uma maior chance de ter menos que vinte dentes e um maior índice de placa visível. Portanto, o estudo concluiu que fatores ambientais e genéticos estão implicados no contexto da periodontite, com ou sem a presença do DM2. As análises apresentaram evidências inéditas para o contexto da DM2 e P em relação às variantes genéticas *CCL5* e *HLA-G*, despertando a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos de variantes genéticas nestes genes, na Periodontite e no Diabetes Mellitus tipo 2.

Palavras-chave: periodontite; diabetes mellitus tipo 2; quimiocina CCL5; antígenos HLA-G; receptores CCR5.

ABSTRACT

Considering the inflammatory and immune imbalance present in individuals with Periodontitis (P) and Type 2 Diabetes Mellitus (DM2), as well as the bidirectional relationship of the two diseases, it is evident the importance of studies of genetic factors related to the emergence and chronicity of these diseases, as well as the impact caused by their coexistence in the individual. In this sense, the present study investigated whether polymorphisms in *CCR5*, *CCL5*, and *HLA-G* genes influence P in individuals with and without DM2, from a population in Northeast Brazil. For this purpose, 285 individuals, 111 with DM2+P, 102 with only P and 72 healthy controls (HC). We studied 4 polymorphisms: 2 SNPs in *CCL5* (*rs1800825* and *rs2107538*), a deletion in *CCR5* (*CCR5Δ32*) and an *indel* in *HLA-G* (*14pb indel*). Genotyping was performed by conventional PCR (*CCR5* and *HLA-G*) and real-time PCR using allele-specific probes (*CCL5*). The results showed significant differences between the groups regarding clinical and epidemiological variants (gender, age, income, smoking status, education, number of teeth, probing depth, clinical attachment level, bleeding index, and plaque index). Regarding genetic variants, only SNP *rs1800825*, in *CCL5*, was associated with a higher susceptibility to develop DM2 in individuals with P. Variants in *HLA-G* (*indel 14pb*) were related to a higher susceptibility to develop DM2 and associated P, with a higher degree and extent of P, and also to a higher chance of having fewer than twenty teeth and a higher visible plaque index. Therefore, the study concluded that environmental and genetic factors are implicated in the context of periodontitis, with or without the presence of DM2. The analyses presented novel evidence for the context of DM2 and P in relation to the *CCL5* and *HLA-G* genetic variants, raising the need for further studies of genetic variants in these genes in periodontitis and type 2 Diabetes Mellitus.

Key words: periodontitis; diabetes mellitus, type 2; chemokine *CCL5*; *HLA-G* antigens; receptors, *CCR5*.

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas na Metodologia da Tese

Tabela 1 - Caracterização dos polimorfismos selecionados para o estudo. 25

Tabela 2 - Sondas alelo-específicas para os SNPs em *CCL5*. 26

Tabelas inseridas no artigo

Tabela 1 - Caracterização clínico-epidemiológica de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite, com apenas periodontite e controles saudáveis do Estado de Pernambuco. 54

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e Controles Saudáveis (CS) de uma população do Nordeste brasileiro. 56

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com os estádios da doença periodontal entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e com apenas Periodontite (P). 58

Tabela Suplementar 1 - Distribuição de genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com os estádios da doença periodontal em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e apenas com Periodontite (P). 59

Tabela Suplementar 2 - Distribuição de genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com o grau e extensão da doença periodontal em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e apenas com Periodontite (P). 60

Tabela Suplementar 3 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G*, e *CCL52* de acordo com o grau e extensão da doença periodontal entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e com apenas Periodontite (P). 62

Tabela Suplementar 4 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes CCR5, HLA-G, e CCL5 com as variáveis clínicas intraorais entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e Controles Saudáveis (CS) de uma população do Nordeste brasileiro.	63
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Untranslated 3' region (Região 3' não traduzida)
AAP	Associação Americana de Periodontia
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CC
CCR5	Receptor 5 de quimiocina CC
CS	Controles Saudáveis
CXCR4	Receptor tipo 4 de quimiocina CXC
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DP	Doença Periodontal
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
Indel	Inserção/deleção
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
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)
ND	Nefropatia Diabética
NIC	Nível de Inserção Clínica
NK	Natural Killer
NKT	Célula T Natural Killer
OR	Odds ratio
P	Periodontite
pb	Pares de bases
PC	Periodontite Crônica
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PE	Pernambuco
PPGO	Programa de Pós-graduação em Odontologia
PPV	Presença de Placa Visível
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PS	Profundidade de Sondagem
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RD	Retinopatia Diabética
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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PREÂMBULO	19
3	METODOLOGIA	21
3.1	POPULAÇÃO ALVO, TAMANHO AMOSTRAL E DESENHO DO ESTUDO	21
3.2	TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO	21
3.3	SELEÇÃO DOS GRUPOS AMOSTRAIS	21
3.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	23
3.5	INSTRUMENTO DE PESQUISA	23
3.5.1	Entrevista	23
3.5.2	Exame clínico	23
3.6	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DO DNA	24
3.7	SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS E GENOTIPAGEM	24
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4	ARTIGO: POLIMORFISMOS NOS GENES <i>CCR5</i>, <i>CCL5</i> E <i>HLA-G</i> EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO	28
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	71
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA	74
	ANEXO A – PARECERES DOS COMITÊS DE ÉTICA	78
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO	87
	ANEXO C – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO	88

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa que afeta cerca de 50% dos adultos em todo o mundo. Tendo a resposta imune e a presença de placa dentária como contribuintes para o seu desenvolvimento, a doença periodontal estimula as respostas imunoinflamatórias do hospedeiro, resultando em quebra das fibras de colágeno, do ligamento periodontal e do osso alveolar, que dão suporte ao dente, com consequente perda de inserção (1-4).

O biofilme dentário pode ser considerado o principal fator etiológico para a produção oral de biomarcadores inflamatórios, embora vários mecanismos biológicos possam estar envolvidos. Fatores de risco ambientais (higiene, tabagismo, estresse e outros) e fatores genéticos também estão envolvidos na patogênese da periodontite (5-7). A produção local de citocinas, em resposta às bactérias periodontais e seus produtos, está relacionada a maiores concentrações séricas de biomarcadores pró-inflamatórios (8). Adicionalmente, alterações sistêmicas, como o DM2, podem afetar a prevalência, a incidência e a gravidade das Doenças Periodontais (DP) (9-12).

O Diabetes Mellitus tipo 2 é um distúrbio com componentes metabólicos e vasculares, caracterizado por hiperglicemia devido à função defeituosa da insulina ou receptores de células de insulina alterados (resistência à insulina) (13). Muitos fatores contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de complicações do diabetes, como: genética, dieta, estilo de vida, idade e obesidade (14, 15). Estudos indicam que o controle dos processos inflamatórios pode estar relacionado a novas abordagens no tratamento desse distúrbio, que é um fator de risco reconhecido para DP (10, 11, 16, 17).

A doença periodontal foi reconhecida como a “sexta complicação” do DM2 (18), juntamente com retinopatia, neuropatia, nefropatia, complicações cardiovasculares (doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica) e retardo na cicatrização de feridas. As complicações orais do diabetes podem ser devastadoras para o indivíduo, podendo incluir, além da periodontite, candidíase, cárie dentária, perda de dente, gengivite, líquen plano, distúrbios neurosensoriais (síndrome da boca ardente), disfunção salivar, xerostomia e alteração do paladar (19).

Para a análise de biomarcadores que podem estar relacionados a essas condições, a coleta de amostras de saliva oferece vantagens por não requerer equipamento especializado, ser mais rápida e mais conveniente para o paciente, além

de representar uma amostra combinada de componentes de todos os sítios periodontais, indicando uma avaliação global do estado das alterações. Com isso, mediadores inflamatórios e imunológicos sintetizados e secretados na presença desses distúrbios, podem ser estudados (20, 21).

O aparecimento de alguns tipos específicos de leucócitos no infiltrado inflamatório é mediado por citocinas quimiotáticas específicas, denominadas quimiocinas. Essas quimiocinas são proteínas importantes na determinação da natureza da resposta do hospedeiro, pois promovem o recrutamento seletivo de subconjuntos de células imunes, que podem amplificar a inflamação ou suprimi-la (22-24).

O ligante 5 de quimiocina classe CC (CCL5), também conhecido como RANTES (regulado na ativação de células T normais expressas e secretadas), é uma quimiocina inflamatória que pode ser produzida por linfócitos T, plaquetas, células endoteliais, músculo liso e macrófagos (25), sendo codificado pelo gene CCL5, localizado no cromossomo 17. Sua principal função, relaciona-se com o recrutamento de leucócitos e migração dos mesmos pela camada de células endoteliais para a área inflamada (26), tendo sido demonstrado ser altamente expresso em uma infinidade de tipos de câncer (26-31).

No contexto da periodontite, foi visto uma expressão aumentada de CCL5 no fluido gengival crevicular, local ativo da inflamação periodontal (28). Adicionalmente, estudos apontam que a quantidade de moléculas de CCL5 no sangue de indivíduos com periodontite permanece em níveis aumentados mesmo após terapias periodontais (7, 29).

Em células imunes, CCL5 foi relatado inicialmente como um fator supressor de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e expresso principalmente por células T CD8+ (32). Ele se liga ao seu receptor cognato CC receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5), que é (ao lado do receptor de quimiocina CXC tipo 4 - CXCR4), um correceptor de entrada de HIV nas células T CD4+ (33).

O CCR5 é um receptor transmembrana de quimiocina acoplado à proteína G, codificado pelo gene CCR5, localizado no cromossomo 3. É expresso em várias células do sistema imune, como linfócitos T efetores e de memória, linfócitos T CD4+ helper tipo 1, células NK, células T Natural killer (NKT), monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas, células de Langerhans e basófilos (34), sendo expresso em uma ampla variedade de tecidos (35) e células não-hematopoiéticas (34, 36, 37).

A proteína possui 352 aminoácidos e está diretamente envolvida no recrutamento seletivo de vários subconjuntos de leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, células NK e linfócitos (38-40). De forma semelhante ao CCL5, o CCR5 é superexpresso em muitos tipos de câncer (41-45).

A ativação dos sinais de transdução desencadeados pelo acoplamento do CCR5 com ligantes estimula não apenas a migração celular, mas também influencia a proliferação, expressão de citocinas e ativação de funções efetoras (30). O polimorfismo CCR5 Δ 32 (rs333) é uma deleção de 32 pares de bases, que ocasiona uma alteração na matriz de leitura ("frameshift") do gene *CCR5*, levando a uma perda de função em decorrência da à abolição da expressão da superfície celular do receptor (31, 46). Assim, com base na relevância do CCR5 para a patogênese da periodontite experimental, é razoável supor que a variante CCR5 Δ 32 poderia ser um fator de risco relevante para a periodontite humana (7, 40, 47).

Além disso, estudos mostraram que a expressão de CCL5 / CCR5 estava aumentada em pacientes com nefropatia diabética (ND) ou retinopatia diabética (RD), e sua expressão anormal estava associada a inerente lesão renal ou à formação de neovascularização intraocular (48, 49). Assim, as mutações no gene CCL5 ou CCR5 podem ser o determinante na patogênese do DM2.

Outro gene importante na resposta hospedeira é o *HLA-G*. Caracteriza-se como um gene não clássico de classe I, localizado no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21-3 (50, 51). É expresso não somente na superfície da membrana das células, mas também nos fluidos corporais na forma de HLA-G solúvel (52). O transcrito primário do *HLA-G* produz sete isoformas, quatro das quais ligadas à membrana (G1 a G4) e três solúveis (G5 a G7) (50, 53-55).

O principal polimorfismo observado na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G*, na posição 3741, é caracterizado pela presença de inserção ou deleção de 14 pares de base (pb) (*rs1704*) (56), o que influencia a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (57). Os transcritos do *HLA-G* gerados por seus alelos com a sequência de inserção de 14 pb podem estar sujeitos a um *splicing* alternativo adicional, com a remoção de mais 92 pb. Tal acontecimento, confere melhor resistência à degradação do mRNA (50, 58) e altera a função (59) e os níveis da proteína (60, 61).

O *HLA-G* apresenta efeitos inibitórios, ou seja, propriedades imunossupressivas, através de interações com receptores expressos nas células do

sistema imune (54). Ele inibe a função citolítica de células NK (62) e linfócitos T, a resposta aloproliferativa de células T CD4+, a proliferação de células T_H1, a maturação de células dendríticas, podendo também induzir células T regulatórias (55).

Pelo fato de a molécula HLA-G estar envolvida em vários processos imunoregulatórios e em desordens inflamatórias, representa um excelente gene candidato para associação com a periodontite. Ainda, sua associação com DM2 também pode ser hipotetizada, tendo em vista este distúrbio metabólico apresentar um estado inflamatório crônico envolvendo disfunção endotelial.

O presente estudo teve o objetivo de investigar se polimorfismos nos genes *CCR5* (*CCR5Δ32*), *CCL5* (*rs1800825* e *rs2107538*) e *HLA-G* (*indel 14pb*) influenciam na ocorrência de Periodontite em indivíduos com e sem Diabetes Mellitus tipo 2, de uma população do Nordeste brasileiro.

2 PREÂMBULO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial, na qual as fibras de colágeno de suporte do dente, do ligamento periodontal e do osso são quebradas, principalmente, devido ao desenvolvimento de uma resposta imunoinflamatória exacerbada ao biofilme dental. Esta resposta provoca uma cascata de reações, que podem ser eficientes contra a agressão ou descontroladas, promovendo danos aos tecidos.

O Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2), considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de periodontite, também é uma doença com repercussões inflamatórias, onde um contínuo e persistente processo inflamatório, desencadeado por fatores locais e estímulos externos, pode alterar componentes metabólicos e vasculares.

Neste sentido, é evidente a existência de uma relação entre essas duas disfunções. Indivíduos com bom controle metabólico podem diminuir a taxa de perda de inserção e esse melhor controle glicêmico pode ser alcançado após o tratamento periodontal eficaz.

Fatores genéticos também estão envolvidos na patogênese da periodontite, dentre os quais se destacam polimorfismos em genes relacionados com a resposta imune. Estes polimorfismos podem ser variações pontuais, descritos como polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), ou mesmo inserções e deleções de porções gênicas, os quais podem provocar a perda de função ou modular a expressão gênica, podendo assim alterar a susceptibilidade à doença.

O CCR5 é um receptor transmembrana que se liga a quimiocinas, a macrófagos e regula a ativação de células T, estando associado à indução de perda óssea alveolar, consequentemente à periodontite. A deleção *CCR5Δ32* altera a configuração do receptor, diminuindo a quantidade de CCR5 na face externa da membrana plasmática, impossibilitando a ligação à proteína CCL5, ligante natural, atrapalhando o recrutamento de células para o local da infecção.

O ligante CCL5 (ligante 5 de quimiocina CC), também conhecido como RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), é uma quimiocina que pode ser expressa em linfócitos T, plaquetas, células endoteliais, músculo liso e macrófagos. Sua principal função está relacionada ao recrutamento de leucócitos e migração destes através da camada de células endoteliais para a área

inflamada. Polimorfismos nesse gene podem alterar a resposta inflamatória de indivíduos com periodontite com ou sem Diabetes Mellitus tipo 2.

Outro gene, o *HLA-G* (Antígeno Leucocitário Humano G), localizado no cromossomo 6, já foi estudado em várias doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla. Sua molécula tem importantes propriedades imunomoduladoras, podendo estar associada à prejuízo de função das células imunes, como: células T e B, células Natural Killer (NK), monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Com isso, há uma hipótese de que polimorfismos do gene *HLA-G* podem estar associados à modulação da susceptibilidade à periodontite.

O presente estudo teve o objetivo de investigar se polimorfismos nos genes *HLA-G* (*indel 14pb*), *CCR5* (*CCR5Δ32*) e *CCL5* (*rs1800825* e *rs2107538*) influenciam na ocorrência de periodontite em indivíduos com e sem Diabetes Mellitus tipo 2, de uma população do Nordeste brasileiro.

3 METODOLOGIA

3.1 POPULAÇÃO ALVO, TAMANHO AMOSTRAL E DESENHO DO ESTUDO

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

A amostragem se deu de forma aleatória e, inicialmente, não-probabilística, totalizou 285 indivíduos, sendo 111 com DM2 + P, 102 com apenas P e 72 indivíduos CS.

3.2 TIPO E LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho compreendeu um estudo do tipo caso-controle, composto por uma etapa clínica e uma etapa laboratorial.

As avaliações clínicas dos indivíduos, assim como a coleta de material biológico foram realizadas no Ambulatório de Endocrinologia do HAM (Recife-PE), referência no atendimento de indivíduos com Diabetes, e na Clínica do PPGO-UFPE, no período de novembro/2015 a setembro/2017.

As análises laboratoriais aconteceram no Laboratório de Biologia Molecular da PPGO-UFPE e no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

3.3 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 Diabetes Mellitus do tipo 2 e Periodontite (DM2+P): ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de periodontite

crônica (PC) (6, 63); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (64);

- ✓ Critérios de inclusão para o grupo com apenas Periodontite (P): ter o diagnóstico clínico de PC (6, 63); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (64);
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo de indivíduos Controles Saudáveis (CS): ter idade mínima de 35 anos, não apresentar DM2 e/ou P, e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia) (64);
- ✓ 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 e ser portador de DM2 e/ou P.

Segundo a Associação Americana de Periodontia (AAP) (2015) (63), que reorganizou a classificação proposta em 1999, o diagnóstico da PC deve se basear em vários parâmetros clínicos e radiográficos, os quais nem sempre estarão todos presentes. A PC, quanto à severidade, classifica-se em leve, moderada ou severa; já quanto à extensão, classifica-se em localizada ou generalizada (63).

Neste estudo, a doença foi caracterizada pela presença de alguns parâmetros indicativos de inflamação, como: sangramento à sondagem, aumento da profundidade de sondagem e perda de inserção clínica.

Em 2018, uma nova classificação para as doenças periodontais foi estabelecida (65). Apesar dos indivíduos terem sido recrutados, inicialmente, seguindo as diretrizes estabelecidas na classificação de 2015, os grupos foram reorganizados, baseando-se neste atual esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantares, levando, invariavelmente, a uma perda e/ou mudança de grupos formados inicialmente.

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

Esse novo esquema de classificação já estabelece indivíduos com diabetes como um grupo a parte, devido a particularidade da relação entre as duas doenças. Desse modo, no grupo DM2+P permaneceram os indivíduos que se adequavam aos requisitos de periodontite, sendo classificados também os seus estádios e graus.

3.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos e condutas adotadas no presente trabalho, seguiram a normativa nº 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 e caráter científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos que teriam em participar da mesma. Mediante aceitação em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando em participar do estudo (Apêndice A).

Todos os procedimentos clínicos e laboratoriais utilizados neste 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 HAM, instituição coparticipante (registro nº 1368830) (Anexo A).

3.5 INSTRUMENTOS DE PESQUISA

3.5.1 Entrevista

Após explicação dos objetivos da pesquisa, aceite do indivíduo em participar e assinatura do TCLE, foi realizada uma breve entrevista, a partir da qual foram requisitadas informações sobre idade, sexo, renda e escolaridade de cada participante, conforme ficha clínica (Apêndice B).

3.5.2 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®). Durante todo o processo, três examinadores e anotadores calibrados fizeram os exames clínicos e o registro nas fichas dos indivíduos (valores de concordância Kappa $0,40 < k < 0,75$)(66).

3.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DO DNA

Após o exame clínico, foi realizada a coleta de saliva em tubos do tipo Falcon (15ml) estéreis, solicitando, a cada indivíduo, cuspir por 3 minutos (67). Esse material foi devidamente identificado, armazenado em condições refrigeradas e transportado para o Laboratório de Biologia Molecular do PPGO- 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 mesmo protocolo para amostras de sangue, preconizado pelo fabricante. O DNA genômico isolado foi quantificado e verificado quanto sua pureza, através do espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fischer®), considerando as razões entre as absorbâncias 260/280nm e 260/230nm. Amostras consideradas satisfatórias deveriam apresentar valor igual ou superior a 50ng/ul de DNA, 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 .

3.7 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS E GENOTIPAGEM

A seleção dos polimorfismos nos genes *HLA-G*, *CCR5* e *CCL5* foi baseada em seu impacto funcional, 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 no histórico de associação das variantes com doenças de caráter inflamatório. A seleção se deu de acordo com as bases de dados do NCBI e 1000genomes (68).

Foram selecionados 4 polimorfismos, sendo uma inserção/deleção (indel) no gene *HLA-G* (*HLA-G* -14pb indel), uma deleção no gene do receptor de quimiocina *CCR5* (*CCR5*Δ32) e dois polimorfismos de única base (SNPs) no gene *CCL5* (*rs2107538* e *rs1800825*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos polimorfismos selecionados para o estudo.

Gene	Cromossomo	ID	Tipo de Variação	Região gênica	Consequência Funcional
<i>CCR5</i>	3	<i>rs333</i>	Deleção de 32 pb (Δ32)	Éxon 3	Alteração da matriz de leitura (frameshift)
<i>HLA-G</i>	6	<i>rs1704</i>	Inserção/Deleção 14pb (14pb indel)	3'UTR	Estabilidade do mRNA
<i>CCL5</i>	17	<i>rs1800825</i>	SNP (A/G)	5'UTR	Alteração transcricional
		<i>rs2107538</i>	SNP (C/T)	5'UTR	Alteração transcricional

Para os polimorfismos nos genes *HLA-G* e *CCR5*, as genotipagens foram realizadas a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, seguida de eletroforese em gel de agarose, seguindo as metodologias com modificações de Hviid *et al.* (2002) (60) e Dean *et al.* (1996) (69).

A genotipagem do polimorfismo *14pb indel* em *HLA-G* foi realizada através de reações de 25ul, com concentrações finais de 1x PCR buffer, 0,2 nM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,75 U de Taq polimerase e 10 pmol de cada primer (forward 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' e reverse 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'). Na amplificação foram utilizadas as seguintes condições termais: 94°C por 2 minutos, seguidas por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os amplicons obtidos foram visualizados em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídeo. O tamanho dos fragmentos gerados foram 224 pb (alelo de inserção) e 210 pb (alelo de deleção).

Na genotipagem da deleção de 32 pb de *CCR5* (*CCR5*Δ32), as reações foram preparadas para um volume final de 25μL sendo 1 μL de DNA genômico (25 ng/μl),

2,5 µL de buffer PCR, 0,8 µL de dNTPs, 1,0 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq polimerase, 0,4 µL de cada primer (10 µM) - forward 5'-GTCTTCATTACACCTGCAGCTCT-3' e reverse 5'-CACAGCCCTGTGCCTCTT-3' e 18,7 µL de água de injeção. As condições térmicas de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguida de 38 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64,5°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo e genotipados de acordo com o tamanho em alelos selvagens (185pb) e alelo com deleção de 32pb (153pb).

Para os SNPs no gene *CCL5*, a genotipagem foi realizada através da PCR em tempo real, utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®) (Tabela 2) e o termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®). Para detecção dos genótipos de cada SNP, foi utilizada uma reação com volume total de 5 µl para cada variante, contendo aproximadamente 1µl de DNA molde por reação (25ng/µl), 1,25µl de água ultrapura, 2,5µl do TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 0,25µl de cada sonda diluídas a 20x (Applied Biosystems®). Para cada amostra foram realizados 50 ciclos de amplificação de acordo com as condições padrões do equipamento, e para cada experimento, um controle negativo da reação (água ultrapura) foi incluído.

Tabela 2 - Sondas alelo-específicas para os SNPs em *CCL5*.

SNPs em <i>CCL5</i>	Nº do ensaio	Sequência da sonda
<i>rs1800825</i>	C__11417470_10	ATAAGTGAAATTGCACAAAACGGAA[A/G] AGAAA ACTGAAATAGCCTCCGGA
<i>rs2107538</i>	C__15874407_10	TCCTGCTTATTTCATTACAGATCTTA[C/T] CTCCTTTCCCTCATCCATGGAAGGA

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genotípicas, para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer (66). A distribuição dos genótipos e sua aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) 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, utilizando o programa R Project (70).

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.

O nível de significância estatística adotado em todas as análises foi de $\alpha < 0,05$.

4 ARTIGO: POLIMORFISMOS NOS GENES *CCR5*, *CCL5* E *HLA-G* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2 DE UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO

O manuscrito será submetido ao periódico *Journal of Periodontology*, de Qualis A1 para Odontologia.

- **Contagem de palavras:** 4974; **Número de figuras:** 0; **Número de tabelas:** 3; **Número de referências:** 82

- **Título curto:** *CCR5*, *CCL5* E *HLA-G* EM PACIENTES COM PERIODONTITE E DIABETES

- **Principais conclusões:** Os fatores ambientais e genéticos estão implicados no contexto da periodontite, com ou sem a presença do DM2, mas apenas os polimorfismos *rs1800825* (*CCL5*) e *indel 14pb* *HLA-G* apresentaram associação com a presença de diabetes em indivíduos com periodontite.

RESUMO

Histórico: Considerando o desbalanço inflamatório e imune presente em indivíduos com Periodontite (P) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), bem como a relação bidirecional das duas doenças, fica evidente a importância de estudos de fatores genéticos relacionados ao surgimento e cronicidade dessas doenças, assim como o impacto causado pela coexistência delas no indivíduo. Neste sentido, o presente estudo investigou se polimorfismos nos genes *CCR5*, *CCL5* e *HLA-G* influenciam na P em indivíduos com e sem DM2, de uma população do Nordeste brasileiro. Método: Foram selecionados 285 indivíduos, sendo 111 com DM2+P, 102 com apenas P e 72

controles saudáveis (CS). Foram estudados 4 polimorfismos: 2 SNPs em *CCL5* (rs1800825 e rs2107538), uma deleção em *CCR5* (*CCR5*Δ32) e um *indel* em *HLA-G* (*indel* 14pb). As genotipagens foram realizadas por PCR convencional (*CCR5* e *HLA-G*) e PCR em tempo real, utilizando sondas alelo específicas (*CCL5*). Resultados: Foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto às variantes clínico-epidemiológicas (sexo, idade, renda, tabagismo, escolaridade, número de dentes, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de sangramento e índice de placa). Em relação às variantes genéticas, apenas o SNP *rs1800825*, em *CCL5*, foi associado com uma maior susceptibilidade de desenvolvimento de DM2 em indivíduos com P. Variantes em *HLA-G* (*indel* 14pb) foram relacionadas a uma maior susceptibilidade de desenvolvimento de DM2 e P associadas, com um maior grau e extensão da P e, ainda, à uma maior chance de ter menos que vinte dentes e um maior índice de placa visível. Conclusão: Os fatores ambientais e genéticos estão implicados no contexto da periodontite, com ou sem a presença do DM2.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite. Diabetes Mellitus Tipo 2. Quimiocina CCL5. Antígenos HLA-G. Receptores CCR5. Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa que afeta cerca de 50% dos adultos em todo o mundo. Tendo a resposta imune e a presença de placa dentária como contribuintes para o seu desenvolvimento, a doença periodontal estimula as respostas imunoinflamatórias do hospedeiro e resulta em quebra das fibras de colágeno, do

ligamento periodontal e do osso alveolar, que dão suporte ao dente, com consequente perda de inserção⁽¹⁻⁴⁾.

Em resposta às bactérias periodontais e seus produtos, a produção local de citocinas, está relacionada a maiores concentrações séricas de biomarcadores pró-inflamatórios⁽⁵⁾. Adicionalmente, alterações sistêmicas, como o DM2, podem elevar a prevalência, a incidência e a gravidade das Doenças Periodontais (DP)⁽⁶⁻⁹⁾.

O Diabetes Mellitus tipo 2 é um distúrbio com componentes metabólicos e vasculares. É caracterizado por hiperglicemia devido à função defeituosa da insulina ou receptores de células de insulina alterados (resistência à insulina)⁽¹⁰⁾. Muitos fatores contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de complicações do diabetes, como: genética, dieta, estilo de vida, idade e obesidade^(11, 12). Estudos indicam que o controle dos processos inflamatórios pode estar relacionado a novas abordagens no tratamento desse distúrbio^(7, 8, 13, 14).

O aparecimento de alguns tipos específicos de leucócitos no infiltrado inflamatório é mediado por citocinas quimiotáticas específicas, denominadas quimiocinas. Essas quimiocinas são proteínas importantes na determinação da natureza da resposta do hospedeiro, pois promovem o recrutamento seletivo de subconjuntos de células imunes, que podem amplificar a inflamação ou suprimi-la⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

O ligante 5 de quimiocina classe CC (CCL5), também conhecido como RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), é uma quimiocina inflamatória que pode ser produzida por linfócitos T, plaquetas, células endoteliais, músculo liso e macrófagos⁽¹⁸⁾, sendo codificado pelo gene *CCL5*, localizado no cromossomo 17. Sua principal função, relaciona-se com o recrutamento

de leucócitos e migração dos mesmos pela camada de células endoteliais para a área inflamada⁽¹⁹⁾.

No contexto da periodontite, foi visto uma expressão aumentada de CCL5 no fluido gengival crevicular, local ativo da inflamação periodontal⁽²⁰⁾. Adicionalmente, estudos apontam que a quantidade de moléculas de CCL5 no sangue de indivíduos com periodontite permanece em níveis aumentados mesmo após terapias periodontais^(21, 22). Em células imunes, CCL5 foi relatado inicialmente como um fator supressor de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e expresso principalmente por células T CD8+⁽²³⁾. Ele se liga ao seu receptor cognato CC receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5), que é (ao lado do receptor de quimiocina CXC tipo 4 - CXCR4), um correceptor de entrada de HIV nas células T CD4+⁽²⁴⁾.

O CCR5 é um receptor transmembrana de quimiocina acoplado à proteína G, codificado pelo gene *CCR5*, localizado no cromossomo 3. É expresso em várias células do sistema imune, como linfócitos T efetores e de memória, linfócitos T CD4+ helper tipo 1, células natural killer (NK), células T natural killer (NKT), monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas, células de Langerhans e basófilos⁽²⁵⁾, sendo expresso em uma ampla variedade de tecidos⁽²⁶⁾ e células não-hematopoiéticas^(25, 27, 28). A proteína está diretamente envolvida no recrutamento seletivo de vários subconjuntos de leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, células natural killer (NK) e linfócitos⁽²⁹⁻³¹⁾. De forma semelhante ao CCL5, o CCR5 é superexpresso em muitos tipos de câncer ⁽³²⁻³⁶⁾.

A ativação dos sinais de transdução desencadeados pelo acoplamento do CCR5 com ligantes estimula não apenas a migração celular, mas também influencia a proliferação, expressão de citocinas e ativação de funções efetoras⁽³⁷⁾. O polimorfismo *CCR5*Δ32 (rs333) é uma deleção de 32 pares de bases, que ocasiona

uma alteração na matriz de leitura (“frameshift”) do gene *CCR5*, levando a uma perda de função em decorrência da abolição da expressão da superfície celular do receptor^(38, 39).

Estudos mostraram que a expressão de *CCL5/CCR5* estava aumentada em indivíduos com nefropatia diabética (ND) ou retinopatia diabética (RD), e sua expressão anormal estava associada a inerente lesão renal ou à formação de neovascularização intraocular^(40, 41). Assim, as mutações nos genes *CCL5* ou *CCR5* podem ser determinantes na patogênese do DM2.

Outro gene importante na resposta hospedeira é o HLA-G. Caracteriza-se como um gene não clássico de classe I, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21-3)^(42, 43). Este é expresso não somente na superfície da membrana das células, mas também nos fluidos corporais na forma de HLA-G solúvel⁽⁴⁴⁾. O principal polimorfismo observado na região 3’ não traduzida (3’UTR) do *HLA-G*, na posição 3741, é caracterizado pela presença de inserção ou deleção de 14 pares de base (pb) (rs1704)⁽⁴⁵⁾, o que influencia a estabilidade do mRNA⁽⁴⁶⁾. Os transcritos do *HLA-G* gerados por seus alelos com a sequência de inserção de 14 pb, podem estar sujeitos a um *splicing* alternativo adicional, com a remoção de mais 92 pb. Tal acontecimento, confere melhor resistência à degradação do mRNA^(42, 47), altera a função⁽⁴⁸⁾ e os níveis da proteína^(49, 50).

O HLA-G apresenta efeitos inibitórios, ou seja, propriedades imunossupressivas, através de interações com receptores expressos nas células do sistema imune⁽⁵¹⁾. Ele inibe a função citolítica de células NK⁽⁵²⁾ e linfócitos T, a resposta aloproliferativa de células T CD4+, a proliferação de células T e NK, a maturação de células dendríticas e induz as células T regulatórias⁽⁵³⁾.

Pelo fato de a molécula HLA-G estar envolvida em vários processos imunoregulatórios e em desordens inflamatórias, representa um excelente gene candidato para associação com a periodontite. Ainda, sua associação com DM2 também pode ser hipotetizada, tendo em vista este distúrbio metabólico apresentar um estado inflamatório crônico envolvendo disfunção endotelial.

O presente estudo teve o objetivo de investigar se polimorfismos nos genes *CCR5* (*CCR5Δ32*), *CCL5* (*rs1800825* e *rs2107538*) e *HLA-G* (*indel 14pb*) influenciam na ocorrência de Periodontite em indivíduos com e sem Diabetes Mellitus tipo 2, de uma população do Nordeste brasileiro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População alvo, tipo, localização e desenho do estudo

A população de estudo, oriunda do Estado de Pernambuco, foi constituída por indivíduos diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e indivíduos saudáveis para as duas condições (CS). Todos os envolvidos foram recrutados e avaliados no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e na Clínica do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (PPGO-UFPE), no período de novembro/2015 a setembro/2017.

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, composto por uma etapa clínica e uma etapa laboratorial, onde a amostragem se deu de forma aleatória e, inicialmente, não-probabilística. Foram recrutados um total de 285 indivíduos, sendo 111 com DM2+P, 102 com apenas P e 72 indivíduos CS.

As análises laboratoriais aconteceram no Laboratório de Biologia Molecular da PPGO-UFPE e no Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

2.2 Critérios de inclusão e exclusão e considerações éticas

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

- ✓ Critérios de inclusão para o grupo com DM2 e Periodontite (DM2+P): ser portador de DM2 e ter o diagnóstico clínico de periodontite crônica (PC)^(54, 55); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia)⁽⁵⁶⁾.
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo com apenas Periodontite (P): ter o diagnóstico clínico de PC^(54, 55); ter idade mínima de 35 anos e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia)⁽⁵⁶⁾;
- ✓ Critérios de inclusão para o grupo de indivíduos Controles Saudáveis (CS): ter idade mínima de 35 anos, não apresentar DM2 e/ou Periodontite, e, no mínimo, 8 dentes naturais (excluindo os com indicação de exodontia)⁽⁵⁶⁾.
- ✓ 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 e ser portador de DM2 e/ou Periodontite.

Todos os indivíduos foram informados sobre o teor e caráter científico da pesquisa, conscientizados dos benefícios e possíveis danos que teriam em participar

da mesma. Mediante aceitação em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em seguida, para cada indivíduo foi preenchido um periograma e o diagnóstico clínico de periodontite foi realizado com base na classificação vigente no momento das coletas^(54, 55). Posteriormente, os grupos foram reorganizados considerando o “Novo esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantar”⁽⁵⁷⁾.

Todos os procedimentos e condutas adotadas no presente trabalho, seguiram a normativa nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa em humanos. Ainda, todos os procedimentos clínicos e laboratoriais utilizados neste 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 HAM, instituição coparticipante (registro nº 1368830).

2.3 Exame clínico e Diagnóstico da Periodontite

De cada indivíduo foram coletados dados sobre idade, sexo, renda, escolaridade, tabagismo, e preenchido um periograma, constando de dados referente a 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, odontoscópio e sonda periodontal milimetrada tipo Carolina do Norte (Trinity®). Durante todo o processo, três examinadores e anotadores calibrados fizeram os exames clínicos e o registro nas fichas dos indivíduos (valores de concordância Kappa $0,40 < k < 0,75$)⁽⁵⁸⁾.

O diagnóstico clínico de periodontite foi realizado com base nas diretrizes da Academia Americana de Periodontologia de 1999⁽⁵⁵⁾, vigente no momento da coleta. Com a chegada do “Atual esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantar”⁽⁵⁷⁾, os grupos tiveram que ser reorganizados. Neste sentido, foi considerado como portadores de doença periodontal, indivíduos reclassificados como periodontite (em todos os estádios e graus) e como saúde clínica com periodonto reduzido (periodontite estável). Foram considerados indivíduos controles, aqueles com saúde periodontal e gengival (com periodonto íntegro e/ou reduzido, desde que não tenha sido decorrente de doença periodontal), além daqueles com gengivite por biofilme. Os indivíduos com DM2, no novo esquema de classificação, são considerados um grupo a parte, devido a particularidade da relação entre as duas doenças

2.4 Coleta do material biológico e isolamento do DNA

Após o exame clínico, foi realizada a coleta de saliva em tubos do tipo Falcon (15ml) estéreis, solicitando, a cada indivíduo, cuspir por 3 minutos⁽⁵⁹⁾. Esse material foi devidamente identificado e mantidos 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 mesmo protocolo para amostras de sangue, preconizado pelo fabricante. O DNA genômico isolado foi quantificado e verificado quanto sua pureza, através do espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fischer®).

2.5 Seleção dos polimorfismos e genotipagem

A seleção dos polimorfismos nos genes *CCL5*, *CCR5* e *HLA-G* foi baseada em seu impacto funcional, nos valores das frequências alélicas mínimas (do inglês “Minim Allele Frequency – MAF”) superiores a 0,05 (5%) nas populações caucasiana (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry - CEU) e africana (Yoruba in Ibadan, Nigeria -YRI) e no histórico de associação das variantes com doenças de caráter inflamatório. A seleção se deu de acordo com as bases de dados do NCBI e 1000genomes⁽⁶⁰⁾.

Foram selecionados 4 polimorfismos, sendo dois polimorfismos de única base (SNPs) no gene *CCL5* (*rs2107538* e *rs1800825*), uma deleção no gene do receptor de quimiocina *CCR5* (*CCR5Δ32*) e uma inserção/deleção (indel) no gene *HLA-G* (*HLA-G* -14pb indel).

A genotipagem do polimorfismo *14pb indel* em *HLA-G* foi realizada através de PCR convencional, segundo metodologia modificada de Hviid *et al.*⁽⁴⁹⁾. As reações foram preparadas com volume final de 25ul, apresentando as concentrações finais de 1x PCR buffer, 0,2 nM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,75 U de Taq polimerase e 10 pmol de cada primer (forward 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' e reverse 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'). As condições térmicas foram: 94°C por 2 minutos, seguidas por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos gerados, 224pb (inserção) e 210pb (deleção), foram visualizados em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídeo.

A genotipagem da deleção de 32pb em *CCR5* (*CCR5Δ32*), foi realizada segundo Dean *et al.*⁽⁶¹⁾, por PCR convencional. As reações foram preparadas para um volume final de 25μL, sendo 1 μL de DNA genômico (25 ng/μl), 2,5 μL de buffer PCR,

0,8 µL de dNTPs, 1,0 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq polimerase, 0,4 µL de cada primer (10 µM) - forward 5'-GTCTTCATTACACCTGCAGCTCT-3' e reverse 5'-CACAGCCCTGTGCCTCTT-3' e 18,7 µL de água de injeção. As condições térmicas de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguida de 38 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64,5°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os amplicons gerados de 185pb (alelo selvagem) e 153pb (Δ 32) foram visualizados em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídeo.

Os SNPs em *CCL5* foram genotipados por PCR em tempo real, utilizando sondas alelo específicas (TaqMan®), no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems®). Foram utilizadas reações com volume final de 5 µl, as quais foram compostas por 1µl de DNA molde (25ng/µl), 1,25µl de água ultrapura, 2,5µl do TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 0,25µl de cada sonda diluídas a 20x (Applied Biosystems®). As corridas foram realizadas para 50 ciclos, seguindo as condições térmicas padrão do equipamento.

2.6 Análise Estatística

As frequências alélicas e genotípicas, para cada SNP, foram calculadas por contagem direta utilizando o programa Genotype Transposer⁽⁶²⁾. 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, utilizando o programa R Project⁽⁶³⁾.

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.

O nível de significância estatística adotado em todas as análises foi de $\alpha < 0,05$.

3 RESULTADOS

As características clínico-epidemiológicas dos grupos estudados foram descritas na Tabela 1. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos em relação ao sexo, idade, estado civil, renda, escolaridade, histórico de tabagismo e características intraorais.

Para a variável sexo, apesar de 78% dos indivíduos estudados serem do sexo feminino, o sexo masculino foi significativamente mais frequente em indivíduos DM2+P (27%; $p=0.005$) e P (23,4%; $p=0.021$) que nos controles saudáveis (10,4%). Em relação a idade, indivíduos DM2+P (59 anos) apresentaram uma maior mediana de idade em relação aos indivíduos com P (52 anos) e os indivíduos CS (47 anos), diferindo significativamente ($p > 0,05$). Diferenças significativas também foram observadas entre indivíduos com P e CS.

Em relação ao estado civil, observou-se diferença significativa ($p=0.025$) quanto ao percentual de indivíduos solteiros entre os grupos DM2+P (19,8%) e P (33%). Ainda, 53,5% dos participantes da pesquisa eram casados. Avaliando a renda, indivíduos DM2+P (1 salário) e P (1 salário) apresentaram uma mediana de renda inferior a observada entre os CS (2 salários), diferindo significativamente ($p > 0,05$). Com relação ao histórico de tabagismo, foram observadas diferenças significativas na

comparação de DM2+P (39,6%, $p=0,0002$) e P (31,2%; $p=0,009$) em relação aos CS (14,3%).

Analisando a escolaridade, foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os indivíduos DM2+P com relação aos indivíduos com apenas P e aos CS. Indivíduos com baixos níveis de escolaridade (analfabeto, fundamental incompleto e completo) foram mais frequentes nos DM2+P. Por outro lado, indivíduos com alto nível de escolaridade (pós-graduação) foram significativamente mais frequentes nos CS (14,3%) que nos DM2+P (1,8%; $p=0,031$).

Em relação às variáveis intraorais, indivíduos DM2+P (15 dentes) apresentaram uma menor mediana de número de dentes em relação aos indivíduos com apenas P (20 dentes) e CS (22 dentes). Adicionalmente, indivíduos com apenas P, também diferiram significativamente dos CS, com relação ao número de dentes.

Indivíduos DM2+P também apresentaram maiores medianas para profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e índice de sangramento, em comparação com indivíduos com apenas P e CS. Semelhantemente, indivíduos com apenas P também diferiram significativamente em relação aos CS.

Em relação ao índice de placa, tanto os indivíduos DM2+P quanto P, apresentaram maiores medianas quando comparados com CS ($p>0,05$). Em relação às variáveis relacionadas diretamente à periodontite (estádio, grau e extensão), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos DM2+P e P.

Em relação às variantes genéticas, as distribuições alélicas e genótípicas foram apresentadas na Tabela 2. Foram observados desvios da distribuição genotípica em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *indel 14pb* em *HLA-G*, do SNP *rs1800825* em *CCL5* nos três grupos estudados, assim como para o SNP *rs2107538*, nos grupos de indivíduos com apenas P e CS.

Em relação a variante *CCR5*Δ32, observou-se uma baixa frequência na população estudada, sendo a menor frequência entre os DM2+P (0,5%) e a maior entre os CS (2,1%), sendo estas oriundas de genótipos heterozigotos, visto que não se observou nenhum indivíduo homozigoto para Δ32. Apesar das diferenças percentuais entre os grupos, não foram observadas diferenças significativas em relação às distribuições alélicas e genóticas (Tabela 2).

Em relação aos SNPs em *CCL5*, diferenças significativas foram observadas entre os grupos para o polimorfismo *rs1800825*. O alelo A foi o mais frequente em todos os grupos com frequências superiores a 65%. O alelo G foi significativamente mais comum entre indivíduos DM2+P (34,1%) em relação aos indivíduos com apenas P (22,5%; $p=0,009$). Similarmente, indivíduos DM2+P com o genótipo AG (68,2%) foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P (45,1%; $p=0,001$). Para o SNP *rs2107538*, apesar de diferenças percentuais, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 2).

Em relação ao *indel 14pb* em *HLA-G*, o alelo D (deleção) foi o mais frequente, com percentuais acima de 50% em todos os grupos. Semelhantemente, na distribuição genótica, o genótipo homozigoto para a deleção (DD) foi o mais frequente com frequências compreendidas entre 4,5% e 17,1%. Já o genótipo homozigoto para inserção (II) foi observado apenas entre os indivíduos com DM2+P. O genótipo heterozigoto foi significativamente mais frequente entre indivíduos DM2+P (92,8%) que nos CS (88%, $p=0,008$) (Tabela 2).

As distribuições genóticas das variantes, de acordo com as características clínicas, também apresentaram resultados interessantes. Genótipos variantes (GG+AG) para o SNP *rs1800825* em *CCL5* foram significativamente mais frequentes em indivíduos DM2+P (72,6%) que naqueles com apenas P (40%, $p=0,007$) no estágio

III da doença periodontal (Tabela 3). Diferenças significativas também foram observadas quanto a presença de genótipos variantes nos genes *HLA-G* e *CCL5* (*rs1800825*) entre indivíduos DM2+P e P quanto ao grau (B) e a extensão (generalizada) da doença periodontal (Tabela Suplementar 3).

Em relação às variantes intraorais, indivíduos DM2+P, com genótipos variantes para *HLA-G* (DI+II), com menos de 20 dentes, com profundidade de sondagem menor que 4 mm, com índice de sangramento menor que 10% e com presença de placa visível, foram significativamente mais frequentes que CS nas mesmas condições. Adicionalmente, indivíduos DM2+P com menos de 20 dentes e com genótipos variantes para *HLA-G*, também foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P nas mesmas condições (Tabela Suplementar 4).

Quanto ao SNP *rs1800825* em *CCL5*, indivíduos DM2+P, com presença de placa visível e genótipos variantes (GG+AG), foram significativamente maiores tanto em relação aos CS, quanto aos indivíduos com apenas P. Diferenças significativas foram observadas entre indivíduos DM2+P e P com ao índice de sangramento maior que 10%, quanto a presença dos genótipos variantes que foi mais frequente em indivíduos DM2+P. Quanto a profundidade de sondagem menor que 4 mm, indivíduos DM2+P com genótipos variantes (GG+AG) foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P. Quanto a presença de número de dentes menor que 20, indivíduos DM2+P com genótipos variantes (GG+AG) foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P. Por outro lado, indivíduos CS, com número de dentes menor que 20 e com a presença dos genótipos variantes (GG+AG) foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P nas mesmas condições (Tabela Suplementar 4).

Já para o SNP *rs2107538* em *CCL5*, diferenças significativas foram observadas entre os grupos em relação ao número de dentes. Indivíduos com apenas P, com menos de 20 dentes e com os genótipos variantes (TT+CT) foram significativamente mais frequentes que indivíduos CS, nas mesmas condições. Já indivíduos DM2+P, com mais de 20 dentes e com genótipos variantes (TT+CT) foram significativamente mais frequentes que indivíduos com apenas P, nas mesmas condições (Tabela Suplementar 4).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou se polimorfismos nos genes das Quimiocinas *CCL5* (*rs1800825* e *rs2107538*) e *CCR5* (*CCR5Δ32*) e do Antígeno Leucocitário Humano (*HLA-G indel 14pb*) influenciam no desenvolvimento de Periodontite em indivíduos com e sem Diabetes Mellitus tipo 2, de uma população do Nordeste brasileiro.

O Diabetes Mellitus afeta cerca 382 milhões de pessoas em todo o mundo e esse número poderá chegar a 592 milhões em 2035, com projeções de prevalência, em adultos de 18-99 anos, de 9,9%, em 2045⁽⁶⁴⁾. A interação entre P e DM2 é conhecida. Diabetes é um dos principais fatores de risco para periodontite⁽⁶⁵⁾, e esta é considerada a sexta complicação do diabetes⁽⁶⁶⁾.

A periodontite pode influenciar um estado inflamatório crônico sistêmico elevado, resultando em aumento da resistência à insulina e hiperglicemia não controlada⁽⁶⁷⁾. Após a estimulação por patógenos orais e seus fatores de virulência, diferentes células imunes e não imunes, ou seja, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, produzem uma variedade de quimiocinas⁽⁶⁸⁾. Com isso, a periodontite e o DM2 podem compartilhar mecanismos inflamatórios patogênicos⁽⁶⁷⁾.

As variáveis descritivas analisadas neste estudo evidenciaram relação com a presença de doença periodontal associada ou não ao DM2. As análises de Rodrigues *et al.*, em 2020⁽⁶⁹⁾, mostraram maior incidência de doenças periodontais em indivíduos idosos, com maior predileção de doenças crônicas para o sexo masculino. Em nossa população, o aumento da susceptibilidade para DM2 e P ou de apenas P também esteve ligada ao sexo masculino quando comparado ao grupo saudável para essas condições.

O hábito de fumar está associado a uma maior susceptibilidade à periodontite⁽⁷⁰⁾ e ao aumento das lesões decorrentes do DM2. O cigarro é capaz de aumentar a concentração de gordura na região abdominal e reduzir a sensibilidade à insulina⁽⁷¹⁾. O resultado demonstrou que a presença do fumo aumentou a chance da presença de DM2 e P associadas ou não.

Este estudo observou que indivíduos com menor escolaridade (analfabeto, fundamental incompleto e fundamental completo) apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de DM2 associada à P, enquanto indivíduos com maior nível de escolaridade (pós-graduação) e maior renda demonstraram menor chance de apresentar essas condições. A baixa escolaridade pode favorecer a não adesão ao plano terapêutico pela dificuldade para ler e entender a prescrição, aumentando, assim, os riscos à saúde. Além disso, o baixo nível de escolaridade pode limitar o acesso às informações, provavelmente em razão do comprometimento das habilidades de leitura, escrita e fala, bem como à compreensão dos complexos mecanismos da doença e do tratamento⁽⁷²⁾.

Os dados intraorais evidenciaram uma menor perda dentária (maior número de dentes presentes) e uma melhor higiene oral (menor índice de placa visível) entre os indivíduos do grupo CS. Quanto às médias de profundidade de sondagem e de perda

de inserção, o grupo DM2+P apresentou os maiores números, tendo em vista que a presença da DP aumenta a reabsorção alveolar e provoca alterações inflamatórias gengivais, somando-se isto com o diabetes que retarda a síntese de colágeno, atrasando a reparação tecidual⁽⁷³⁾.

O sangramento à sondagem foi mais evidente no grupo apenas com periodontite mesmo em relação ao grupo DM2+P. Como o nível de controle glicêmico do indivíduo está relacionado à presença e severidade da DP⁽⁷⁴⁾, este fato pode explicar o percentual de sangramento, tendo em vista que os indivíduos com DM2 deste estudo foram recrutados em um hospital que é referência para o acompanhamento do diabetes.

Alterações genéticas podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento e agravamento de DM2 e DP. Indivíduos diabéticos apresentam altos níveis de marcadores inflamatórios no sangue, como TNF- α , IL-6, proteína C reativa e fibrinogênio, os quais estão relacionados à resistência à insulina. Desta forma, a presença da DP resulta na elevação dos níveis sanguíneos destes marcadores inflamatórios, o que induz maior resistência à insulina, prejudicando o controle glicêmico⁽⁷³⁾.

As quimiocinas CC ligam-se ao receptor 5 de quimiocinas e promovem o recrutamento e o acúmulo de uma infinidade de células inflamatórias no tecido periodontal. Tanto CCR5 quanto CCL5 foram encontrados *in situ* em locais periodontalmente afetados no fluido gengival crevicular e tecidos periodontais⁽⁷⁵⁾. De acordo com observações mais recentes, a expressão do *CCR5* é particularmente elevada na periodontite agressiva^(21, 76).

A deleção de 32 pb do gene *CCR5* altera a estrutura da proteína receptora⁽²¹⁾, reduz sua afinidade de combinação com CCL5 e resulta em inflamação suprimida.

Portanto, é razoável supor que as alterações na atividade funcional do CCR5 podem, em princípio, também influenciar a susceptibilidade à DP. No entanto, os achados de Shih *et al.*⁽²²⁾ e de outros autores rejeitaram essa hipótese ao sugerirem que a mutação *CCR5Δ32* foi igualmente distribuída entre indivíduos com periodontite e controles saudáveis em uma população chinesa⁽⁷⁷⁾. O presente estudo também não evidenciou associação entre o polimorfismo *CCR5Δ32* e a ocorrência de P isolada ou associada à DM2.

Já para DM2, que desencadeia uma condição inflamatória generalizada, este estudo concorda com a hipótese de que o *CCR5Δ32* também pode estar associado à um menor risco de mortalidade por complicações⁽⁷⁸⁾. Além disso, outros polimorfismos *CCR5* foram implicados no desenvolvimento de complicações diabéticas. Assim, a deficiência de CCR5, resultante da variante *CCR5Δ32*, poderia explicar o porquê os portadores tiveram uma sobrevida melhor no estudo⁽⁷⁸⁾.

Para os polimorfismos do ligante *CCL5*, o *rs1800825* mostrou associação significativa ao comparar o grupo DM2+P com o grupo com apenas P, relacionando que o alelo variante pode estar ligado à presença de Diabetes nos pacientes com periodontite. Já o *rs2107538* não evidenciou nenhuma associação significativa neste estudo. Estes dados são inéditos para a literatura e podem desencadear um novo caminho de pesquisas que visam elucidar a correlação entre essas doenças.

Por apresentar várias atividades biológicas (inibição celular, regulação imunológica e trogocitose), incluindo a supressão da resposta imune, polimorfismos do gene do antígeno leucocitário humano podem fornecer susceptibilidade importante ou fatores de resistência à periodontite.^(79, 80)

Vários polimorfismos em *HLA* foram investigados como possíveis marcadores de susceptibilidade à periodontite e os estudos variaram em critérios de inclusão,

procedimentos metodológicos e resultados. Matuella *et al.* ⁽⁸¹⁾ investigaram a relação do *HLA-G* com periodontite crônica e aguda e, embora não tenha sido observada significância estatística para o alelo *HLA-G indel 14pb*, esse polimorfismo foi mais frequente entre os indivíduos com P.

Estudando se o polimorfismo *HLA-G indel 14pb* está relacionado à hipertensão na síndrome coronariana aguda e no DM2, García-González *et al.* ⁽⁸²⁾ encontraram níveis aumentados de HLA-G solúvel em indivíduos com DM2. Os dados do presente estudo revelaram significância estatística entre os heterozigotos do polimorfismo *HLA-G indel 14pb* quando comparado o grupo DM2+P com o grupo CS. Ainda, a presença do alelo variante esteve associada com um maior grau e extensão da doença periodontal nesta população e, analisando as variáveis clínicas, também foi associado à uma maior chance de ter menos que vinte dentes e um maior índice de placa visível.

O EHW esteve fora da normalidade ($X^2 > 3,841$) em algumas distribuições genotípicas, o que pode ter afetado nossos resultados. As causas para tais desvios podem estar relacionadas com a própria doença, a qual pode efetuar uma seleção de determinados genótipos em detrimento aos outros. Os desvios também podem ser atribuídos ao tamanho amostral reduzido ou mesmo erros inerentes ao processo de genotipagem.

Os rigorosos critérios de inclusão e exclusão utilizados neste estudo contribuíram para a diminuição do risco de vieses da pesquisa, pois possibilitaram a formação de grupos os mais homogêneos possíveis. Porém, isto dificultou o aumento do número de indivíduos na amostra, o que caracteriza uma das limitações do estudo. Outra dificuldade foi adaptar a pesquisa à atual Classificação para Doenças Periodontais ⁽⁵⁷⁾, tendo em vista as coletas já terem sido concluídas no momento desta publicação. Por esta atual classificação possuir parâmetros de avaliação muito

clínicos e de acompanhamento, alguns indivíduos antes considerados controles, passaram a integrar o grupo de periodontite. Isto aconteceu porque a atual classificação inclui os indivíduos sem doença ativa e com periodonto reduzido nos estádios iniciais da periodontite.

As análises do presente estudo apresentaram evidências inéditas para o contexto da DM2 e P em relação as variantes genéticas *CCL5* e *HLA-G*, despertando a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos de variantes genéticas nestes genes, na Periodontite e no Diabetes Mellitus tipo 2.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados, o presente estudo sugere que:

- ✓ Os fatores ambientais e genéticos estão implicados no contexto da P, com ou sem a presença do DM2;
- ✓ Não há associação entre o polimorfismo *CCR5Δ32* e a presença de P isolada ou associada com DM2, assim, somando-se aos estudos anteriores, essa mutação aparentemente não tem influência na susceptibilidade à P;
- ✓ O *rs1800825* do gene *CCL5* pode estar associado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de DM2 em indivíduos com P. Já o *rs2107538* do mesmo gene não evidenciou nenhuma associação neste estudo;
- ✓ O polimorfismo *indel 14pb* do gene *HLA-G* esteve implicado com a presença de DM2 e P associadas, com um maior grau e extensão de DP e, ainda, à uma maior chance de ter menos que vinte dentes e um maior índice de placa visível.

Com isso, o presente estudo se destaca ao ser pioneiro na pesquisa dos polimorfismos *CCR5Δ32*, *CCL5* (*rs1800825* e *rs2107538*) e *HLA-G indel 14pb* em um grupo com a interação de duas doenças. É evidente a importância de estudos nesta

linha com o objetivo de elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na etiologia e na progressão da periodontite isolada e associada ao DM2, pois, com isso, melhores terapias e prognósticos poderão ser desenvolvidos.

‘Não houve conflitos de interesse nesse trabalho.’

Agradecimentos

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro, na forma de bolsa de Doutorado, concedido à Camila Agra Souza.

Referências

1. Duarte P, Bastos M, Fermiano D, Rabelo C, Perez-Chaparro P, Figueiredo L, et al. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *Journal of periodontal research*. 2015;50(1):18-27.
2. Sun HY, Jiang H, Du MQ, Wang X, Feng XP, Hu Y, et al. The prevalence and associated factors of periodontal disease among 35 to 44-year-old Chinese adults in the 4th National Oral Health Survey. *Chin J Dent Res*. 2018;21(4):241-7.
3. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*. 1988;239(4835):55-7.
4. Xiong G, Ji W, Wang F, Zhang F, Xue P, Cheng M, et al. Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF-κB signaling pathway. *BioMed research international*. 2019;2019.
5. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(12):1046-52.
6. Artese HPC, Foz AM, de Sousa Rabelo M, Gomes GH, Orlandi M, Suvan J, et al. Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(5):e0128344.
7. Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1993;20(3):161-5.
8. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodontology*. 2001;6(1):91-8.
9. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Annals of periodontology*. 2001;6(1):99-112.
10. Atkinson MA, Maclaren NK. What causes diabetes? *Scientific American*. 1990;263(1):62-71.
11. Morgan CL, Currie CJ, Peters JR. Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. *Diabetes care*. 2000;23(8):1103-7.

12. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2013;43(3):504-13.
13. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008;79:1527-34.
14. Cefalu WT, Ratner RE. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: the “gift” that keeps on giving! : *Am Diabetes Assoc*; 2014.
15. Garlet G, Sfeir C, Little S. Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs. *Journal of dental research*. 2014;93(9):834-9.
16. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):33-53.
17. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica*. 2001;59(3):167-73.
18. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *The Journal of Immunology*. 1988;141(3):1018-25.
19. Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1996;15(12):1194-9.
20. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1535-45.
21. Fokkema S, Loos B, Van Der Velden U. Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003;131(3):477-83.
22. Shih YS, Fu E, Fu MM, Lin FG, Chiu HC, Shen EC, et al. Association of CCL5 and CCR5 gene polymorphisms with periodontitis in Taiwanese. *Journal of periodontology*. 2014;85(11):1596-602.
23. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8 $^{+}$ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.
24. Kranjc MK, Novak M, Pestell RG, Lah TT. Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme. *Radiology and oncology*. 2019;53(4):397.
25. Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *Jama*. 2006;296(7):815-26.
26. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *Journal of neurochemistry*. 2002;82(6):1311-29.
27. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):344-5.
28. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(37):35755-66.
29. Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(1):35-8.
30. Repeke CE, Ferreira Jr SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1 $^{+}$ and CCR5 $^{+}$ in RANKL $^{+}$ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. 2010;46(4):1122-30.
31. Cavalla F, Bigueti CC, Dionisio TJ, Azevedo MC, Martins Jr W, Santos CF, et al. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with decreased risk of chronic and aggressive periodontitis: a case-control analysis based in disease resistance and susceptibility phenotypes. *Cytokine*. 2018;103:142-9.
32. Silva REMP. Desvendando o papel do receptor CCR5 em modelo experimental de dengue em camundongos. 2012.

33. Navarro-Sánchez E, Desprès P, Cedillo-Barrón L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35.
34. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62.
35. Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(12):1808-17.
36. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999;257(1):1-6.
37. Arimont M, Sun S-L, Leurs R, Smit M, De Esch IJ, de Graaf C. Structural analysis of chemokine receptor–ligand interactions. *Journal of medicinal chemistry*. 2017;60(12):4735-79.
38. Hütter G, Neumann M, Nowak D, Klein S, Klüter H, Hofmann W-K. The effect of the CCR5-delta32 deletion on global gene expression considering immune response and inflammation. *Journal of Inflammation*. 2011;8(1):1-8.
39. Galvani AP, Novembre J. The evolutionary history of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection*. 2005;7(2):302-9.
40. Kawashima M, Shoji J, Kamura Y, Sato Y. Role of chemokines in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2005;109(9):596-602.
41. Yang B, Houlberg K, Millward A, Demaine A. Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications. *Cytokine*. 2004;26(3):114-21.
42. Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*. 2003;55(2):63-79.
43. Rizzo R, Hviid T, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*. 2008;71(6):520-9.
44. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S, editors. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in cancer biology*; 2007: Elsevier.
45. Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JAB. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Human immunology*. 2007;68(8):668-74.
46. Veit T, Chies J. Tolerance versus immune response—microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transplant immunology*. 2009;20(4):229-31.
47. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human immunology*. 2003;64(11):1005-10.
48. Cervera I, Herraiz MA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Macedo J, et al. Human leukocyte antigen–G allele polymorphisms have evolved following three different evolutionary lineages based on intron sequences. *Human immunology*. 2010;71(11):1109-15.
49. Hviid T, Hylenius S, Hoegh A, Kruse C, Christiansen O. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue antigens*. 2002;60(2):122-32.
50. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue antigens*. 2008;72(4):335-41.
51. Carosella ED, Moreau P, LeMaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology*. 2008;29(3):125-32.
52. Le Bouteiller P, Mallet V. HLA-G and pregnancy. *Reviews of reproduction*. 1997;2(1):7-13.
53. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunology letters*. 2011;138(1):22-4.
54. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. 1999;4(1):1-6.
55. Periodontitis O. 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.

56. Cimdões R, Siqueira RRACd, Crovella S, Souza PREd, Donos N. A fast method for DEFB1-44C/G SNP genotyping in Brazilian patients with periodontitis. *Acta stomatologica Croatica*. 2014;48(3):208-15.
57. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. Wiley Online Library; 2018.
58. Fomete B, Osunde OD, Ogbeifun J, Agbara R, Ononiwu CN. A 10-year retrospective analysis of 64 cases of cystic lesions of the oral and maxillofacial region in a Nigerian tertiary hospital. *Oman Medical Journal*. 2016;31(6):434-8.
59. 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. *Archives of oral biology*. 2015;60(7):1054-8.
60. Consortium GP. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68.
61. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science*. 1996;273(5283):1856-62.
62. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics*. 2001;17(8):738-9.
63. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
64. Cho N, Shaw J, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes J, Ohlrogge A, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*. 2018;138:271-81.
65. Wu Y-Y, Xiao E, Graves DT. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. *International journal of oral science*. 2015;7(2):63-72.
66. Loe H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993;16(1):329-34.
67. Acharya AB, Thakur S, Muddapur M, Kulkarni RD. Cytokine ratios in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017;11(4):277-8.
68. Mustafa M, Wondimu B, Bakhiet M, Modéer T. Production of Rantes/CCL5 in human gingival fibroblasts challenged with tumor necrosis factor α . *European journal of oral sciences*. 2001;109(1):44-9.
69. RODRIGUES KT, MEDEIROS LADMd, SOUSA JNLd, SAMPAIO GAdM, RODRIGUES RdQF. Associação entre condições sistêmicas e gravidade da doença periodontal em pacientes atendidos na Clínica-Escola da UFCG. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2020;49.
70. 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. *Journal of dentistry*. 2017;67:36-42.
71. Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2007;298(22):2654-64.
72. Rodrigues FFL, Santos MAd, Teixeira CRdS, Gonela JT, Zanetti ML. Relationship between knowledge, attitude, education and duration of disease in individuals with diabetes mellitus. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2012;25(2):284-90.
73. Arruda TM, Raimondi JV. Doença Periodontal X Diabetes Mellitus. *Rev Salusvita (Online)*. 2018;695-704.
74. Brandão DFL, Silva APG, Penteado LAM. Bidirectional relationship between periodontal disease and diabetes mellitus. *Odontologia Clínico-Científica (Online)*. 2011;10(2):117-20.
75. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor *CCR5* and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2001;36(3):194-203.

76. Garlet GP, Martins Jr W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 2003;38(2):210-7.
77. Savarrio L, Donati M, Carr C, Kinane D, Berglundh T. Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associated with chronic adult periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2007;42(2):152-8.
78. Muntinghe FL, Gross S, Bakker SJ, Landman GW, van der Harst P, Bilo HJ, et al. CCR5Δ32 genotype is associated with outcome in type 2 diabetes mellitus. *diabetes research and clinical practice*. 2009;86(2):140-5.
79. Rodrigues JKF, Crovella S, da Silva RC. The HLA-G 14 bp allele frequency in different populations: A global meta-analysis. *Meta Gene*. 2020;23:100624.
80. Stein JM, Machulla HK, Smeets R, Lampert F, Reichert S. Human leukocyte antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(3):183-92.
81. Mattuella LG, Bernardi L, Zambra FMB, Campagnaro MB, Oppermann RV, Xavier LL, et al. Human leukocyte antigen-G polymorphisms in periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2020;78(2):141-5.
82. García-González IJ, Valle Y, Rivas F, Figuera-Villanueva LE, Muñoz-Valle JF, Flores-Salinas HE, et al. The 14 bp Del/Ins HLA-G polymorphism is related with high blood pressure in acute coronary syndrome and type 2 diabetes mellitus. *BioMed research international*. 2014;2014.

TABELAS

Tabela 1 - Caracterização clínico-epidemiológica de indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e Controles Saudáveis (CS), de uma população do Nordeste brasileiro.

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

A	141 (65,9)	158 (77,5)	98 (71,0)			Referência	
G	73 (34,1)	46 (22,5)	40 (29,0)	1,27 (0,78-2,10), 0,350	0,71 (0,42-1,21), 0,204	1,77 (1,13-2,81), 0,009*	
AA	34 (31,8)	56 (54,9)	29 (42,0)		Referência		
AG	73 (68,2)	46 (45,1)	40 (58,0)	1,55 (0,79-3,05), 0,198	0,60 (0,31-1,15), 0,119	2,60 (1,43-4,78), 0,001*	
GG	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	Nc	nc	nc	
EHW	28,68	8,65	11,49				
CCL5 (rs2107538)							
C	107 (79,9)	124 (76,5)	88 (80)		Referência		
T	27 (20,1)	38 (23,5)	22 (20)	1,01 (0,51-2,00), 1,00	1,22 (0,65-2,33), 0,553	0,82 (0,45-1,49), 0,573	
CC	43 (64,2)	51 (62,9)	38 (69,1)		Referência		
CT	21 (31,3)	22 (27,2)	12 (21,8)	1,54 (0,63-3,93), 0,405	1,36 (0,56-3,42), 0,540	1,13 (0,52-2,48), 0,854	
TT	3 (4,5)	8 (9,9)	5 (9,1)	0,53 (0,08-2,95), 0,475	1,19 (0,31-5,01), 1,000	0,45 (0,07-2,02), 0,340	
EHW	0,045	4,81	5,57				

*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; n= número amostral.

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com os estádios da doença periodontal entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e com apenas Periodontite (P).

Genes/ Genótipos variantes	Estádios da Doença Periodontal											
	I			II			III			IV		
	DM+P n (%)	P n (%)	TEF OR (IC95%), p-value	DM+P n (%)	P n (%)	TEF OR (IC95%), p-value	DM+P n (%)	P n (%)	TEF OR (IC95%), p-value	DM+P n (%)	P n (%)	TEF OR (IC95%), p-value
CCR5 ($\Delta 32$)												
-	3 (100,0)	9 (100,0)	Ref.	11 (100,0)	15 (88,2)	Ref.	54 (100,0)	53 (100,0)	Ref.	24 (96,0)	20 (100)	Ref.
+	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	0 (0,0)	2 (11,8)	ns	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	1 (4,0)	0 (0,0)	ns
HLA-G (Indel 14pb)												
-	0 (0,0)	0 (0,0)	Ref.	0 (0,0)	3 (18,8)	Ref.	4 (6,3)	8 (14,8)	Ref.	1 (3,3)	1 (4,8)	Ref.
+	5 (100,0)	9 (100,0)	nc	13 (100,0)	13 (81,2)	ns	59 (93,7)	46 (85,2)	ns	29 (96,7)	20 (95,2)	ns
CCL5 (rs1800825)												
-	2 (40,0)	4 (44,4)	Ref.	6 (50,0)	10 (58,8)	Ref.	17 (27,4)	33 (60,0)	Ref.	9 (32,1)	9 (42,9)	Ref.
+	3 (60,0)	5 (55,6)	ns	6 (50,0)	7 (41,2)	ns	45 (72,6)	22 (40,0)	3,92 (1,71- 9,30) 0,007*	19 (67,9)	12 (57,1)	ns
CCL5 (rs2107538)												
-	3 (75,0)	3 (50,0)	Ref.	4 (66,7)	11 (68,8)	Ref.	25 (56,8)	29 (65,9)	Ref.	11 (84,6)	8 (53,3)	Ref.
+	1 (25,0)	3 (50,0)	ns	2 (33,3)	5 (31,2)	ns	19 (43,2)	15 (34,1)	ns	2 (15,4)	7 (46,7)	ns

*p-value significativo (<0.05); DM2+P = Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P = indivíduos com apenas periodontite; OR= Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; Ref.=Referência; nc= não calculado; ns = não significativo; + = presença; - = ausência; TEF = Teste Exato de Fisher; genótipos variantes: CCR5 - $\Delta 32/\Delta 32$ + $\Delta 32/\text{wt}$; HLA-G – II + ID; CCL5 (rs1800825) – GG + AG; CCL5 (rs2107538) – TT + CT.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1 - Distribuição de genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com os estádios da doença periodontal em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e apenas com 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>CCR5</i> ($\Delta 32$)										
	-	3 (100,0)	11(100,0)	54 (100,0)	24 (96,0)				Ref.		
	+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,0)	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	<i>HLA-G</i> (Indel 14pb)										
	-	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (6,3)	1 (3,3)				Ref.		
	+	5 (100,0)	13 (100,0)	59 (93,7)	29 (96,7)	nc	nc	nc	nc	nc	ns
	<i>CCL5</i> (<i>rs1800825</i>)										
	-	2 (40,0)	6 (50,0)	17 (27,4)	9 (32,1)				Ref.		
	+	3 (60,0)	6 (50,0)	45 (72,6)	19 (67,9)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<i>CCL5</i> (<i>rs2107538</i>)										
P	-	3 (75,0)	4 (66,7)	25 (56,8)	11 (84,6)				Ref.		
	+	1 (25,0)	2 (33,3)	19 (43,2)	2 (15,4)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<i>CCR5</i> ($\Delta 32$)										
	-	9 (100,0)	15 (88,2)	53 (100,0)	20 (100,0)				Ref.		
	+	0 (0,0)	2 (11,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	<i>HLA-G</i> (Indel 14pb)										
	-	0 (0,0)	3 (18,7)	8 (14,8)	1 (4,8)				Ref.		
	+	9 (100,0)	13 (81,3)	46 (85,2)	20 (95,2)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<i>CCL5</i> (<i>rs1800825</i>)										
	-	4 (44,4)	10 (58,8)	33 (60,0)	9 (42,9)				Ref.		
	+	5 (55,6)	7 (41,2)	22 (40,0)	12 (57,1)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	<i>CCL5</i> (<i>rs2107538</i>)										
	-	3 (50,0)	11 (68,7)	29 (65,9)	8 (53,3)				Ref.		

	+	3 (50,0)	5 (31,3)	15 (34,1)	7 (46,7)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
--	---	----------	----------	-----------	----------	----	----	----	----	----	----

*p-value significativo (<0.05); DM2+P = Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P = indivíduos com apenas periodontite; OR= Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; Ref.=Referência; ns= não significativo; nc= não calculado; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: CCR5 - $\Delta 32/\Delta 32$ + $\Delta 32/\text{wt}$; HLA-G – II + ID; CCL5 (rs1800825 – GG + AG; CCL5 (rs2107538) – TT + CT.

Tabela Suplementar 2 - Distribuição de genótipos variantes de polimorfismos nos genes *CCR5*, *HLA-G* e *CCL5* de acordo com o grau e extensão da doença periodontal em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e apenas com Periodontite (P).

Doença Periodontal										
Gene/ Genótipo Variante	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				
DM2+P	CCR5 (Δ32)									
	-	0 (0,0)	52 (100,0)	40 (97,6)		Ref.		13 (100,0)	79 (98,7)	Ref.
	+	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,4)	nc	nc	ns	0 (0,0)	1 (1,3)	Ns
	HLA-G (Indel 14pb)									
	-	0 (0,0)	2 (3,0)	3 (6,7)		Ref.		1 (5,3)	4 (4,3)	Ref.
	+	0 (0,0)	64 (97,0)	42 (93,3)	nc	nc	ns	18 (94,7)	88 (95,7)	Ns
	CCL5 (rs1800825)									
	-	0 (0,0)	20 (31,3)	14 (32,6)		Ref.		5 (26,3)	29 (33,0)	Ref.
	+	0 (0,0)	44 (68,7)	29 (67,4)	nc	nc	ns	14 (73,7)	59 (67,0)	Ns
	CCL5 (rs2107538)									
-	0 (0,0)	30 (69,8)	13 (54,2)		Ref.		6 (54,5)	37 (66,1)	Ref.	
+	0 (0,0)	13 (30,2)	11 (45,8)	nc	nc	ns	5 (45,5)	19 (33,9)	Ns	
P	CCR5 (Δ32)									
	-	8 (100,0)	58 (96,7)	31 (100,0)		Ref.		19 (95,0)	78 (98,7)	Ref.
	+	0 (0,0)	2 (3,3)	0 (0,0)	ns	ns	ns	1 (5,0)	1 (1,3)	ns
	HLA-G (Indel 14pb)									
	-	0 (0,0)	8 (13,1)	4 (12,5)		Ref.		2 (16,7)	18 (20,5)	Ref.
	+	7 (100,0)	53 (86,9)	28 (87,5)	ns	ns	ns	10 (83,3)	70 (79,5)	ns
	CCL5 (rs1800825)									
-	3 (37,5)	36 (58,1)	17 (53,1)		Ref.		8 (40,0)	48 (58,5)	Ref.	

+	5 (62,5)	26 (41,9)	15 (46,9)	ns	ns	ns	12 (60,0)	34 (41,5)	ns
CCL5 (rs2107538)									
-	4 (66,7)	34 (68,0)	13 (52,0)		Ref.		12 (80,0)	39 (59,1)	Ref.
+	2 (33,3)	16 (32,0)	12 (48,0)	ns	ns	ns	3 (20,0)	27 (40,9)	ns

*p-value significativo (<0.05); DM2+P = Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P = indivíduos com apenas periodontite; OR= Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; Ref.=Referência; nc= não calculado; ns = não significativo; + = presença; - = ausência; genótipos variantes: CCR5 - $\Delta 32/\Delta 32$ + $\Delta 32/wt$; HLA-G – II + ID; CCL5 (rs1800825) – GG + AG; CCL5 (rs2107538) – TT + CT.

Tabela Suplementar 3 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes CCR5, HLA-G, e CCL52 de acordo com o grau e extensão da doença periodontal entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P) e com apenas Periodontite (P).

Genes/ Genótipos variantes	Doença Periodontal																	
	A		TEF OR (IC95%); p-value	Grau		TEF OR (IC95%); p-value	C		TEF OR (IC95%); p-value	Localizada		TEF OR (IC95%); p-value	Extensão		TEF OR (IC95%); p-value			
	DM2+P n (%)	P n (%)		B	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 (%)
CCR5 (Δ32)																		
-	0 (0,0)	8 (100,0)	Ref.	52 (100,0)	58 (96,7)	Ref.	40 (97,6)	31 (100,0)	Ref.	13 (100,0)	19 (95,0)	Ref.	79 (98,7)	78 (98,7)	Ref.			
+	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	0 (0,0)	2 (3,3)	ns	1 (2,4)	0 (0,0)	ns	0 (0,0)	1 (5,0)	ns	1 (1,2)	1 (1,3)	ns			
HLA-G (Indel 14pb)																		
-	0 (0,0)	0 (0,0)	Ref.	2 (3,0)	8 (13,1)	Ref.	3 (6,7)	4 (12,5)	Ref.	1 (5,3)	2 (16,7)	Ref.	4 (4,3)	18 (20,5)	Ref.			
+	0 (0,0)	7 (100,0)	nc	64 (97,0)	53 (86,9)	4.78 (0,9- 48,0); 0.048*	42 (93,3)	28 (87,5)	ns	18 (94,7)	10 (83,3)	ns	88 (95,7)	70 (79,5)	5,61 (1,7- 23,8); 0,001*			
CCL5 (rs1800825)																		
-	0 (0,0)	3 (37,5)	Ref.	20 (31,3)	36 (58,1)	Ref.	14 (32,6)	17 (53,1)	Ref.	5 (26,3)	8 (40,0)	Ref.	29 (33,0)	48 (58,5)	Ref.			
+	0 (0,0)	5 (62,5)	nc	44 (68,7)	26 (41,9)	3,02 (1,4- 6,8); 0,004*	29 (67,4)	15 (46,9)	ns	14 (73,7)	12 (60,0)	ns	59 (67,0)	34 (41,5)	2,85 (1,5- 5,6); 0,001*			
CCL5 (rs2107538)																		
-	0 (0,0)	4 (66,7)	Ref.	30 (69,8)	34 (68,0)	Ref.	13 (54,2)	13 (52,0)	Ref.	6 (54,5)	12 (80,0)	Ref.	37 (66,1)	39 (59,1)	Ref.			
+	0 (0,0)	2 (33,3)	nc	13 (30,2)	16 (32,0)	ns	11 (45,8)	12 (48,0)	ns	5 (45,6)	3 (20,0)	ns	19 (33,9)	27 (40,9)	ns			

*p-value significativo (<0.05); DM2+P = Indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P = indivíduos com apenas periodontite; OR= Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; Ref.=Referência; nc= não calculado; ns = não significativo; + = presença; - = ausência; TEF = Teste Exato de Fisher; genótipos variantes: CCR5 - $\Delta 32/\Delta 32$ + $\Delta 32$ /wt; HLA-G - II + ID; CCL5 (rs1800825) - GG + AG; CCL5 (rs2107538) - TT + CT.

Tabela Suplementar 4 - Distribuição dos genótipos variantes de polimorfismos nos genes CCR5, HLA-G, e CCL5 com as variáveis clínicas intraorais entre indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 e Periodontite (DM2+P), com apenas Periodontite (P) e Controles Saudáveis (CS) de uma população do Nordeste brasileiro.

Variáveis Clínicas			Genótipos Variantes	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+P vs CS	P vs CS	DM2+P vs P	DM2+P n (%)	P n (%)	CS n (%)	DM2+P vs CS	P vs CS	DM2+P Vs P
				CCR5 (Δ32)						HLA-G (Indel 14pb)					
Número de Dentes	<20	-	67 (98,5)	53 (98,1)	30 (96,8)		Ref.		1 (1,2)	5 (9,1)	5 (16,1)		Ref.		
		+	1 (1,5)	1 (1,9)	1 (3,2)	ns	ns	ns	81 (98,8)	50 (90,9)	26 (83,9)	15,14 (1,59-742,27); 0,006*	ns	7,99 (0,86-386,9); 0,038*	
	>20	-	25 (100,0)	44 (97,8)	38 (95,0)		Ref.		4 (13,8)	7 (15,6)	7 (17,9)		Ref.		
		+	0 (0,0)	1 (2,2)	2 (5,0)	ns	ns	ns	25 (86,2)	38 (84,4)	32 (82,1)	ns	ns	ns	
Profundidade de Sondagem (mm)	<4	-	89 (98,9)	95 (97,9)	68 (95,8)		Ref.		5 (4,6)	12 (12,2)	12 (17,1)		Ref.		
		+	1 (1,1)	2 (2,1)	3 (4,2)	ns	ns	ns	103 (95,4)	86 (87,8)	58 (82,9)	4,22 (1,31-16,1); 0,008*	ns	ns	
	≥ 4	-	3 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)		Ref.		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		Ref.		
		+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc	3 (100,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	nc	nc	nc	
Índice de Sangramento (%)	<10%	-	61 (100,0)	40 (97,6)	54 (96,4)		Ref.		3 (4,3)	4 (9,3)	10 (18,2)		Ref.		
		+	0 (0,0)	1 (2,4)	2 (3,6)	ns	ns	ns	67 (95,7)	39 (90,7)	45 (81,8)	4,90 (1,18-29,25); 0,017*	ns	ns	
	>10%	-	31 (96,9)	57 (98,3)	14 (93,3)		Ref.		2 (4,9)	8 (14,0)	2 (13,3)		Ref.		
		+	1 (3,1)	1 (1,7)	1 (6,7)	ns	ns	ns	39 (95,1)	49 (86,0)	13 (86,7)	ns	ns	ns	

Placa Visível	+	-	76 (98,7)	83 (97,6)	56 (96,6)		Ref.		5 (5,4)	12 (14,0)	9 (15,8)		Ref.		
		+	1 (1,3)	2 (2,4)	2 (3,4)	ns	ns	ns	88 (94,6)	74 (86,0)	48 (84,2)	3,27 (0,92-13,16); 0,044*	ns	ns	
	-	-	16 (100,0)	14 (100,0)	12 (92,3)		Ref.		0 (0,0)	0 (0,0)	3 (23,1)		Ref.		
		+	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)	ns	ns	nc	18 (100,0)	14 (100,0)	10 (76,9)	ns	ns	ns	
			CCL5 (rs1800825)							CCL5 (rs2107538)					
Número de Dentes	<20	-	23 (29,1)	30 (54,5)	8 (27,6)		Ref.		33 (71,7)	23 (50,0)	19 (76,0)		Ref.		
		+	56 (70,9)	25 (45,5)	21 (72,4)	ns	0,32 (0,1-0,92); 0,022*	2,9 (1,33-6,39); 0,004*	13 (28,3)	23 (50,0)	6 (24,0)	ns	3,11 (0,97-11,34); 0,044*	ns	
	>20	-	11 (39,3)	26 (55,3)	21 (52,5)		Ref.		10 (47,6)	28 (80,0)	19 (63,3)		Ref.		
		+	17 (60,7)	21 (44,7)	19 (47,5)	ns	ns	ns	11 (52,4)	7 (20,0)	11 (36,6)	ns	ns	4,27 (1,15-17,22); 0,018*	
Profundidade de Sondagem (mm)	<4	-	33 (31,7)	56 (56,0)	29 (42,0)		Ref.		42 (64,6)	50 (63,3)	38 (69,1)		Ref.		
		+	71 (68,3)	44 (44,0)	40 (58,0)	ns	ns	2,73 (1,49-5,05); 0,0007*	23 (35,4)	29 (36,7)	17 (30,9)	ns	ns	ns	
	≥ 4	-	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)		Ref.		1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)				
		+	2 (66,7)	2 (100,0)	0 (0,0)	ns	ns	ns	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	nc	nc	ns	
Índice de Sangramento	<10%	-	22 (31,4)	21 (48,8)	24 (43,6)		Ref.		31 (67,4)	25 (73,5)	32 (69,6)		Ref.		
		+	48 (68,6)	22 (51,2)	31 (56,4)	ns	ns	ns	15 (32,6)	9 (26,5)	14 (30,4)	ns	ns	ns	
	>10%	-	12 (32,4)	35 (59,3)	5 (35,7)		Ref.		12 (57,1)	26 (55,3)	6 (66,7)		Ref.		
		+	25 (67,6)	24 (40,7)	9 (64,3)	ns	ns	3,00 (1,19-7,94); 0,012*	9 (42,9)	21 (44,7)	3 (33,3)	ns	ns	ns	
Placa Visível	+	-	25 (28,1)	49 (55,7)	25 (44,6)		Ref.		35 (62,5)	45 (64,3)	30 (68,2)		Ref.		

-	+	64 (71,9)	39 (44,3)	31 (55,4)	2,05 (0,96- 4,41), 0,049*	ns	3,19 (1,65- 6,32); 0,0002*	21 (37,5)	25 (35,7)	14 (31,8)	ns	ns	ns
	-	9 (50,0)	7 (50,0)	4 (30,8)		Ref.		8 (72,7)	6 (54,5)	8 (72,7)		Ref.	
	+	9 (50,0)	7 (50,0)	9 (69,2)	ns	ns	ns	3 (27,3)	5 (45,5)	3 (27,3)	ns	ns	ns

*p-value significativo (<0.05); OR=Odds ratio; IC=Intervalo de confiança; Ref.=Referência; ns=não significativo; nc=não calculado; DM2+P=indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e periodontite; P=indivíduos com apenas periodontite; CS=indivíduos controles saudáveis; +=presença; -=ausência; variantes: *CCR5* - $\Delta 32/\Delta 32+\Delta 32/\text{wt}$; *HLA-G* - II+ID; *CCL5* (rs1800825) – GG+AG; *CCL5* (rs2107538) – TT+CT.

REFERÊNCIAS

1. Duarte P, Bastos M, Fermiano D, Rabelo C, Perez-Chaparro P, Figueiredo L, et al. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *Journal of periodontal research*. 2015;50(1):18-27.
2. Sun HY, Jiang H, Du MQ, Wang X, Feng XP, Hu Y, et al. The prevalence and associated factors of periodontal disease among 35 to 44-year-old Chinese adults in the 4th National Oral Health Survey. *Chin J Dent Res*. 2018;21(4):241-7.
3. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*. 1988;239(4835):55-7.
4. Xiong G, Ji W, Wang F, Zhang F, Xue P, Cheng M, et al. Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- κ B signaling pathway. *BioMed research international*. 2019;2019.
5. Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang YH, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *Journal of periodontal research*. 2009;44(3):418-24.
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. 1999;4(1):1-6.
7. Shih YS, Fu E, Fu MM, Lin FG, Chiu HC, Shen EC, et al. Association of CCL5 and CCR5 gene polymorphisms with periodontitis in Taiwanese. *Journal of periodontology*. 2014;85(11):1596-602.
8. Górka R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(12):1046-52.
9. Artese HPC, Foz AM, de Sousa Rabelo M, Gomes GH, Orlandi M, Suvan J, et al. Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *PloS one*. 2015;10(5):e0128344.
10. Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1993;20(3):161-5.
11. Soslone WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodontology*. 2001;6(1):91-8.
12. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Annals of periodontology*. 2001;6(1):99-112.
13. Atkinson MA, Maclaren NK. What causes diabetes? *Scientific American*. 1990;263(1):62-71.
14. Morgan CL, Currie CJ, Peters JR. Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. *Diabetes care*. 2000;23(8):1103-7.
15. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2013;43(3):504-13.

16. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008;79:1527-34.
17. Cefalu WT, Ratner RE. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: the “gift” that keeps on giving! : *Am Diabetes Assoc*; 2014.
18. Loe H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993;16(1):329-34.
19. Leite AC, Oliveira RR, Novaes AB, O'Connell PA, Grisi MF, Taba M, et al. Effect of early membrane removal on the treatment of mandibular class II furcation defects--a controlled clinical trial with re-entry after 12 months. *Brazilian dental journal*. 2013;24(4):402-9.
20. Miller CS, King Jr CP, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *The Journal of the American Dental Association*. 2006;137(3):322-9.
21. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 1991;26(3):230-42.
22. Garlet G, Sfeir C, Little S. Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs. *Journal of dental research*. 2014;93(9):834-9.
23. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):33-53.
24. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica*. 2001;59(3):167-73.
25. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *The Journal of Immunology*. 1988;141(3):1018-25.
26. Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1996;15(12):1194-9.
27. Cambien B, Richard-Fiardo P, Karimjee BF, Martini V, Ferrua B, Pitard B, et al. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFR β in colorectal carcinoma. *PloS one*. 2011;6(12):e28842.
28. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1535-45.
29. Fokkema S, Loos B, Van Der Velden U. Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003;131(3):477-83.
30. Arimont M, Sun S-L, Leurs R, Smit M, De Esch IJ, de Graaf C. Structural analysis of chemokine receptor–ligand interactions. *Journal of medicinal chemistry*. 2017;60(12):4735-79.

31. Hütter G, Neumann M, Nowak D, Klein S, Klüter H, Hofmann W-K. The effect of the CCR5-delta32 deletion on global gene expression considering immune response and inflammation. *Journal of Inflammation*. 2011;8(1):1-8.
32. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.
33. Kranjc MK, Novak M, Pestell RG, Lah TT. Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme. *Radiology and oncology*. 2019;53(4):397.
34. Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *Jama*. 2006;296(7):815-26.
35. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *Journal of neurochemistry*. 2002;82(6):1311-29.
36. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):344-5.
37. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(37):35755-66.
38. Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(1):35-8.
39. Repeke CE, Ferreira Jr SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1⁺ and CCR5⁺ in RANKL⁺ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. 2010;46(4):1122-30.
40. Cavalla F, Bigueti CC, Dionisio TJ, Azevedo MC, Martins Jr W, Santos CF, et al. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with decreased risk of chronic and aggressive periodontitis: a case-control analysis based in disease resistance and susceptibility phenotypes. *Cytokine*. 2018;103:142-9.
41. Silva REMP. Desvendando o papel do receptor CCR5 em modelo experimental de dengue em camundongos. 2012.
42. Navarro-Sánchez E, Desprès P, Cedillo-Barrón L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35.
43. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62.
44. Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(12):1808-17.
45. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999;257(1):1-6.

46. Galvani AP, Novembre J. The evolutionary history of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation. *Microbes and Infection*. 2005;7(2):302-9.
47. Savarrio L, Donati M, Carr C, Kinane D, Berglundh T. Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associated with chronic adult periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2007;42(2):152-8.
48. Kawashima M, Shoji J, Kamura Y, Sato Y. Role of chemokines in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2005;109(9):596-602.
49. Yang B, Houlberg K, Millward A, Demaine A. Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications. *Cytokine*. 2004;26(3):114-21.
50. Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics*. 2003;55(2):63-79.
51. Rizzo R, Hviid T, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*. 2008;71(6):520-9.
52. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S, editors. *Soluble HLA-G: Are they clinically relevant?* Seminars in cancer biology; 2007: Elsevier.
53. Cordero E, Veit T, Da Silva M, Jacques S, Silla L, Chies J. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*. 2009;74(4):308-13.
54. Carosella ED, Moreau P, LeMaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology*. 2008;29(3):125-32.
55. Carosella ED. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunology letters*. 2011;138(1):22-4.
56. Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JAB. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Human immunology*. 2007;68(8):668-74.
57. Veit T, Chies J. Tolerance versus immune response—microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transplant immunology*. 2009;20(4):229-31.
58. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human immunology*. 2003;64(11):1005-10.
59. Cervera I, Herraiz MA, Peñaloza J, Barbolla ML, Jurado ML, Macedo J, et al. Human leukocyte antigen-G allele polymorphisms have evolved following three different evolutionary lineages based on intron sequences. *Human immunology*. 2010;71(11):1109-15.
60. Hviid T, Hylenius S, Hoegh A, Kruse C, Christiansen O. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue antigens*. 2002;60(2):122-32.

61. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue antigens*. 2008;72(4):335-41.
62. Le Bouteiller P, Mallet V. HLA-G and pregnancy. *Reviews of reproduction*. 1997;2(1):7-13.
63. Periodontitis O. 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.
64. Cimdões R, Siqueira RRACd, Crovella S, Souza PRed, Donos N. A fast method for DEFB1-44C/G SNP genotyping in Brazilian patients with periodontitis. *Acta stomatologica Croatica*. 2014;48(3):208-15.
65. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Wiley Online Library*; 2018.
66. de Aguiar Bello DM, Araújo NC, de Siqueira RAC. Comparação de critérios de diagnóstico clínico de periodontite em diabéticos. *Braz J Periodontol-September*. 2016;26(03).
67. 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. *Archives of oral biology*. 2015;60(7):1054-8.
68. Consortium GP. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68.
69. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science*. 1996;273(5283):1856-62.
70. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 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); Secretária de Pós-graduação em Odontologia da UFPE – Avenida Professor Moraes Rego, 1235 – Recife – PE, CEP: 50670-901; telefone: (81)21268817; e-mail: renata.cimoes@globo.com Telefone para contato: 21268817. Também participam dessa pesquisa: Rayanne Soraia Aguiar de Melo Dias (mestranda em odontologia UFPE-999495129), Felipe Rodrigues de Almeida (mestrando em odontologia UFPE - 999728554), Roberto Carlos Mourão Pinho (doutorando em odontologia UFPE - 988098147) e Professor Francisco Bandeira (Chefe do setor de Endocrinologia do Hospital Agamenon Magalhães- 31841601).

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

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

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

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

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

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

pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

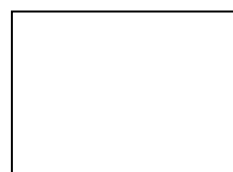
Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(Pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

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

Local e data _____



Assinatura do participante: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA

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

FICHA CLÍNICA

Nº do paciente: _____ Prontuário: _____

1. Nome: _____

2. Nacionalidade: _____

3. Sexo: _____

4. Idade: _____

5. Estado civil: _____

6. Fone: _____ cel: _____

7. Renda (salários): _____

8. Hábito de fumar:

() nunca fumou

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

() fumante: _____ (quantos por dia)

9. Escolaridade:

I. () Não sabe ler ou escrever

II. () 1º grau incompleto

III. () 1º grau completo

IV. () 2º grau incompleto

V. () 2º grau completo

VI. () Universidade incompleta

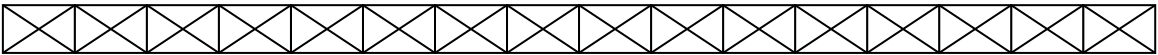
VII. () Universidade completa

VIII. () Pós-graduação

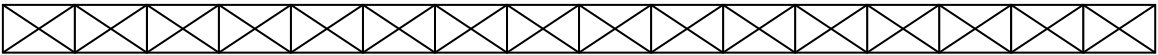
IX. () Não sei

36																	
35																	
34																	
33																	
32																	
31																	
41																	
42																	
43																	
44																	
45																	
46																	
47																	
48																	

SANGRAMENTO: Faces _____ % _____



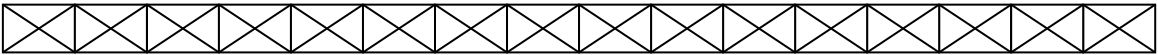
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38



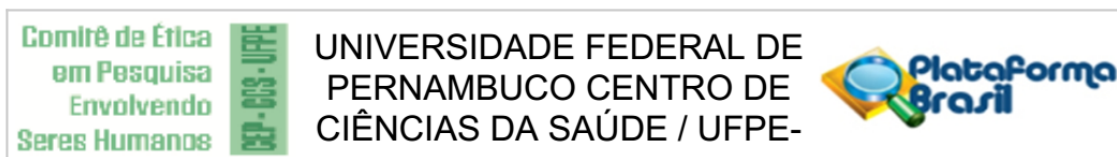
PLACA: Faces _____ % _____



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



ANEXO A – PARECERES DOS COMITÊS 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

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



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



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

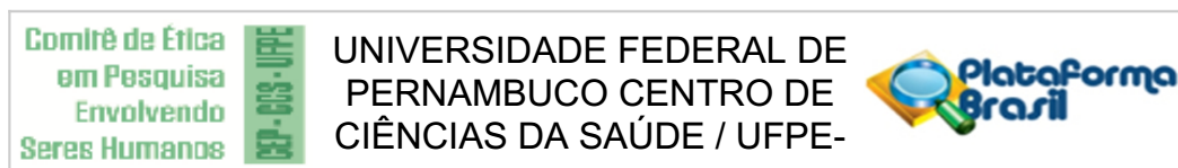
CEP: 50.740-600

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 Nº466/12 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 Nº 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

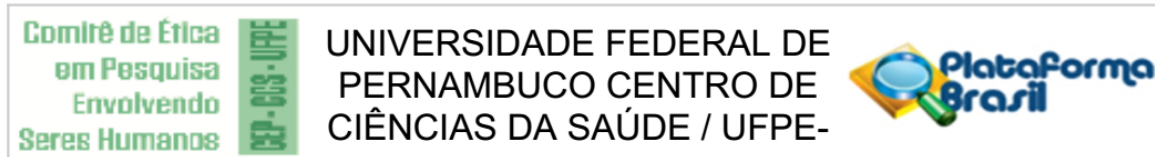
CEP: 50.740-600

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_APPENDICE_B.docx	22/08/2015 14:48:05	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	22/08/2015 14:45:02	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade.pdf	22/08/2015 14:43:25	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_POS_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:43:01	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HAM.pdf	22/08/2015 14:42:33	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_DPTO_de_clinica_e_preventiva_ODONTO_UFPE.pdf	22/08/2015 14:42:08	Renata Cimões Jovino Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 15 de Dezembro de 2015

Assinado por:
CARLOS ALBERTO SÁ MARQUES
(Coordenador)

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência Geral

CEP: 52.051-380

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1769

Fax: (81)3048-0117

E-mail: cepham@hotmail.com.br

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO

Author Guidelines

Journal of Periodontology

Author Instructions

Encontra-se disponível no link abaixo:

<https://aap.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/19433670/homepage/forauthors.html>

ANEXO C – NORMAS DA PÓS-GRADUAÇÃO

Encontra-se disponível no site da Pós-Graduação de Odontologia da UFPE ou no link abaixo:

<https://drive.google.com/open?id=1AQT0Ili3KIM8orF4OtojnY6KB1eFUzQD>

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