



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico.

Araraquara

2020

Rimachi Hidalgo, Marco Antonio

Investigação da associação de polimorfismos no gene Interleucina 17 Alfa com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente / Marco Antonio Rimachi Hidalgo.-- Araraquara: [s.n.], 2020

65 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Coorientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

1. Polimorfismo genético 2. Diabetes mellitus
3. Periodontite 4. Interleucina-17 I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Marco Antonio Rimachi Hidalgo

Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

2º Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

3º Examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

Araraquara, 10 de abril de 2020.

Dados Curriculares

Marco Antonio Rimachi Hidalgo

NASCIMENTO: 05 de maio de 1992 – Iquitos – Perú

FILIAÇÃO: Pedro Segundo Rimachi Inga
Rosario Hidalgo Gomes

2011/2016 Curso de Graduação em Odontologia- Faculdade de Odontologia (FOUNAP)-
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP)

2018/2020 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em
Periodontia- Nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) –
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Agradeço especialmente...

A **Deus**, que sem ele nada poderia ter feito, já que sempre está presente em todos os momentos difíceis da minha vida, ele me dá saúde e graças a ele tenho uma maravilhosa família que amo muito.

Aos meus pais **Pedro e Rosario**, graças a eles, estou onde estou, pelo esforço e dedicação que eles dedicam para poder realizar meus estudos fora do meu país.

À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Scarel Caminaga**, por ter me aceito e acolhido em um momento tão importante da minha vida profissional. Muito obrigado por acreditar em mim sendo estrangeiro e não me conhecer muito, eu estou agradecido e valorizo muito essa ação e sobre tudo por toda paciência com que me orientou durante os dois anos. Mais do que isso, agradeço por criar uma verdadeira família dentro do laboratório de genética, um ambiente de trabalho movido a paz, companheirismo e amizade.

Às minhas amigas e amigos de laboratório **Thamiris Cirelli, Karen Rivera, Ingra G. Nicchio, Diego Bussanelli**, pessoal que definem nosso laboratório como amizade, companheirismo e honestidade. Agradeço a Deus por me colocar com o grupo maravilhoso de bons profissionais e pessoas.

À minha fiel companheira de toda a vida, minha parceira e quem faz meus dias muitos felizes, **Bonny Salva**, foi você que nos momentos difíceis, ficou ao meu lado, me entrego força, me ajudo, não tenho palavras para agradecer todas as coisas que você faz e deixa de fazer por mim, este trabalho é também seu. Tenho certeza da sua importância na minha vida.

Agradecimentos.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-UNESP, na pessoa de sua Diretora-Profª. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e de seu Vice-Diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** pela excelente formação dos alunos, dedicação, competência e empenho em suas atividades.

À **FAPESP**- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2014/13295-1, 2016/03753-8, 2016/08070-6, 2016/18313-3, 2018/26367-1).

À **CAPES**: O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Ao (**CNPq**)- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro à pesquisa.

A todos os **funcionários do Departamento de Morfologia**, especialmente Margarete e Marcelo, pela atenção e disponibilidade que sempre me atenderam.

Aos **funcionários da Biblioteca**, pela disposição de sempre.

Aos **Pacientes**, que colaboraram com a pesquisa, contribuindo com a realização dos exames clínicos e coletas. Muito obrigado

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

“Nossa recompensa é encontrada no esforço e não no resultado ... Um esforço total é uma vitória completa”

Mahatma Gandhi

Rimachi Hidalgo MA. Investigação da associação de polimorfismos no gene *Interleucina 17 Alfa* com o estado periodontal e perfil bioquímico do paciente [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Em todo o mundo continua-se a buscar evidências de suscetibilidade genética à periodontite (P) em diferentes populações, pois é importante levar em consideração as diferenças genéticas entre as diversas etnias. Além disso, também há grande interesse da comunidade científica em avaliar potenciais inter-relações entre a periodontite e alterações sistêmicas como o Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM, *type 2 Diabetes Mellitus*). Estudos enfocando polimorfismos genéticos são importantes principalmente para o entendimento que desempenham na modulação da resposta do hospedeiro frente à ação de micro-organismos periodontopatogênicos. O gene *Interleucina 17 Alfa* (*IL17A*), que codifica a citocina pró-inflamatória comumente referida como IL-17, é produzida por um subconjunto de células T auxiliaadoras (T helper) Th1/Th0 e secretada pelas células Th17, implicadas na vigilância imunológica nas superfícies mucosas e implicada na inflamação crônica. O objetivo deste estudo é investigar três polimorfismos no gene *IL17A* para avaliar se podem estar associados com a suscetibilidade genética à periodontite na presença (ou não) de T2DM, e relacioná-los com o perfil bioquímico e clínico periodontal do paciente. Considerando o cálculo amostral, foram investigados pacientes com T2DM e periodontite severa ou moderada (Grupo T2DM_P, n=199 pacientes); e para comparação dos resultados foram considerados pacientes sem T2DM com periodontite severa ou moderada (Grupo PERIODONTITIS, n=342), e também pacientes sem T2DM e sem periodontite ou periodontite leve, ou seja, pacientes saudáveis (Grupo HEALTHY, n=338), totalizando 879 indivíduos. Após exame periodontal completo foi obtido o bochecho de cada paciente para extração do DNA por Acetato de Amônio. Foram investigados três polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNP) no gene *IL17A* por meio do sistema de genotipagem TaqMan utilizando PCR em tempo real. Uma parte dos pacientes realizaram exames bioquímicos do perfil glicêmico e lipídico. Após análise das frequências de alelos e genótipos por meio do software PLINK, foi avaliado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg de cada SNP. Os grupos foram comparados entre si, em relação às frequências alélicas e genótípicas realizando análises de regressão logística múltipla utilizando o programa STATA, e ajustando-se às variáveis idade, gênero, tabagismo e perfil bioquímico. Como resultado da comparação entre o grupo HEALTHY *versus* T2DM_P, a regressão logística múltipla estratificada para o hábito de fumar, demonstrou que pacientes fumantes com genótipo GG para o SNP rs3819024 do gene *IL17A* tinham maior chance de apresentar periodontite associado a T2DM (OR=6.60; IC 95%=1.31-33.01; p=0.02). Resultado semelhante foi obtido para pacientes fumantes na comparação PERIODONTITIS *versus* T2DM_P, indicando associação do genótipo GG com T2DM (OR=5.05; IC 95%=1.36-18.82; p=0.01). Por meio do software PLINK foi verificado o desequilíbrio de ligação entre cada SNP, constatando-se que os mesmos apresentavam-se como haplótipos. A distribuição dos haplótipos foi comparada entre os grupos por regressão logística múltipla demonstrando que indivíduos portadores do conjunto de haplótipos mais raros (<3%) eram mais suscetíveis a Periodontite juntamente com T2DM (OR=2.30; IC 95%=1.16-4.55, p=0.01), assim como ao T2DM isoladamente (OR=2.98; IC 95%=1.62-5.48, p=0.00). Conclui-se pelos resultados obtidos com pacientes fumantes e ex-fumantes que o SNP rs3819024 do gene *IL17A* demonstra associação com o diabetes mellitus tipo 2 isoladamente, e também como comorbidade da periodontite, no entanto o amplo intervalo de confiança observado indica que tal resultado necessita ser comprovado em uma população maior. A associação dos haplótipos raros com as patologias estudadas pode ser um resultado biologicamente espúrio, pois foi obtido

pela soma dos diferentes haplótipos raros, de modo que se um deles for considerado sozinho, a associação certamente será perdida, esclarecendo que o número de pacientes em cada grupo que carregam os haplótipos raros é menor do que o número calculado para obter o poder do estudo o que é normal.

Palavras-Chave: Polimorfismos genéticos. Diabetes Mellitus. Periodontite. Interleucina 17.

Rimachi Hidalgo MA. Polymorphisms in the *Interleukin 17 Alfa* and haplotypes investigation regarding periodontitis and type 2 diabetes mellitus [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Worldwide, evidence continues to be sought genetic susceptibility to periodontitis (P), because as genetic differences between different ethnicities tend to influence such susceptibility. Also, there is considerable interest from the scientific community to evaluate potential interrelationships between periodontitis and systemic pathologies such as Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus). Studies focusing on genetic polymorphisms are essential mainly for the understanding they play in modulating the host's response to the action of periodontopathogenic microorganisms. The Interleukin 17 Alpha (IL17A) gene, which encodes the proinflammatory cytokine commonly referred to as IL-17, is produced by a subset of Th1 / Th0 helper T cells (T helper) and secreted by Th17 cells, involved in immune surveillance in mucous surfaces and involved in chronic inflammation. The aim of this study is to investigate three polymorphisms in the IL17A gene to assess whether they may be associated with genetic susceptibility to periodontitis in the presence (or not) of T2DM and to relate them to the patient's biochemical and clinical periodontal profile. Considering the sample size, patients with T2DM and severe or moderate periodontitis were investigated (Group T2DM_P, n = 199 patients); and for comparison of results, patients without T2DM with severe or moderate periodontitis (Group PERIODONTITIS, n = 342) were considered, and also patients without T2DM and periodontitis or slight periodontitis, that is, healthy patients (HEALTHY Group, n = 338), totaling 879 individuals. After a complete periodontal examination, each patient's mouthwash was obtained for DNA extraction using Ammonium Acetate. Three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the IL17A gene were investigated using the TaqMan genotyping system using real-time PCR. A portion of the patients underwent biochemical examinations of the glycemic and lipid profile. After analyzing the frequencies of alleles and genotypes using the PLINK software, the Hardy-Weinberg Balance of each SNP was evaluated. The groups were compared among themselves, about allele and genotypic frequencies, performing multiple logistic regression analyses using the STATA program, adjusting to variables such as age, gender, smoking, and biochemical profile. As a result of the comparison between the HEALTHY group versus T2DM_P, multiple logistic regression, stratified for smoking, demonstrated that smoking patients with GG genotype for SNP rs3819024 of the IL17A gene were more likely to have periodontitis associated with T2DM (OR=6.60; IC 95%=1.31-33.01; p=0.02). A similar result was obtained for smoking patients in the PERIODONTITIS versus T2DM_P comparison, indicating an association between the GG genotype and T2DM (OR=5.05; IC 95%=1.36-18.82; p=0.01). Using the Plink software, the linkage disequilibrium between each SNP was verified, verifying that they were presented as haplotypes. The distribution of haplotypes was compared between groups by multiple logistic regression demonstrating that individuals with the rarest set of haplotypes (<3%) were more susceptible to Periodontitis together with T2DM (OR=2.30; IC95%=1.16-4.55, p=0.01), as well as T2DM alone (OR=2.98; IC95%=1.62-5.48, p=0.00). In conclusion from the results obtained with smokers and ex-smokers that the SNP rs3819024 of the IL17A gene shows an association with type 2 diabetes mellitus alone, and also as a comorbidity of periodontitis, however, the wide confidence interval observed indicates that such a result needs to be proven in a larger population. The association of the rare haplotypes with the studied pathologies can be a biologically spurious result since it was obtained by the sum of the different rare haplotypes so that if one of them is considered alone, the association will certainly be lost, clarifying that the

number of patients in each group who carry the rare haplotypes is less than the amount calculated to obtain the power of the study, which is normal.

Keywords: Genetic Polymorphisms. Diabetes Mellitus. Periodontitis. Interleukin 17.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doença Periodontal.....	12
1.2 Diabetes Mellitus (DM), Enfocado Principalmente o Tipo 2 (T2DM)	13
1.3 Resposta Imune do Tipo Th 17.....	15
1.4 Polimorfismos Genéticos.....	17
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 PUBLICAÇÃO	21
3.1 Artigo 1.....	21
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A	54
ANEXO A.....	64

1 INTRODUÇÃO

Nesta sessão, apresentamos conceitos básicos e fundamentais, que contribuem como um primeiro passo para uma melhor compreensão da pesquisa.

1.1 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é considerada uma doença complexa influenciada por fatores que podem afetar o risco de início da doença (fatores de risco) ou a progressão da doença existente (fatores de prognóstico)^{1,2}. A DP é considerada uma das doenças orais de origem infecciosa mais comuns que estão associadas à instalação do biofilme patogênico nas superfícies dos dentes e que pode desencadear uma resposta imune/inflamatória do hospedeiro^{3,4}. Assim, a microbiota periodontal complexa exerce um papel relevante na saúde periodontal ou na ocorrência de doenças periodontais³. Isto é, em um estado saudável encontra-se uma relação homeostática entre o corpo humano e a microbiota, mas num estado patológico pode acontecer uma modificação na abundância relativa de determinadas bactérias em comparação com a abundância na saúde⁵, resultando em uma disbiose da microbiota, e portanto o aparecimento da DP⁶. Está bem estabelecido na literatura que o fator etiológico primário da DP é a infecção do periodonto por microrganismos periodontopatogênicos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*^{7,8}.

A DP é iniciada com a gengivite, que é considerada uma condição reversível e não destrutiva⁹, cuja expressão clínica principal é inflamação do tecido gengival, desencadeada pela disbiose do biofilme microbiano, como já mencionado^{10,11}. A progressão da doença ocasiona danos ao periodonto de proteção (gengiva) e ao periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal, e osso alveolar), evoluindo para a perda de inserção periodontal, presença de bolsas periodontais, caracterizando a periodontite^{11,12}. Epidemiologicamente a gengivite é a apresentação mais habitual da DP. Desde um enfoque do prognóstico, na inexistência de tratamento, a gengivite pode evoluir para periodontite, apesar de isso não ocorrer sempre^{4,13,14}.

Apesar de essenciais para a ocorrência da DP, as bactérias do biofilme envolvidas no desequilíbrio são insuficientes para sozinhas desencadear a doença. Atualmente é bem estabelecido que o dano tecidual gerado na DP é atribuído principalmente pela resposta do hospedeiro, e não pela ação bacteriana direta e de seus produtos^{15,16}. A função primordial da cascata inflamatória é proteger o organismo contra antígenos; porém, quando a resposta imune não é suficiente para eliminar os microrganismos invasores, a persistência de mediadores

inflamatórios contribui para gerar injúrias no tecido; que no caso da DP, aplica-se à destruição do ligamento periodontal e reabsorção de osso alveolar, podendo culminar na perda do elemento dentário¹⁷.

Diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como fatores ambientais dentre eles o tabagismo, a presença de doenças sistêmicas e a carga genética têm sido estudados para compreender como participam para o início e progressão da DP¹⁸. A herança genética consegue explicar, em parte, porque a DP manifesta-se de diferentes formas clínicas na população¹⁹. Em um clássico estudo com gêmeos monozigóticos e dizigóticos foi estimado que há aproximadamente 50% de hereditariedade para o acometimento da periodontite crônica, mesmo após ajustes para variáveis comportamentais^{20,21}.

Assim como a DP, o Diabetes Mellitus tem sido conceituada como uma doença complexa (ou multifatorial), onde os fatores genéticos e ambientais executam um papel essencial na patogênese²⁰. Uma característica relevante das doenças complexas é o fato de serem poligênicas, ou seja, incontáveis genes encontram-se envolvidos na suscetibilidade da doença, cada qual assegurando uma pequena contribuição.

O tabagismo é reconhecido como um importante fator de risco relacionado ao estilo de vida para as DP²². A maioria das evidências científicas que relatam a associação entre o tabagismo e DP, são originados de estudos transversais²³, demonstrando mecanismos potenciais relevantes como o efeito do fumo que pode levar a uma mudança na composição do biofilme subgingival associado a um aumento na prevalência de patógenos periodontais²⁴. Além disso, o tabagismo tem sido implicado no atraso do recrutamento e migração de neutrófilos para os tecidos periodontais, comprometendo a resposta imune aguda²⁵. Esse fato aumentaria o limiar de agressão necessário ao tecido periodontal para iniciar a cascata inflamatória.²³

Como revisto por Leite et al.²³ (2018), o tabagismo tem um efeito prejudicial na incidência e progressão da DP, sendo a nicotina que é o principal ingrediente da fumaça do cigarro, um causador de aumentar a perda óssea alveolar e inibe a diferenciação de células do ligamento periodontal^{22,26}.

1.2 Diabetes Mellitus (DM), Enfocando Principalmente o Tipo 2 (T2DM)

O aumento da expectativa de vida, associada à uma modificação no estilo e/ou qualidade de vida, favoreceu a incidência de doenças degenerativas crônicas, destacando-se o DM que está aumentando a um ritmo alarmante, transformando-se em um problema mundial que carece de significativa assistência médica²⁷. A Federação Internacional de Diabetes calculou para 2013 que mais de 387 milhões de pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com DM, e até 2035

essa quantidade aumentará para 592 milhões de pessoas, o que significa que 1:10 pessoas será afetada)²⁸.

O DM é um grupo de distúrbios clinicamente e geneticamente heterogêneos que afetam o metabolismo dos carboidratos em primeiro lugar, seguido dos lipídeos e, posteriormente, das proteínas²⁹⁻³¹. A característica mais comum do DM é uma elevação anormal dos níveis de glicose no sangue³², ou seja, a hiperglicemia, que é ocasionada por um déficit da secreção de insulina causada pela disfunção das células beta do pâncreas e/ou resistência à insulina no fígado e nos músculos³³. Como consequência direta da hiperglicemia e da instabilidade osmótica, uma tríade clínica clássica de sintomas é desenvolvida, e inclui polifagia, polidipsia e poliúria³⁰.

O surgimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais³⁴. Os tipos mais comuns de DM é o tipo 1 (T1DM), quando o organismo que não consegue produzir a quantidade necessária de insulina porque as células beta do pâncreas são eliminadas por autoimunidade, e o tipo 2 (T2DM), que começa com uma resistência à insulina pois as células não respondem devidamente à insulina, e também à medida que a doença avança pode se desenvolver uma menor produção de insulina, mas sem reação autoimune^{30,35}. A principal causa do T2DM é o excesso de peso corporal e a falta de atividade física³⁵.

A relação entre a DM e DP aparece na literatura há mais de 70 anos³⁵⁻³⁷, sendo reportado numerosos estudos onde a população com diabetes tende a ter maior prevalência de DP mais severa que aquelas que não apresentam a doença, sendo o controle glicêmico um determinante fundamental nesta relação³⁸⁻⁴³. A periodontite pode ser reconhecida como a sexta maior complicação associada ao diabetes⁴⁴. Tem sido reconhecida uma relação bidirecional entre DM e DP⁴⁵, quer dizer que a DM não só é um fator de risco para a DP, quanto a DP pode ter um impacto negativo no controle glicêmico⁴⁶. Tal inter-relação é dada pela existência de citocinas pró-inflamatórias, bactérias e toxinas na DP que são liberadas localmente no tecido periodontal e entram na circulação sistêmica, influenciando tecidos e órgãos à distância. Ao mesmo tempo, as citocinas pró-inflamatórias sistemicamente implicadas no DM infiltram-se nos tecidos periodontais e pioram a condição periodontal^{36,47}. Deste modo, considera-se que a associação entre a DP e o DM pode ser consequência de dois mecanismos: 1) uma associação causal direta, em que as complicações da DM intervêm como modificadores da expressão da DP; 2) ou que as citocinas inflamatórias existentes na DP possam ocasionar a modificações no metabolismo da glicose e de lipídios⁴⁸.

Como revisto por Struch et al.⁴⁹ (2008), tendo em vista o primeiro mecanismo, encontram-se indícios de que a prevalência e a severidade da DP são mais altos em pessoas com diabetes em comparação aos que não apresentam diabetes^{36,39,47-50}. Foi verificado que indivíduos que apresentem um controle glicêmico adequado tem menor chance de destruição periodontal⁵¹.

O segundo mecanismo para associação entre a DP e o DM, quer dizer, que a DP pode ter influência sobre a condição sistêmica, foi demonstrado que a DP em conjunto com a endotoxemia e a bacteremia são capazes de aumentar os níveis séricos de citocinas como TNF- α , PGE2, IL-1 e IL-6. Lembrando que o tecido conjuntivo periodontal inflamado comporta-se como um receptor para esses mediadores, isso poderia fomentar em alterações no metabolismo dos lipídios e da glicose, contribuindo para a resistência insulínica⁵².

1.3 Resposta Imune do Tipo Th17

As citocinas são proteínas solúveis secretadas por células para atuar como mensageiro que transmite sinais para outras células⁵³. Elas são capazes de medir e controlar respostas autoimunes e inflamatórias e também podem regular o crescimento e a diferenciação celular. Um grupo amplo de células do organismo humano são capazes de produzir citocinas, como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais⁵⁴. Foi demonstrado que uma produção adequada de citocinas resulta em uma imunidade protetora, enquanto a produção inadequada de citocinas causa destruição dos tecidos e progressão de doenças⁵⁵. As células, ou linfócitos T com base em sua função são classificadas como células T auxiliares (do inglês, *helper*) (Th), células T-citotóxicas (TC) e células T-reguladoras (Treg)⁵⁶. O equilíbrio entre a resposta imune celular e humoral, por exemplo, é altamente regulada pelo equilíbrio entre subconjuntos de células Th1 e Th2⁵⁶. Em geral, aceita-se que o controle do equilíbrio Th1/Th2 é fundamental para a regulação da resposta imune presente na DP. Foi demonstrado que as lesões periodontais de natureza estável são mediadas por células Th1, e uma alteração nas células Th2 reflete a progressão da doença⁵⁷. Foi proposto que as lesões periodontais estáveis se assemelham a uma lesão de hipersensibilidade do tipo retardada mediadas pelas células Th1, mas a progressão da doença envolve um amplo número de células B influenciada pela resposta Th2⁵⁶. Em uma lesão estável, o IFN (interferon) aumenta a atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos para combater a infecção; mas no caso de uma resposta imune inata fraca adicionado a uma produção escassa de IL-12, uma resposta Th1 fraca pode não conter a infecção⁵⁶. Uma resposta inata forte, leva a uma resposta Th1 sob a influência das IL-12, IL-2 e IFN, mas se ocorrer uma resposta inata fraca, é ocasionada uma resposta Th2

sob influência da citocina IL-4⁵². A estimulação de mastócitos e a subsequente produção de IL-4 ajudam a induzir uma resposta de Th2, produção de anticorpos e também a ativação de células B⁵⁶.

A interleucina 17A, mais comumente referida como IL-17, foi o primeiro membro descrito da família IL-17⁵⁸, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células Th1/Th0, mas não por células Th2⁵⁶. IL-17 também é secretada por um subconjunto de células T CD4 diferenciadas, conhecidas como células T auxiliar (Th17)⁵⁹, entre outras fontes celulares que incluem células matadoras naturais (NK)⁶⁰.

A IL-17 tem várias funções que implicam tanto na proteção imunológica quanto na imunopatologia⁶¹, quer dizer, que a IL-17 desempenha um papel importante na vigilância imunológica nas superfícies mucosas e de barreira^{62,63}, mas também é implicada em cenários imunopatológicos de autoimunidade e inflamação crônica⁶⁴. A família IL-17 é formada por seis membros desde o IL-17A até IL-17F que compartilham homologia de sequência^{60,65-67}, com destaque para IL-17A e IL-17F, que além de exibir alta similaridade de sequência também podem formar homodímeros e heterodímeros para sinalização da resposta imune⁶². As células Th17 apresentam a capacidade de recrutar macrófagos e também neutrófilos para participar e potencializar a reação imune inflamatória, assim o dano tecidual parece ser intensificado pela proliferação e disfunção dessas células⁶⁸.

O fator transformador do crescimento (TGF)⁵⁶ e a IL-6 apresentam o potencial de induzir a diferenciação das células Th17. A IL-21 amplifica a frequência das células Th17 e a IL-23 ajuda a estabilizar o fenótipo das células Th17 previamente diferenciadas⁵⁶. A perda de qualquer membro dessa via (IL-6, IL-21 e IL-23), limita severamente a capacidade de resposta das células Th17⁵⁴. Foi demonstrado que a IL-17 estimula as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, para produzir IL-6, IL-8 e prostaglandinas E2 (PGE2)⁵⁶. A PGE2 melhora a permeabilidade e dilatação dos vasos sanguíneos, produzindo vermelhidão e edema, além da capacidade de induzir a síntese de metaloproteínas da matriz (MMP), infiltrando monócitos⁵⁶. As MMPs contribuem para a degradação do tecido conjuntivo e destruição óssea osteoclástica, ambas características clássicas da DP⁵⁶. A IL-17 também é capaz de induzir o *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL) que é o principal fator estimulador da diferenciação e ativação dos osteoblastos⁶⁹. Por essas características fundamenta-se a hipótese da influência da IL-17 em lesões periodontais, a qual pode estar envolvida na modulação Th⁵⁶. A expressão de IL17 é mais elevada na periodontite que na gengivite, e é quase indetectável nos tecidos periodontais saudáveis⁷⁰⁻⁷². Muitos estudos demonstraram altos níveis de IL-17 na periodontite crônica e indicam uma correlação do aumento da expressão da IL-17 com a

severidade da doença e os parâmetros clínicos de destruição periodontal⁷³⁻⁷⁶. Além disso, foi demonstrado que existem células Th17 nas lesões periodontais⁷⁷ sendo a principal fonte de IL-17 na periodontite⁷⁸ no fluido gengival e saliva^{74,79}.

1.4 Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos são formas variantes (alelos) de um locus específico do cromossomo, que coexistem naturalmente na população humana. São, portanto, variações normais do genoma humano, no qual o alelo mais raro ocorre com uma frequência maior que 1% na população. Os polimorfismos surgem como resultado de mutações, como inserções, deleções ou substituições de bases nucleotídicas, podendo gerar uma proteína não funcional ou alterar a expressão da referida proteína. O tipo de polimorfismo mais comumente relatado na literatura é o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphism - SNP*), que consiste em uma variação da identidade de um nucleotídeo singular num sítio particular do genoma⁸⁰.

Os haplótipos são combinações de alelos marcadores que estão localizadas juntas no mesmo cromossomo e que tendem a ser herdadas juntas⁸¹, compreendem SNPs ou outros marcadores as variantes no mesmo cromossomo que são herdados juntamente com poucas chances de recombinação contemporânea, o seja, recombinação durante a geração mais recente da meioses⁸².

Com a disponibilidade de marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único de alta densidade (SNP), os haplótipos desempenham um papel importante nos estudos de associação. Primeiro, os haplótipos são críticos para a compreensão do padrão de desequilíbrio de ligação (DL) no genoma humano, essencial para estudos de associação^{83,84}. Os haplótipos nos dizem diretamente como os alelos são organizados ao longo do cromossomo e refletem o padrão de herança sobre a evolução⁸⁵ forneceram um exemplo convincente para mostrar que a análise de DL baseada em haplótipos subjacentes pode ser muito mais clara. Segundo métodos baseados em haplótipos podem ser mais poderosos do que aqueles baseados em marcadores únicos em estudos de associação de mapeamento de genes complexos de doenças⁸¹.

As frequências dos genótipos e alelos podem variar entre grupos de pacientes doentes e saudáveis. Estudos relatam que variações alélicas, como os polimorfismos em genes que codificam citocinas, podem afetar a suscetibilidade e a progressão da DP^{17,86-89}. O primeiro estudo demonstrando a associação entre periodontite e um polimorfismo genético, no caso no gene *IL1*, foi de Kornman e colaboradores⁹⁰ em 1997. A partir de então, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de associar diversos polimorfismos em vários genes com a

periodontite. Existem mais de 14 milhões de SNPs distribuídos no genoma que têm sido investigados em associação a doenças, mas apenas uma pequena parcela destes foi estudado em relação à P⁹¹. Os primeiros estudos investigando a suscetibilidade genética à periodontite crônica na população Brasileira são de 2002, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aliada à de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), ou seja, a PCR-RFLP⁹². A partir de então, várias outras pesquisas têm sido realizadas na população Brasileira a fim de identificar marcadores genéticos que possam estar associados com a suscetibilidade ou predisposição à P^{37,93-95}. Nota-se até os dias atuais uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade à P, principalmente focando-se em genes relacionados ao sistema imunoinflamatório.

No caso da possível relação com o T2DM, é necessário incluir a avaliação rigorosa do controle glicêmico (e também lipídico) à avaliação periodontal. Para que um polimorfismo possa ser efetivamente considerado um marcador genético, é necessário realizarem-se estudos com populações maiores (com milhares de pessoas) e de diferentes etnias utilizando critérios clínicos padronizados. Somente isso poderá permitir comparações de resultados e efetivamente esclarecer se um determinado polimorfismo teria poder preditivo para uma doença em uma determinada população³⁷. Subsequentemente, quando um determinado alelo está associado com a doença, estudos enfocando a genética funcional podem ser realizados para investigar a possível influência do referido polimorfismo na expressão do gene e seu papel na etiologia e patogênese da doença^{96,97}. Afinal, um polimorfismo pode influenciar no nível de secreção de uma determinada proteína, provocando variações nas respostas imunológica e inflamatória individuais frente a uma agressão bacteriana⁹⁸.

Apesar de existirem vários estudos caso-controle e meta-análises enfocando a associação de polimorfismos genéticos com a periodontite, mais estudos ainda se fazem necessários, pois: as frequências dos alelos polimórficos variam entre as diferentes etnias, variando também os resultados de suscetibilidade a doenças^{99,100}. Portanto, um determinado polimorfismo que tenha sido previamente associado à uma doença precisa ser validada na nossa população.

Pelo papel que desempenham na modulação da resposta do hospedeiro frente à ação de microrganismos periodontopatogênicos, alguns genes como o gene *IL17*, que codifica a interleucina-17 Alfa (IL-17A), foram pouco pesquisados até o momento com relação à patogênese da DP¹⁰¹. Um polimorfismo específico no gene *IL17A* (rs2275913), está associado ao risco significativamente elevado de desenvolvimento e severidade de doenças inflamatórias¹⁰²⁻¹⁰⁴. Esse mesmo polimorfismo rs2275913 foi investigado em uma população

brasileira do Nordeste, e associou o alelo A com maior suscetibilidade à periodontite¹⁰⁵. No entanto, mais estudos são necessários tanto na população brasileira, quanto em outras etnicamente diferentes, e em maior número, investigando inclusive outros polimorfismos no gene *IL17A*, para compreender melhor sua possível influência no desenvolvimento da periodontite.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é investigar três polimorfismos no gene *Interleucina 17 alfa* (*IL17A*) para avaliar se os mesmos podem estar associados com a suscetibilidade genética à periodontite na presença ou não de T2DM, e relacionando-os com o perfil bioquímico e clínico periodontal do paciente.

3 PUBLICAÇÃO

Nesta seção apresentamos o artigo científico em língua inglesa referente à pesquisa desenvolvida nesta dissertação e que será submetido à publicação.

3.1 Artigo 1*

Polymorphisms in the *Interleukin 17 Alfa* and haplotypes investigation regarding periodontitis and type 2 diabetes mellitus: potential effect of smoking habits

Marco A. Rimachi Hidalgo^{*1,2}, Thamiris Cirelli^{*1,2}, Bárbara Roque da Silva^{1,2}, Ingra Gagno Nicchio^{1,2}, Rafael Nepomuceno^{1,2}, Silvana R P Orrico^{1,3}, Joni A Cirelli¹, Letícia Helena Theodoro⁴, Silvana P. Barros⁵, Raquel M Scarel-Caminaga²

1. Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University – UNESP, School of Dentistry at Araraquara, Araraquara, SP, Brazil
2. Department of Morphology and Pediatric Clinics, São Paulo State University – UNESP, School of Dentistry at Araraquara, Araraquara, SP, Brazil
3. Advanced Research Center in Medicine, Union of the Colleges of the Great Lakes (UNILAGO), São José do Rio Preto, SP, 15030-070, Brazil
4. Department of Surgery and Integrated Clinic, São Paulo State University – UNESP, School of Dentistry at Araçatuba, Araçatuba, SP, Brazil
5. Department of Periodontology, University of North Carolina at Chapel Hill – UNC, School of Dentistry, Chapel Hill, NC, USA

***These authors share the first authorship**

Correspondence:

Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga, PhD

Department of Morphology and Pediatric Clinic, School of Dentistry at Araraquara, UNESP – São Paulo State University, CP 331, CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brazil, E-mail: raquel.caminaga@unesp.br

Conflict of interest and source of funding

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article. This study was supported by the Foundation for Research Support of State of São Paulo – FAPESP, Grants 2014/13295-1, 2016/03753-8, 2016/18313-3, 2018/26367-1; and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Grants 445336/2014-5 and 304570/2017-6.

ABSTRACT

Background: Worldwide, evidences continue to be sought for genetic susceptibility to periodontitis (P), because genetic background vary among different ethnicities and tend to influence such susceptibility. Also important is to evaluate potential interrelationships between periodontitis and systemic pathologies such as Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). The aim of this study is to investigate the genetic susceptibility to periodontitis alone, or concomitant with T2DM, analyzing three polymorphisms in the Interleukin 17 alpha (*IL17A*) gene considering the biochemical profile and smoking habits on the clinical periodontal status of the patients.

Material and Methods: We investigated 879 individuals divided into groups: T2DM patients also affected by severe or moderate periodontitis (T2DM_P, n = 199 patients); patients with severe or moderate periodontitis (PERIODONTITIS, n = 342), and healthy subjects (HEALTHY, n = 338). The patients underwent complete periodontal examination, history of smoking habits, glycemic and lipid biochemical evaluation. DNA from buccal cells of each patient was utilized to genotype 3 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) rs2275913, rs3819024 and rs10484879. The impact of the patient's biochemical profile was analyzed in their periodontal status. Each SNP was analyzed independently, and as haplotypes, by multiple logistic regressions, adjusted for covariates, and also stratifying the groups by age, sex and smoking habits.

Results: Independently of the degree of periodontitis, poorly-controlled T2DM patients showed worse glycemic and lipid profile. Multiple logistic regressions demonstrated that ever smokers carrying the GG genotype in the rs3819024 seemed to have higher risk for T2DM+Periodontitis (comorbidities) (OR=6.33; 95% CI=1.26-31.77, p=0.02), and mainly for T2DM alone (OR=5.11; 95% CI=1.37-19.06, p=0.01).

Conclusions: Because the wide confidence intervals observed in the association of the *IL17A*-rs3819024-GG with diseased phenotypes in smokers and former-smokers compared with never smokers, further studies enrolling larger populations and functional evaluation of the SNPs are needed to better understand the present findings.

Keywords: Genetic Polymorphisms, Diabetes Mellitus, Periodontitis, Interleukin 17.

Introduction

Periodontal disease (PD), or periodontitis, is considered a complex disease influenced by factors that can affect the risk of the disease onset (risk factors) or the progression of the existing disease (prognostic factors)^(1, 2). PD is considered one of the most common oral diseases of infectious origin that are associated with the installation of pathogenic biofilm on the surfaces of teeth, and that can trigger an immune / inflammatory response of the host ^(3, 4). The complex periodontal microbiota plays an important role in periodontal health or in the occurrence of PD⁽³⁾. Although essential for the occurrence of PD, the biofilm bacteria involved in the imbalance are insufficient to trigger the disease alone. Currently, it is well established that tissue damage generated in PD is attributed mainly to the host's response, and not to the direct bacterial action and its products^(5, 6)

Several factors related to the host, such as environmental or smoking factors, the presence of systemic diseases, and genetic load, are studied to understand how to participate in the beginning and progress of PD⁽⁷⁾. Genetic inheritance can explain, in part, why PD manifests itself in different clinical forms in the population⁽⁸⁾. In a classic study with monozygotic and dizygotic twins, it was estimated that there is approximately 50% heredity to monitor chronic periodontitis, even after adjustments for behavioral variables.^(9, 10)

Like PD, Diabetes Mellitus (DM) has been conceptualized as a complex (or multifactorial) disease, where genetics and environmental factors play an essential role in pathogenesis⁽⁹⁾. A relevant feature of complex diseases is the fact that they are polygenic, that is, many genes are involved in the susceptibility of the disease, each ensuring a small contribution.

DM is a group of clinically and genetically heterogeneous disorders that affect carbohydrate metabolism first, followed by lipids and, subsequently, proteins⁽¹¹⁻¹³⁾. The most common characteristic of DM is an abnormal elevation of blood glucose levels ⁽¹⁴⁾, that is, hyperglycemia, which is caused by a deficit in insulin secretion caused by dysfunction of the pancreas beta cells and / or insulin resistance, in the liver and muscles⁽¹⁵⁾. As a direct consequence of hyperglycemia and osmotic instability, a classic clinical triad of symptoms is developed, including polyphagia, polydipsia, and polyuria.⁽¹⁶⁾

The onset of the disease is related to genetic, environmental, and behavioral risk factors⁽¹⁷⁾. The most common types of DM are type 1 (T1DM) when the body is unable to produce the necessary amount of insulin because the beta cells of the pancreas are eliminated by autoimmunity, and type 2 (T2DM) which begins with resistance to insulin because the cells

do not respond appropriately to insulin, and also as the disease progresses, less insulin production may develop, but without an autoimmune reaction^(12, 18). The leading cause of T2DM is excess body weight and lack of physical activity.⁽¹⁸⁾

Patients with diabetes tends to have a higher prevalence of more severe PD than those who do not have the disease, being the glycemic control activity a fundamental determinant of this relationship⁽¹⁹⁻²⁴⁾. Periodontitis can be recognized as the sixth major complication associated with diabetes⁽²⁵⁾. A bidirectional relationship between T2DM and PD has been recognized⁽²⁶⁾, meaning that T2DM is not only a risk factor for PD, but PD can have a negative impact on glycemic control⁽²⁷⁾. Thus, it is considered that the association between PD and DM can be a consequence of two mechanisms: 1) a direct causal association, in which the complications of DM intervene as modifiers of PD expression; 2) or that the inflammatory cytokines existing in PD can cause changes in glucose and lipid metabolism.⁽²⁸⁾

Cytokines are soluble proteins secreted by cells to act as a messenger that transmits signals to other cells⁽²⁹⁾. They are able to measure and control autoimmune and inflammatory responses and can also regulate cell growth and differentiation. Interleukin 17A, more commonly referred as IL-17, the first described member of the IL-17 family⁽³⁰⁾, is a proinflammatory cytokine that has several functions that imply both immunological protection and immunopathology⁽³¹⁾. IL-17 plays an important role in immune surveillance on mucous and barrier surfaces^(32, 33), but it is also implicated in immunopathological scenarios of autoimmunity and chronic inflammation⁽³⁴⁾

Many studies have shown high levels of IL-17 in periodontitis and indicate a correlation between increased expression of IL-17 with disease severity and clinical parameters of periodontal destruction⁽³⁵⁻³⁸⁾. Also, it has been shown that Th17 cells exist in periodontal lesions⁽³⁹⁾ being the main source of IL-17 in periodontitis⁽⁴⁰⁾ in the gingival fluid and saliva.^(36, 41) Regarding the T2DM, there are scarce data on the influence of IL-17 on it. Linhartova et al. 2016⁽⁴²⁾ analyzed the rs2275913 (–197A/G) polymorphisms in the gene *IL-17A* in T1DM and Periodontitis patients and determined their associations with IL-17 production and occurrence of periopathogens and founded that the A allele were associated with increased risk of T1DM ($P < 0.05$), higher levels of HbA1c and production of IL-17 by mononuclear cells of CP patients (unstimulated/stimulated by *Porphyromonas gingivalis*)⁽⁴²⁾. Post-transplant diabetes mellitus (PTDM) were analyzed in a Poland patients, but there were not association with the rs2275913⁽⁴³⁾. Chinese population was associated with an increased risk of coronary artery disease (CAD) for the rs2275913 polymorphism (AA vs GG: crude OR = 2.16, 95% CI = 1.08-

4.30; AG/AA vs GG: OR = 1.81, 95% CI = 1.04-3.15)⁽⁴⁴⁾.

Considering the importance of IL-17 in the context of periodontitis, the inter-relationship between periodontitis and T2DM, and the few information on the relevance of this cytokine with T2DM, this study aimed to assess the impact of the biochemical profile with the clinical periodontal status of the patients, and to investigate three polymorphisms in the *IL17A* gene to assess whether they may be associated with genetic susceptibility to periodontitis alone, or to periodontitis in the presence of T2DM, as comorbidities.

Material and Methods

Selection of Subjects

All the patients were recruited through random selection from the population of patients treated (from 2010 to 2018) at the Department of Periodontology, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Brazil. This study was performed in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 1983), and was approved by the Ethics in Human Research Committee of the Araraquara School of Dentistry (UNESP; Protocol number 50/06). All the patients signed a written informed consent before any study-related procedures.

The patients were divided into three groups according to their periodontal and glycemic profile: Healthy Group (Individuals without T2DM and without periodontitis), Periodontitis Group (Individuals without DM2 and with periodontitis) and Group T2DM_P (Individuals with T2DM and periodontitis). The criteria for definition of periodontitis were according the CDC/AAP (Centers for Disease Control and Prevention / American Academy of Periodontology)⁽⁴⁵⁾, such periodontal criteria have already been used in studies of genetic polymorphisms, including studies of the type GWAS for Periodontitis^(46, 47). The criteria for definition of T2DM was according to ADA (American Diabetes Association)⁴⁸.

To calculate the sample size needed for the study to have power to attest the association between the alleles and periodontitis, the G* Power Calculator, version 3.1.9⁴⁹ was used, considering the parameters: logistic regression; two-tail, OR: 1.5; Pr (Y = 1 / X = 1) H0 = 0.2; alpha of 0.016 (0.05/ 3 SNPs) and 80% power, R²=0. We found that each group should be composed of at least 139 patients to have sufficient power to attest the association of the allele(s) with the diseased phenotype.

The study participants were at least 30 years old and genetically unrelated. Participants were excluded from the study if they had chronic or systemic diseases (i.e. HIV infection, or immunosuppressive chemotherapy), if they had received systemic antibiotics in the previous 3 months, if they received periodontal treatment in the previous 6 months, if they had less than 10 natural teeth (excluding third molars) or if they were pregnant or lactating.

To check the metabolic profile of the patients, after a 12 - hour overnight fasting they were referred to a Clinical Analysis Laboratory for venous puncture blood collection for the tests: Hemogram, Insulin, Fasting Glycemia, HbA1c, Triglycerides, Total Cholesterol and HDL-cholesterol. The glycemic parameters considered important in the present study to classify patients affected by T2DM were fasting glycemia and glycated hemoglobin (HbA1c), which is considered the gold standard for assessing the state of metabolic compensation of the patient. According to the American Diabetes Association, the following were considered:

- Patients with T2DM: fasting blood glucose ≥ 126 mg / dl and HbA1c $\geq 6.5\%$;
 - Metabolically decompensated (poor-controlled) T2DM patients: HbA1c $\geq 8\%$;
 - Metabolically compensated (well-controlled) T2DM patients: HbA1c $\leq 7.1\%$ and $\geq 6.5\%$.
- Patients without T2DM: fasting blood glucose ≤ 99 mg/dl and HbA1c $< 6.4\%$.⁽⁴⁸⁾

Regarding the periodontal examinations, the following clinical signs and parameters were assessed at four interproximal sites around each tooth: probing pocket depth (PPDi) and clinical attachment level (CALi), measured to the nearest millimeter by a UNC-15 periodontal probe. Presence of visible plaque, marginal bleeding and bleeding on probing (BOP) were registered as a percentage of the total number of interproximal sites assessed. All fully erupted teeth, except third molars and teeth with extensive destruction of the clinical crown were examined.

Thus, patients (n = 879) were divided according to their blood glucose levels and their periodontal profile into the following groups:

- **T2DM_P** (n = 199) - Individuals with type 2 diabetes mellitus and with periodontitis (moderate and / or severe);
- **PERIODONTITIS** (n = 342) - Individuals without type 2 diabetes mellitus and with moderate and / or severe periodontitis;

- **HEALTHY** (n = 338) - Individuals without type 2 diabetes mellitus and without periodontitis or with slight periodontitis.

Regarding smoking, the smoking status was confirmed by a specific questionnaire. History of smoking was defined according to Miyake et al. (2014) as follows: (i) never smoked or (ii) ever smoked (including patients those who are current smokers and former smokers) ⁽⁵⁰⁾.

DNA Extraction, Genotyping and Analysis of SNPs

Genomic DNA was extracted from buccal mucosa epithelial cells from each patient, using standard protocols involving proteinase K digestion, 8M ammonium acetate and subsequent ethanol precipitation ⁽⁵¹⁾. Purity of genomic DNA was assessed on a microvolume UV spectrophotometer (NanoDrop® 2000, Thermo Scientific) and quantified on a fluorometer (Qubit® 2.0 fluorometer, Invitrogen). Samples were used whether they presented $A_{260/280}$ ratio between 1.7 and 2.0 and the concentration was adjusted to 50 ng/μL in T.E buffer (TrisHCl 10mM, EDTA 0,1 M, SDS 0,5% - pH 8.0).

Genotype analyses of each of the 3 SNPs were performed by the allelic discrimination method in real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) using TaqMan® SNP genotyping assays (Thermo Fischer Scientific, Foster City, CA, EUA). The reactions were performed in a final volume of 12.5 μL, containing 0.63 μl of the specific TaqMan assay for genotyping each referred SNPs (including forward and reverse primers and probes marked with VIC and FAM, as presented in Table 1); 6.25 μl of TaqMan® Genotyping Master Mix(2X TaqMan®Genotyping Master Mix, Thermo Fisher Scientific), 20ng of genomic DNA and DNase/RNase free water in enough quantity to complete the final genotyping reaction. The following conditions were used for cycling the SNPs on a qPCR thermocycler (StepOnePlus Real-Time PCR System - Thermo Fisher Scientific): 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 min. The genotyping analysis was performed with an online software (Applied Biosystems™ Analysis Software, Genotyping Analysis Module, version 3.2.) using auto-calling for the automated grouping of sequences, deemed by the analysis software to have similar High-Resolution Melt (HRM) curve shapes and temperature melting (T_m). The quality value of the data points for the genotyping was determined by a threshold above 95%.

Statistical Analysis

The general characteristics of each group were submitted to a descriptive and analytical statistics using IBM SPSS Statistics 20.0 and GraphPad Prism 6.0 softwares. First, all data was evaluated by normality tests (D'Agostino & Pearson), then were applied parametric (multiple

comparison with the One-way ANOVA followed by Tukey test) or nonparametric (multiple comparison by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test) tests. Continuous demographic variables were compared among the groups using the Student's-t test (for age), while the chi-squared test was used for categorical variables (sex, ethnicity and smoking). To evaluate differences in the periodontal parameters among the groups we used the Kruskal-Wallis followed by Dunn's test, or the Mann-Whitney test.

The minor allele frequency (MAF) was calculated separately for each group, as well as the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) of the genotype frequencies, using chi-square goodness-of-fit for any deviations from the expected genotype equilibrium. These analyses were made using the PLINK software⁽⁵²⁾.

Multiple logistic regression models assuming additive allelic effects, adjusting for age, sex and smoking habits (as independent variables) were used for testing associations between SNPs and: the occurrence of only P (when comparing Healthy and Periodontitis groups); the occurrence of only T2DM (when comparing Periodontitis and T2DM_P groups), and the occurrence of T2DM together with P (when comparing Healthy and T2DM_P groups). These gene-phenotype associations were estimated by odds ratio (OR) and Confidence Interval (CI) of 95%.

Furthermore, the same analysis was stratified by sex to identify the sex-specific effects of the SNPs on periodontitis, by the additive model using multiple logistic regression adjusted by age and smoking. Similarly, to identify the effects of smoking habits with those SNPs on periodontitis, we stratified the population by smoking status and executed the multiple logistic regression adjusting by age and sex.

The PLINK software was used to impute haplotypes based on multimarket predictors using the standard E-M algorithm and to evaluate a likelihood ratio test of linkage disequilibrium. To detect associations between the haplotypes and the diseased phenotypes, multiple logistic regressions adjusted for age, sex and smoking habits were developed. All the multiple logistic regressions were performed by using the STATA software version 12.0 for Mac (Statistics/Data Analysis, Stata Corporation, College Station, TX, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

From a total of 1158 patients screened for the study, a total of 879 were selected, following the inclusion and exclusion criteria of the study. Table 2 below shows the demographic characteristics of the studied population. There was a statistical difference in the distribution of men and women among the groups. Regarding age, there was a difference between the 3 groups, so that the HEALTHY group showed the lowest median age in relation to the other groups. Regarding smoking status, a statistical difference was found between the groups of patients who never smoked in the HEALTHY and PERIODONTITIS groups as well as between HEALTHY and T2DM_P ($p < 0.05$). The statistical differences in characteristics observed between the groups is not a surprising result in population studies, since this was adjusted by employing adjusted logistic regression.

Table 2 also presents the periodontal clinical information by comparing each group. As expected, the HEALTHY patient group had healthy periodontal characteristics. In comparison to the PERIODONTITIS group, the T2DM_P group had a higher percentage of the Visible Plaque Index (IPV%), Marginal Bleeding Index (ISM%) and Interproximal Bleeding on Probing (SSi%), of sites with Interproximal Probing Depth (PSi) ≥ 5 mm and Level of Interproximal Attachment Levels (NIi) ≥ 6 mm. This demonstrates that the T2DM_P group has a worse periodontal clinical condition than the PERIODONTITIS group. As expected for the glycemic profile, patients with T2DM_P have high levels of fasting blood glucose, HbA1c, and Insulin concerning the PERIODONTITIS and HEALTHY groups (which did not differ between them). Regarding the lipid profile, total cholesterol in the T2DM_P group showed statistical significance, the median being higher compared to the HEALTHY group. However, there was no significant difference between HEALTHY and PERIODONTITIS. Regarding LDL levels, there was no difference between the groups, but for HDL, the T2DM_P group showed a significantly lower median than the other groups. As for the triglyceride levels, only the HEALTHY group was significantly lower compared to the T2DM_P and PERIODONTITIS groups (which showed equally high levels). About obesity parameters such as Body Mass Index (BMI) and Waist-to-Hip-Ratio, only the T2DM_P group showed significantly high levels in relation to the other groups.

Table 1- Information regarding the 3 genotyped Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

SNP	Assay ID	Position [†] , Alleles and type of SNP	Gene (SNP)	MAF [‡]	MAF - CEU (white) %	MAF - TSI (Italian) %
rs3819024	C__11545877_10	Chr6:g.52050786A>G, Upstream Variant	IL17A	G G 0.055	0.152	0.150
rs2275913	C__15879983_10	Chr6:g.52051033G>A, Upstream Variant	IL17A	A A 0.048	0.121	0.159
rs10484879	C__30123907_20	Chr6:g.52051957G>A;520 51957G>T, Intron Variant	IL17A	T T 0.036	0.047	0.036

[†] Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37.p13) or hg19

[‡]MAF: Minor allele frequency found for the total population investigated here.

CEU: Caucasoid from Europe.

TSI: Toscan Region-Italy

Table 2. Demographic characteristics of the studied groups, periodontal clinical parameters, biochemical profile and physical examination.

	HEALTHY n= 338	PERIODONTITIS n=342	T2DM_P n=199
Age	41.00 (30-78) ^a	49.0 (30-79) ^b	57.00 (31-91) ^c
Sex, n (%)			
Male	108 (31.9) ^a	140 (40.9) ^b	83 (41.7) ^c
Female	230 (68.0) ^a	202 (59.0) ^b	116 (58.2) ^c
Smoking Habit, n (%)			
©Smoker	27 (7.9) ^a	34 (9.9) ^a	18 (9) ^a
©Former-Smoker	46 (13.9) ^a	90 (26.3) ^a	63 (31.6) ^a
Never-Smoker	265 (78.1) ^a	218 (63.7) ^b	118 (59.2) ^b
Number of teeth	27 (10-28) ^a	24(10-28) ^b	21 (10-28) ^c
IPV (% site)	20.3 (0.0-86.96) ^a	43.5 (0.0-100) ^b	56.5 (2.8 -100) ^c
ISM (% site)	4.1(0.0-63.39) ^a	11.06(0.0-100) ^b	36.96 (5.2 -100) ^c
SSi (% site)	1.11(0.0-32.29) ^a	37.02(2.8-95.4) ^b	52.5 (2.2 - 100) ^c
PSi ≤ 4mm (% site)	100 (96.7-100) ^a	91.3(20.4-100) ^b	87.5 (10 - 100) ^b
PSi ≥ 5mm (% site)	0.0 (0.0 - 3.2) ^a	8.7(0.0-79.5) ^b	12.5 (0.0 - 90.0) ^b
Nli ≤ 3mm (% site)	100 (91.3 - 100) ^a	72.3 (7.9 -97.9) ^b	58.3 (0.0 - 97.7) ^c
Nli = 4-5mm (%site)	00.0 (0.0- 7.6) ^a	17.8 (0.0 - 60) ^b	24.0 (0.0 - 78.8) ^b
Nli ≥ 6mm (% site)	0.0 (0.0- 2.08) ^a	6.2 (0.0 - 76.14) ^b	11.1 (0.0-90) ^b
Fasting Glucose	91.5 (80.0-99.0) ^a	92.5 (60.0-99.0) ^a	152.4 (83-467.9) ^b
HbA1c	5.4 (4.8-5.6) ^a	5.6 (4.4 -5.6) ^a	7.9 (4.5-14.3) ^b
Insulin	7.4 (3.6-37.8) ^a	10.2 (4.3-32.4) ^a	13.80 (3.2-161) ^b
Total Cholesterol	173.0 (123.0-321.0) ^a	175 (137-273) ^{ab}	191 (111.0-390.0) ^b
HDL-Cholesterol	54.5 (31.0-90.0) ^a	52.5 (30.0-88.0) ^a	44 (24.0-350.6) ^b
LDL-Cholesterol	98 (50.6-232.6) ^a	96 (17.0-732.0) ^a	108.8 (7.5-523.0) ^a
Triglycerides	105 (41.0-286.0) ^a	134 (48.0-710.0) ^b	155 (31.0-765.0) ^b
BMI (m/kg²)	27.5 (18.0-41.6) ^a	26.4 (19.2-38.2) ^a	29.3 (18.5-47.2) ^b
Waist-to-Hip-Ratio (cm)	0.86 (0.09-1.0) ^a	0.88 (0.64-1.06) ^a	0.95 (0.76-1.25) ^b

IPV: Visible Plaque Index; ISM: Marginal Bleeding Rate; SSi: Interproximal Bleeding on Probing; P=Periodontitis; PSi: Interproximal Probing Pocket Depth; Nli: Level of Interproximal Clinical Attachment, BMI: Body Mass Index ^{a, b, c} Different Letters Means $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis Test, followed by the Dunn's test) for Periodontal Clinical Parameters.

a,b,c Different letter means p value <0.05 (Mann-Whitney Test; $\alpha = 5\%$) / aa or bb Similar Letter means p value >0.05 (Mann-Whitney test; $\alpha = 5\%$); for Glycemic Profile, Lipid Profile and Physical Examination

© Ever Smoker= Smoker and Former Smoker

p value presented are median (minimum-maximum), excepted for sex and smoking habit

Table 3 presents the biochemical exam data of patients in the T2DM_P group subdivided into Moderate or Severe Periodontitis, and among each subgroup, patients were compared regarding their metabolic compensation status (well-controlled versus poor-controlled). We can observe statistically significant differences between the subgroups with

similar degrees of periodontitis and different metabolic control; therefore: in patients with T2DM_P Moderate, there were significant differences given by the degree of metabolic compensation, therefore, between the well-controlled and poor-controlled. An example of this is the Fasting Glucose, as the group with poor-controlled Moderate T2DM_P showed much higher levels (176.0mg/dL) compared with the well-controlled Moderate group (111.0 mg/dL). The same was observed for patients with T2DM_P Severe between well-controlled and poor-controlled patients. Proof of this is that the medians of fasting blood glucose are lower in well-controlled patients (117.0 mg/dL) in relation to poor-controlled patients (198.0 mg/dL). The tests for Total Cholesterol, LDL Cholesterol, Triglycerides, and BMI of poor-controlled patients with moderate periodontitis show the highest levels. T2DM_P severe well-controlled patients show better results from biochemical tests compared to poor-controlled ones.

There were also statistical differences between groups with similar metabolic control, but with different degrees of periodontitis, that is, between well-controlled T2DM_P Moderate versus well-controlled T2DM_P Severe. In general, it was possible to notice a more significant difference in the glycemic and lipid profile given by the degree of metabolic compensation than by the degree of periodontitis, Therefore, in the groups of patients with moderate versus poor-controlled T2DM_P, regardless of the degree of periodontitis.

Table 3. T2DM_P patients subdivided according the periodontal status and HbA1c metabolic control

T2DM_P							
MODERATE PERIODONTITIS				SEVERE PERIODONTITIS			
Median (minimum - maximum)	Well-Controlled * (n= 22)	Poor-Controlled * (n= 25)	p value*	Well-Controlled ** (n= 33)	Poor-Controlled ** (n= 73)	p value**	p value ^{ab} among the 4 groups
Fasting Glucose	111.0 (90.0 – 149.0) ^a	176.0 (84.0 – 400.0) ^b	0.0001	117.0 (83.00 - 215.0) ^a	198.0 (87.00 - 467.9) ^b	0.0001	0.0001
HbA1c	6.50 (4.50 - 7.00) ^a	8.60 (7.10 - 13.40) ^b	0.0001	6.20 (4.70 - 6.90) ^a	9.35 (7.10 - 14.30) ^b	0.0001	0.0001
Insulin	11.70 (6.03 - 47.30) ^a	15.00 (4.80 - 161.0) ^a	0.27	14.60 (3.20 - 49.40) ^a	13.50 (5.10 - 101.9) ^a	0.86	0.7036
Total Cholesterol	155.6 (111.0 - 221.0) ^a	206.0 (136.0 - 275.0) ^b	0.0007	208.0 (131.9 - 306.0) ^b	189.0 (118.0 - 304.0) ^b	0.0639	0.0007
HDL Cholesterol	45.50 (25.00 - 69.00) ^a	40.50 (29.00 - 72.00) ^a	0.3895	47.00 (30.00 - 75.00) ^a	42.60 (24.00 - 87.00) ^a	0.1958	0.4477
LDL Cholesterol	75.60 (30.80 - 142.4) ^a	121.5 (45.40 - 190.4) ^a	0.019	126.4 (33.26 - 209.6) ^a	107.6 (7.50 - 523.0) ^a	0.3021	0.0522
Triglycerides	140.0 (47.00 - 283.0) ^a	174.5 (57.00 - 440.0) ^a	0.13	155.0 (61.00 - 439.0) ^a	155.0 (58.90 - 765.0) ^a	0.3711	0.3646
BMI (m/kg2)	27.28 (22.48 - 44.98) ^a	30.85 (23.42 - 47.27) ^a	0.0361	30.85 (21.93 - 47.27) ^a	29.34 (21.64 - 41.37) ^a	0.3240	0.1647
Waist-to-Hip-Ratio (cm)	0.91 (0.76 - 1.17) ^a	0.96 (0.87 - 1.15) ^a	0.1272	0.94 (0.84 - 1.06) ^a	0.99 (0.86 - 1.25) ^a	0.0327	0.0843

* p <0.05 between well-controlled and poor-controlled patients (HbA1c ≤7.0%) with moderate periodontitis (Mann-Whitney Test, α = 5%)

** p <0.05 between well-controlled and poor-controlled patients (HbA1c ≤7.0%) with severe periodontitis (Mann Whitney Test, α = 5%)

a, b, c Different letter means p value <0.05 considering the comparison among the four subgroups (Kruskal-Wallis, followed by Dunn's test; α= 5%)

The distribution of alleles and genotypes and their frequency in each group is showed in the Supplementary Table 1. We observed that all the studied SNPs obeyed the Hardy-Weinberg equilibrium. The Table 4 showed the adjusted multiple logistic regressions analyses made for the total population demonstrating no significant results of association of any of the three SNPs of the *IL17A* gene with either Periodontitis, or T2DM in the presence of Periodontitis.

Following, multiple logistic regression analyses were performed stratifying the population by sex, or by smoking habits, making the appropriate adjustments for each analysis. As a main result, it was verified that stratifying the population by smoking habits, ever smokers had the GG genotype for the rs3819024 SNP statistically more frequent in the T2DM_P group compared to the HEALTHY group (OR = 6.33; 95% CI = 1.26-31.77; p = 0.02). When patients in the PERIODONTITIS group were compared to the T2DM_P group, the same SNP showed statistical significance (OR = 5.11; 95% CI = 1.37-19.06; p = 0.01), demonstrating that the GG genotype in former and smoker patients is associated with a higher chance to develop T2DM (Table 4).

Table 4. Multiple Logistic Regression analyses for effects of each SNP in the diseased phenotype considering all patients (adjusted by age, sex and smoking) and for patients stratified by sex ‡ (adjusted by age and smoking) and by smoking habits (adjusted by age and sex)

	HEALTHY vs PERIODONTITIS		HEALTHY vs T2DM_P		PERIODONTITIS vs T2DM_P	
	Adj OR (95% CI)	<i>p</i> - value	Adj OR (95% CI)	<i>p</i> -value	Adj OR (95% CI)	<i>p</i> -value
SNP (A>G) rs3819024						
All patients† n=879	Adjusted OR†		Adjusted OR†		Adjusted OR†	
AA	Ref		Ref		Ref	
AG	1.09 (0.78 - 1.52)	0.58	0.97 (0.62 - 1.52)	0.92	1.02 (0.68 - 1.52)	0.91
GG	0.95 (0.46 - 1.95)	0.90	1.46 (0.60 - 3.55)	0.39	1.79 (0.77 - 4.14)	0.17
Male ‡ n=248	Adjusted OR‡		Adjusted OR‡		Adjusted OR‡	
AA	Ref		Ref		Ref	
AG	1.12 (0.64 - 1.95)	0.67	0.62 (0.27 - 1.38)	0.24	0.85 (0.45 - 1.63)	0.64
GG	0.70 (0.19 - 2.56)	0.59	1.76 (0.39 - 7.86)	0.45	3.24 (0.83 - 12.64)	0.08
Female ‡ n=432	Adjusted OR‡		Adjusted OR‡		Adjusted OR‡	
AA	Ref		Ref		Ref	
AG	1.08 (0.72 - 1.63)	0.69	1.20 (0.69 - 2.06)	0.50	1.13 (0.67 - 1.89)	0.63
GG	1.09 (0.46 - 2.57)	0.83	1.31 (0.42 - 4.07)	0.63	1.23 (0.41 - 3.70)	0.70
Never Smoking ¶ n=483	Adjusted OR¶		Adjusted OR¶		Adjusted OR¶	
AA	Ref		Ref		Ref	
AG	1.03 (0.70 - 1.52)	0.86	0.93 (0.54 - 1.59)	0.8	1.01 (0.61 - 1.66)	0.96
GG	0.62 (0.25 - 1.52)	0.30	0.61 (0.17 - 2.21)	0.46	0.92 (0.26 - 3.27)	0.90
Ever Smoking ¶ n=197	Adjusted OR¶		Adjusted OR¶		Adjusted OR¶	
AA	Ref		Ref		Ref	
AG	1.28 (0.69 - 2.39)	0.42	1.12 (0.49 - 2.54)	0.78	1.09 (0.55 - 2.17)	0.79
GG	2.67 (0.63 - 11.25)	0.17	6.33 (1.26 - 31.77)	0.02	5.11 (1.37 - 19.06)	0.01*
SNP (A>G) rs2275913						
All patients† n=879	Adjusted OR†		Adjusted OR†		Adjusted OR†	
GG	Ref		Ref		Ref	
GA	1.07 (0.77 - 1.50)	0.66	0.96 (0.60 - 1.53)	0.87	0.93 (0.61 - 1.42)	0.75
AA	0.65 (0.30 - 1.41)	0.28	1.00 (0.37 - 2.65)	0.99	1.69 (0.66 - 4.32)	0.27
Male ‡ n=248	Adjusted OR‡		Adjusted OR‡		Adjusted OR‡	
GG	Ref		Ref		Ref	
GA	1.20 (0.68 - 2.12)	0.52	1.13 (0.49 - 2.59)	0.76	0.94 (0.48 - 1.84)	0.87
AA	0.67 (0.17 - 2.64)	0.57	2.15 (0.44 - 10.54)	0.34	2.32 (0.57 - 9.41)	0.23
Female ‡ n=432	Adjusted OR‡		Adjusted OR‡		Adjusted OR‡	
GG	Ref		Ref		Ref	
GA	1.01 (0.67 - 1.53)	0.93	0.88 (0.50 - 1.55)	0.66	0.92 (0.54 - 1.57)	0.76

AA	0.63 (0.24 - 1.61)	0.33	0.63 (0.17 - 2.34)	0.49	1.25 (0.33 - 4.63)	0.73
Never Smoking ¶	Adjusted OR¶ n=483		Adjusted OR¶ n=383		Adjusted OR¶ n=336	
GG	Ref		Ref		Ref	
GA	1.04 (0.70 - 1.54)	0.84	1.04 (0.59 - 1.82)	0.88	1.11 (0.66 - 1.88)	0.67
AA	0.40 (0.15 - 1.03)	0.06	0.37 (0.09 - 1.57)	0.18	1.25 (0.30 - 5.21)	0.75
Ever Smoking ¶	n=197		n=154		n=205	
GG	Ref		Ref		Ref	
GA	1.18 (0.64 - 2.19)	0.58	0.86 (0.37 - 2.01)	0.74	0.73 (0.36 - 1.49)	0.39
AA	4.05 (0.45 - 36.27)	0.21	8.48 (0.83 - 86.00)	0.07	2.27 (0.57 - 9.01)	0.24
SNP (G>T) rs10484879						
All patients †						
N=879	Adjusted OR†		Adjusted OR†		Adjusted OR†	
GG	Ref		Ref			
GT	0.89 (0.63 - 1.26)	0.53	1.16 (0.72 - 1.84)	0.52	1.34 (0.88 - 2.04)	0.16
TT	1.01 (0.42 - 2.43)	0.97	1.16 (0.34 - 3.94)	0.80	1.05 (0.36 - 3.04)	0.92
Male ‡	Adjusted OR‡ n=248		Adjusted OR‡ n=191		Adjusted OR‡ n=223	
GG	Ref		Ref		Ref	
GT	1.02 (0.56 - 1.83)	0.93	1.06 (0.45 - 2.48)	0.87	1.13 (0.57 - 2.23)	0.71
TT	0.81 (0.14 - 4.67)	0.81	5.37 (0.79 - 36.36)	0.08	3.79 (0.75 - 19.16)	0.10
Female ‡	n=432		n=346		n=318	
GG	Ref		Ref		Ref	
GT	0.82 (0.53 - 1.27)	0.38	1.20 (0.69 - 2.10)	0.51	1.50 (0.88 - 2.58)	0.13
TT	1.10 (0.40 - 3.03)	0.84	0.25 (0.02 - 2.47)	0.23	0.24 (0.02 - 2.00)	0.18
Never Smoking ¶	Adjusted OR¶ n=483		Adjusted OR¶ n=383		Adjusted OR¶ n=336	
GG	Ref		Ref		Ref	
GT	0.91 (0.60 - 1.37)	0.66	1.16 (0.66 - 2.03)	0.59	1.38 (0.81 - 2.34)	0.22
TT	0.84 (0.31 - 2.26)	0.73	0.43 (0.07 - 2.64)	0.36	0.53 (0.10 - 2.70)	0.45
Ever Smoking ¶	n=197		n=154		n=205	
GG	Ref		Ref		Ref	
GT	0.86 (0.45 - 1.65)	0.66	1.26 (0.53 - 3.01)	0.58	1.36 (0.66 - 2.79)	0.39
TT	2.42 (0.24 - 23.67)	0.44	6.97 (0.59 - 81.87)	0.12	2.57 (0.47 - 14.08)	0.27

† OR with 95% CI were estimated by multiple logistic regression models after controlling for age, sex and smoking.

‡ OR with 95% CI were estimated by multiple logistic regression models after controlling for age and smoking.

Never smokers = patients who never smoked; Ever smokers = current smokers + former smokers.

¶ OR with 95% CI were estimated by multiple logistic regression models after controlling for age and sex.

OR = Odds Ratio; CI = Confidence interval

Bold font indicates $p < 0.05$, *p values significant after Bonferroni's correction ($p < 0.016$)

In the Table 5 is possible to note that all the investigated SNPs were in strong linkage disequilibrium among them in all groups, since the lowest D' value observed was 0.79 demonstrating that the alleles present in those loci were inherited together, forming a haplotype.

Table 5. Pairwise Linkage Disequilibrium of each SNP in the groups.

	SNP	Linkage Disequilibrium	
		r^2	D'
HEALTHY VS PERIODONTITIS	rs3819024 vs 2275913	0.588	0.809
	2275913 vs 10484879	0.674	0.944
HEALTHY VS T2DM_P	3819024 vs 2275913	0.616	0.833
	2275913 vs 10484879	0.576	0.836
PERIODONTITIS VS T2DM_P	3819024 vs 2275913	0.597	0.837
	2275913 vs 10484879	0.52	0.796

D' = the linkage disequilibrium coefficient D standardized by the maximum value it can take (Dmax), given the allele frequencies; r^2 = the square of the correlation coefficient between allele frequencies.

The Table 6 showed the distribution of the most prevalent haplotypes arranged as genotypes, and the comparisons between the groups in order to assess whether some of them could be associated with Periodontitis (by comparing the HEALTHY vs. PERIODONTITIS groups), or with T2DM and PERIODONTITIS (HEALTHY vs. T2DM_P), or with T2DM (PERIODONTITIS vs T2DM_P groups). The statistically significant results were observed for the rare haplotypes (<3% frequency) which all of them taken together showed susceptibility to periodontitis+T2DM (OR = 2.30; 95% CI = 1.16- 4.55), as well to T2DM alone (OR = 2.98; IC = 1.62-5.48). Unfortunately, we did not have the T2DM group isolate; therefore, it is not possible to know the influence of the isolated effect of the T2DM group on the comparison

Table 6. Multiple Logistic Regression analyses for effects of haplotypes (arranged as genotypes) in the diseased phenotype considering all patients (adjusted by age, sex and smoking)

HEALTHY VS PERIODONTITIS				HEALTHY VS T2DM_P			PERIODONTITIS VS T2DM_P		
Haplotypes [#]	n (%)	Adj OR (95% CI)	p-value	n (%)	Adj OR (95% CI)	p-value	n (%)	Adj OR (95% CI)	p-value
AGG/AGG	50.62	REF		42.47	REF		44.17	REF	
GAT/AGG	24.07	OR= 0.83 (0.55 - 1.24)	0.37	25.34	OR= 0.63 (0.34 - 1.13)	0.12	23.06	OR= 1.02 (0.60 - 1.74)	0.93
GGG/AGG	7.41	OR= 1.27 (0.69 - 2.36)	0.43	8.22	OR= 1.19 (0.46 - 3.08)	0.70	7.78	OR= 0.88 (0.38 - 2.07)	0.78
GAG/AGG	5.86	OR= 0.99 (0.51 - 1.93)	0.99	11.64	OR= 1.69 (0.71 - 3.99)	0.23	6.94	OR= 1.53 (0.71 - 3.26)	0.27
AAT/AGG	3.40	OR= 0.92 (0.37 - 2.28)	0.87	4.11	OR= 0.55 (0.13 - 2.26)	0.46	2.78	OR= 0.88 (0.27 - 2.83)	0.83
Others (<3%)	8.64	OR=1.01 (0.56 - 1.83)	0.94	8.22	OR= 2.30 (1.16 - 4.55)	0.01	15.28	OR= 2.98 (1.62 - 5.48)	0.00

[#] Haplotypes = genotypes of - rs3819024, rs2275913, rs10484879/ rs3819024, rs2275913, rs10484879. **Bold font** indicates $p < 0.05$, and *p values significant after Bonferroni's correction ($p < 0.016$); OR with 95% CI were estimated by multiple logistic regression models after controlling for age, sex and smoking.

DISCUSSION

The main aspect that we originally intended to investigate here is the potential interrelationship of periodontitis and T2DM and the carriage of SNPs in the *IL17A* gene. This is the first study to assess the association of the referred SNPs in the *IL17A* gene with T2DM alone, or together with Periodontitis, which included a rigorous assessment of glycemic control at periodontal evaluation. Many studies observed that the glycemic control by T2DM patients is a fundamental determinant of the relationship with periodontitis^(14, 22, 24, 53, 54). As reviewed by Struch et al. (2008)⁽⁵⁵⁾, there is evidence that the prevalence and severity of PD are higher in people with diabetes compared to those without diabetes^(31, 34, 42, 43, 45, 46). This is in line with the results found in our study, as the T2DM_P group had higher rates of probing depth, bleeding on probing and clinical attachment level ≥ 6 , when compared with the Periodontitis group. Other studies have also demonstrated that individuals with adequate glycemic control have less chance of periodontal destruction⁽⁵⁶⁾, this fact could be observed in this study, since the Table 3 showed statistically significant differences between the subgroups with similar degrees of periodontitis and different metabolic control. Moreover, independently of the degree of periodontitis, poorly-controlled T2DM patients showed worse glycemic and lipid profiles.

In the present case-control study, we demonstrated for all the subjects investigated here that the three SNPs (rs3819024), (rs2275913) and (rs10484879) in the *IL7A* gene did not present susceptibility to Periodontitis, but stratifying the total of subjects by the smoking habits, we found that smokers and former smokers carried the GG genotype of the rs3819024 SNP statistically more frequently in the T2DM_P group compared to the HEALTHY group (OR = 6.33; 95% CI = 1.26-31.77; p = 0.02). Similar finding was obtained for the presence of only T2DM. In this study enrolling 879 Southeastern Brazilian patients from the São Paulo State we did not find association with periodontitis and/or T2DM regarding the rs2275913 (G197A) SNP. In another Southeastern 30 Brazilian patients from the Minas Gerais State investigated by *Correa et.al. 2012* and 313 Southern Brazilian individuals from the Paraná State investigated by *Zacarias et.al.2015*^(57, 58) there were higher susceptibility to periodontitis by the carriage of the A allele, while the G allele was a risk factor for periodontitis in other 202 subjects from the Minas Gerais State according to *Saraiva et.al. 2013*⁽⁵⁹⁾. These conflicting results could be due to the number of the investigated individuals and the clinical parameters to diagnose periodontitis, besides demographic characteristics of the population. Regarding the number of studied patients, since we enrolled a power sized number of patients, our study demonstrated confident results, leading to a more precise conclusion about the association of the *IL17A* polymorphisms with Periodontitis. We believe that those periodontitis-genetic association

conflicting results are not related with ethnic differences among populations from the different parts of the Southern and Southeastern regions of Brazil. Population from these regions showed similar historical process of ethnic composition. It is well-known that Brazilian population is considered ethnic mixed. All genetic studies enrolling a Brazilian population should consider the nature of its admixed ethnic origin, since Brazilians form one of the most heterogeneous populations in the world, resulting of the 5 centuries of inter-ethnic crosses between Europeans, Africans, and autochthonous Amerindians⁽⁶⁰⁾. According to Parra et al., 2003, is not recommended grouping Brazilians into ethnic groups based on their skin color and other physical characteristics associated with racial divisions⁽⁶¹⁾.

Haplotypes are combinations of marker alleles that are located together on the same chromosome, and tend to be inherited together⁽⁶²⁾, when they are in linkage disequilibrium (LD). With the availability of high-density single nucleotide polymorphism (SNP) markers, haplotypes play an essential role in association studies^(63, 64). The haplotypes directly tell us how the alleles are organized along the chromosome and reflect the pattern of inheritance over evolution⁽⁶⁵⁾, providing a compelling example to show that LD analysis based on underlying haplotypes can be much clearer. Second, haplotype-based methods may be more powerful than those based on unique polymorphisms in association studies of complex disease gene mapping⁽⁶⁶⁾. Therefore, we hypothesize that the investigation of haplotypes could reveal significant disease-phenotype associations. When the haplotypes were analyzed, it was possible to verify that, although there are statistically significant results for the association with T2DM alone, or T2DM and P as comorbidities, for the rare haplotypes analyzed together, unfortunately, this is not a biologically relevant result, because it was found by the sum of the different rare haplotypes (<3% frequency). Because the rarity of those haplotypes is difficult to appropriately measure the haplotype genetic association with the diseases, unless the same haplotype analysis is made in further studies enrolling huge populations to find what is the specific haplotype that have the potential genetic effect in the diseased phenotype.

This study has some limitations. Although when we considered all the investigated patients the number of enrolled subjects have sufficient statistical power, unfortunately, in stratifying the population by sex or by smoking habits (Table 4) we had a decreased sample size. This fact is reflected in the observed large CIs, making the genetic association less plausible. Therefore, it is suggested to investigate the same genetic variants in larger Brazilian populations from different regions of the country, and in multiple ethnic populations throughout the world, in agreement with Laine et al. (2014). Although we found important results related to the smoking status, we did not deeper explore here the reasons why the sex or smoking habits

might influence the gene-phenotype associations. Further studies with a specific design to assess these aspects are necessary to investigate the functional role of these SNPs in the context of periodontal disease and T2DM. Unfortunately, we did not have a T2DM group without Periodontitis (as comorbidity); therefore, further studies with similar design in the recruitment and selection criteria including this group could be made to overcome the limitation of our study. On the other hand, as positive points of our study we highlight that all patients had the accurate diagnosis to be part of a group (such as the complete periodontal exams and the biochemical profile) and they were of a similar socioeconomic status and selected from the same geographical area (Araraquara region, São Paulo State, Southeast of Brazil).

In conclusion, as a statistically significant result we found that smokers and former smokers who presented the GG genotype of the rs3819024 SNP in the *IL17A* gene, were associated with higher chance of developing diabetes mellitus in the presence or absence of periodontitis, after multiple logistic regression analysis adjusted by sex and age. However, the wide confidence interval observed in these analyses suggests that these results need to be proven in a larger population. Indeed, those kinds of further studies are necessary to properly assess the impact of haplotypes in the diseased phenotypes as investigated here.

REFERENCES

1. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F, et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44 Suppl 18:S39-S51.
2. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community dentistry and oral epidemiology*. 2004;32(4):239-49.
3. Vieira Colombo AP, Magalhaes CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial pathogenesis*. 2016;94:27-34.
4. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):88.
5. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbiology and immunology*. 2008;23(3):196-205.
6. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *The Journal of Immunology*. 1998;160(1):403-9.
7. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):9-11.
8. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *Journal of periodontology*. 2004;75(7):1033-41.
9. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of periodontology*. 2000;71(11):1699-707.
10. Candel-Marti ME, Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali J, Penarrocha-Diago MA. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2011;16(4):e518-21.
11. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;44:127-53.
12. Alberti K, Zimmet P. for the World Health Organization Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. *Diabet Med*. 1998;15:539-53.
13. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;101:287-92.
14. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2006;77(8):1289-303.
15. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*. 2017;40(Supplement 1):S11-S24.
16. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*. 1998;15(7):539-53.
17. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell SE. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annual review of medicine*. 1994;45:179-88.
18. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;73(1):181-5.
19. Seppala B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(3):161-5.
20. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Annals of periodontology*. 1996;1(1):1-36.

21. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol* 2000. 2003;32:59-81.
22. Lu HK, Yang PC. Cross-sectional analysis of different variables of patients with non-insulin dependent diabetes and their periodontal status. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2004;24(1).
23. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2006;77(8):1289-303.
24. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Annals of periodontology*. 1996;1(1):1-36.
25. L  e H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993;16(1):329-34.
26. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Annals of periodontology*. 2001;6(1):99-112.
27. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
28. Correia D, Alcoforado G, Mascarenhas P. Influência da Diabetes mellitus no desenvolvimento da doença periodontal. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dent  ria e Cirurgia Maxilofacial*. 2010;51(3):167-76.
29. Chaudhari HL, Warad S, Ashok N, Baroudi K, Tarakji B. Association of Interleukin-17 polymorphism (-197G/A) in chronic and localized aggressive periodontitis. *Brazilian oral research*. 2016;30.
30. Rouvier E, Luciani M, Golstein P. Fas involvement in Ca (2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(1):195-200.
31. Abusleme L, Moutsopoulos NM. IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral diseases*. 2017;23(7):854-65.
32. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(10):763-76.
33. Song X, He X, Li X, Qian Y. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cellular & molecular immunology*. 2016;13(4):418-31.
34. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(9):585-600.
35. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):142-59.
36. Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2004;75(1):37-43.
37. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, Garcia-Sesnich J, Hernandez M, Abusleme L, et al. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of periodontology*. 2012;83(7):948-54.
38. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *Journal of periodontology*. 2007;78(8):1545-50.
39. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Junior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral microbiology and immunology*. 2009;24(1):1-6.
40. Dutzan N, Konkel JE, Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal immunology*. 2016;9(5):1163-72.
41. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(6):509-16.
42. Borilova Linhartova P, Kastovsky J, Lucanova S, Bartova J, Poskerova H, Vokurka J, et al. Interleukin-17A gene variability in patients with type 1 diabetes mellitus and chronic periodontitis: its correlation with IL-17 levels and the occurrence of periodontopathic bacteria. *Mediators of inflammation*. 2016;2016.

43. Romanowski M, Domanski L, Pawlik A, Osekowska B, Dziedziejko V, Safranow K, et al. Interleukin-17 gene polymorphisms in patients with post-transplant diabetes mellitus. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2015;19(17):3152-6.
44. Zhao Q, Jiang H, Ma T, Qiu H, Guo M, Zhang X. The association between IL-17A and IL-23R polymorphisms and coronary artery disease risk in a Middle Eastern Chinese population. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019;33(6):e22893.
45. Page RC, Eke PI. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007;78 Suppl 7S:1387-99.
46. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, Hsueh WC, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Human molecular genetics*. 2013;22(11):2312-24.
47. Teumer A, Holtfreter B, Volker U, Petersmann A, Nauck M, Biffar R, et al. Genome-wide association study of chronic periodontitis in a general German population. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(11):977-85.
48. Care D. 6. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes—2019. *Diabetes care*. 2019;42(Supplement 1):S61-S70
49. Wang J, Shete S. Testing departure from Hardy-Weinberg proportions. *Statistical Human Genetics*: Springer; 2017. p. 83-115.
50. Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. IL3 rs40401 polymorphism and interaction with smoking in risk of asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health study. *Scandinavian journal of immunology*. 2014;79(6):410-4.
51. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian dental journal*. 2007;18(2):148-52.
52. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559-75.
53. Seppälä B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(3):161-5.
54. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology 2000*. 2003;32(1):59-81.
55. Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Journal of periodontology*. 2008;79(3):501-7.
56. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation Between Control of Diabetes and Gingival Bleeding. *Journal of periodontology*. 1985;56(3):154-7.
57. Zacarias JM, Sippert EA, Tsuneto PY, Visentainer JE, de Oliveira e Silva C, Sell AM. The Influence of Interleukin 17A and IL17F Polymorphisms on Chronic Periodontitis Disease in Brazilian Patients. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:147056.
58. Correa JD, Madeira MF, Resende RG, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, de Souza Dda G, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:846052.
59. Saraiva AM, Alves e Silva MR, Correia Silva Jde F, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Human immunology*. 2013;74(2):207-14.
60. Simão F, Ferreira AP, de Carvalho EF, Parson W, Gusmão L. Defining mtDNA origins and population stratification in Rio de Janeiro. *Forensic Science International: Genetics*. 2018;34:97-104.
61. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human genetics*. 2003;112(4):387-99.
62. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clinical and molecular allergy : CMA*. 2006;4:2.

63. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(4):299-309.
64. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *TRENDS in Genetics*. 2002;18(1):19-24.
65. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature genetics*. 2001;29(2):229-32.
66. Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype-association analysis. *Advances in genetics*. 2008;60:335-405.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que pacientes fumantes e ex-fumantes homozigotos para o genótipo GG do SNP rs3819024 do gene *IL17A*, apresentaram maior chance de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 isoladamente, ou em conjunto com a periodontite como comorbidade, após análise de regressão logística múltipla, ajustada para sexo e idade. No entanto, mediante o amplo intervalo de confiança observado nessas análises, tal resultado necessita ser comprovado em uma população maior. Também, a associação dos haplótipos raros com as doenças estudadas pode ser um resultado biologicamente espúrio, pois foi obtido pela soma dos diferentes haplótipos raros, de modo que se um deles for considerado sozinho, a associação certamente será perdida.

REFERENCIAS*

1. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F et al. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 Suppl 18: S39-S51.
2. Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? *Community Dent Oral Epidemiol*. 2004; 32(4): 239-49.
3. Vieira Colombo AP, Magalhaes CB, Hartenbach FA, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016; 94: 27-34.
4. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tete S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & metabolism*. 2012; 9(1): 88.
5. Pinto G, Silva MD, Peddey M, Sillankorva S, Azeredo J. the role of bacteriophages in periodontal health and disease. *Future Microbiology*. 2016; 11: 1359-69.
6. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(10): 717-25.
7. Andriankaja OM, DeNardin E, Dunford R, Dorn J, Trevisan M. The association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Am J Epidemiol*. 2006; 163(11): S30-S.
8. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 196-205.
9. Harvey JD. periodontal Microbiology. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(2): 253-69.
10. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17038.
11. Adams DF. The American Academy of Periodontology. *J Periodontology*. 1996; 67(2): 177-9.
12. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1): i, 1-112.
13. Ammons WF, Schectman LR, Page RC. Host tissue response in chronic periodontal disease. 1. The normal periodontium and clinical manifestations of dental and periodontal disease in the marmoset. *J Periodontal Res*. 1972; 7(2): 131-43.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

14. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42 Suppl 16: S71-6.
15. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(3): 196-205.
16. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone Loss in Experimental Periodontitis. *The J Immunol*. 1998; 160(1): 403-9.
17. Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *J Clin Periodontol*. 2010; 37(2): 137-44.
18. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997; 14(1): 9-11.
19. Susin C, Vecchia CFD, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004; 75(7): 1033-41.
20. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71(11): 1699-707.
21. Candel-Martí M-E, Flichy-Fernández A-J, Alegre-Domingo T, Ata-Ali J, Peñarrocha-Diago MA. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. an update. *Medicina oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2011; 16(4): e518-21.
22. Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S et al. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse *Plos one* 2016; 11(5): e0155594.
23. Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, Lopez R Effect of smoking on periodontitis: a systematic review and meta-regression. *Am J Prev Med*. 2018; 54(6): 831-41.
24. Schipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis *J Dent Res*. 2010; 89(11): 1247-53.
25. Soder B, Jin LI, Wickholm S Granulocyte elastase, Matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non smokers with persistent periodontitis *J Clin Periodontol* 2002; 29(5): 384-91.
26. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M et.al suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Dis*. 2010; 16(8): 812-7
27. Nery C, De Moraes SRA, Novaes KA, Bezerra MA, Silveira PVDC, Lemos A. Effectiveness of resistance exercise compared to aerobic exercise without insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Braz J Phys Ther*. 2017; 21(6): 400-15.

28. Group IDA. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF diabetes atlas: estimates for the year 2013. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015; 109(3): 461-5.
29. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007; 44(1): 127-53.
30. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15(7): 539-53.
31. Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018; 101: 287-92.
32. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal Diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
33. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2017; 40(Supplement 1): S11-S24.
34. King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell S-E. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1994; 45(1): 179-88.
35. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological perspectives of diabetes. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 73(1): 181-5.
36. Taylor HG, Yeates KO, Wade SL, Drotar D, Stancin T, Burant C. Bidirectional child-family influences on outcomes of traumatic brain injury in children. *J Int Neuropsych Soc.* 2001; 7(6): 755-67.
37. Oliveira RN CS, Bastos AS, Orrico SRP, Scarel-Caminaga RM. Doença periodontal em pacientes com diabetes mellitus: influência de polimorfismos genéticos? *Rev Odontol UNESP.* 2011; 40(4): 187-94.
38. Seppälä B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(3): 161-5.
39. Papapanou PN. periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 1-36.
40. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology* 2000. 2003; 32(1): 59-81.
41. Lu HK, Yang PC. Cross-sectional analysis of different variables of patients with non-insulin dependent diabetes and their periodontal status. *The Int J Periodontics & Restorative Dent.* 2004; 24(1): 71-9.
42. Mealey BL, Oates TW, american academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006; 77(8): 1289-303.
43. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 1-36.

44. Loe H. Periodontal disease. the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993; 16(1): 329-34.
45. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 99-112.
46. Preshaw P, Alba A, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012; 55(1): 21-31.
47. Xiao LM, Yan YX, Xie CJ, Fan WH, Xuan DY, Wang CX, et al. Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a chinese population. *Oral Dis*. 2009; 15(8): 547-53.
48. Correia D, Alcoforado G, Mascarenhas P. Influência da diabetes mellitus no desenvolvimento da doença periodontal. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac* 2010; 51: 167-76
49. Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the study of health in Pomerania (SHIP). *J Periodontol*. 2008; 79(3): 501-7.
50. Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol* 2003; 74(8): 1183-90.
51. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol*. 1985; 56(3): 154-7.
52. Verardi G, Lupatini A, Beltrame J, Trentin M, Oliveira Da Silva S, De Carli J. Doença periodontal e diabete melito tipo 2. *Revista Odonto*. 2009; 17: 93-9.
53. CHAUDHARI HL, WARAD S, ASHOK N, BAROUDI K, TARAKJI B. Association of interleukin-17 polymorphism (-197G/A) in chronic and localized aggressive periodontitis. *Braz Oral Res* 2016; 30.
54. Pradeep AR, Hadge P, Chowdhry S, Patel S, Happy D. Exploring the role of Th1 cytokines: interleukin-17 and interleukin-18 in periodontal health and disease. *J Oral Science*. 2009; 51(2): 261-6.
55. Özçaka Ö, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin - 17 and interleukin - 18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011; 46(5): 592-8.
56. Jayakumar Sunandhakumari V, Sadasivan A, Koshi E, Krishna A, Alim A, Sebastian A. Effect of nonsurgical periodontal therapy on plasma levels of IL-17 in chronic periodontitis patients with well controlled type-II diabetes mellitus—a clinical study. *Dent J*. 2018; 6(2): 19.
57. Yücel ÖÖ, Berker E, Gariboğlu S, Otlı H. Interleukin-11, interleukin-1 β , interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clinical Periodontol*. 2008; 35(5): 365-70.

58. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *The J Experimental Medicine*. 1993; 177(1): 195-200.
59. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; 6(11): 1123-32.
60. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*. 2015; 43(6): 1040-51.
61. Abusleme L, Moutsopoulos N. IL-17: Overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*. 2017; 23(7): 854-65.
62. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012; 11(10): 763-76.
63. Song X, He X, Li X, Qian Y. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016; 13(4): 418-31.
64. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14: 585.
65. Moseley T, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Revi*. 2003; 14(2): 155-74.
66. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin J, Lee J, Cai L, Risser P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*. 2001; 20(19): 5332-41.
67. Witowski J, Książek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004; 61(5): 567-79.
68. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in chinese chronic periodontitis patients. *J Clinical Periodontol*. 2011; 38(6): 509-16.
69. Van Bezooijen RL, Farih-Sips HCM, Papapoulos SE, Löwik CWGM. Interleukin-17: a new bone acting cytokine in vitro. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(9): 1513-21.
70. Honda T, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Chim Acta*. 2008; 395(1-2): 137-41.
71. Okui T, Aoki Y, Ito H, Honda T, Yamazaki K. The presence of IL-17⁺/FOXP3⁺ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res*. 2012; 91(6): 574-9.
72. Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmunity*. 2012; 39(4): 294-303.
73. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin - 17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000*. 2015; 69(1): 142-59.

74. Johnson R, Wood N, Serio F. Interleukin - 11 and IL - 17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 2004; 75(1): 37-43.
75. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin - 23 and - 17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol*. 2007; 78(8): 1545-50.
76. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, García - Sesnich J, Hernandez M, Abusleme L, et al. Interleukin - 21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 2012; 83(7): 948-54.
77. Cardoso C, Garlet G, Crippa G, Rosa A, Junior W, Rossi M, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(1): 1-6.
78. Dutzan N, Konkel JE, Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol*. 2016; 9(5): 1163.
79. Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. Effect of non - surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(6): 509-16.
80. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35: 158-82.
81. Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype - association analysis. *Adv Genet*. 2008; 60: 335-405.
82. Stram DO. Multi-SNP haplotype analysis methods for association analysis. *Methods Mol Biol*. 2017; 1666: 485-504.
83. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(4): 299-309.
84. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *TRENDS Genet*. 2002; 18(1): 19-24.
85. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet*. 2001; 29(2): 229-32.
86. Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence Int. Dent Dig* 2010; 41(6): 517-25.
87. Kim YJ, Viana AC, Curtis KMC, Orrico SRP, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Lack of association of a functional polymorphism in the Interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(4): 185-90.
88. Lopez NJ, Jara L, Valenzuela CY. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *J Periodontol*. 2005; 76(2): 234-43.
89. Tervonen T, Raunio T, Knuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodont*. 2007; 34(5): 377-83.

90. Kornman KS, Crane A, Wang HY, diGiovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 72-7.
91. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822): 928-33.
92. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Frequencies of the -330 (T --> G) IL-2 and -590 (T --> C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil. *Eur Journal Immunogenet: official J of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics.* 2002; 29(4): 293-6.
93. Astolfi CM, Shinohara AL, da Silva RA, Santos MCLG, Line SRP, de Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(10): 699-703.
94. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2007; 42(1): 23-30.
95. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB, Jr., Taba Junior M, Grisi MF, Michel J, et al. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a brazilian population of african heritage'. *J Dent.* 2004; 32(3): 241-6.
96. Schafer AS, Jepsen S, Loos BG. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *J Clin Periodontol.* 2011; 38(2): 103-7.
97. Vijayalakshmi R, Geetha A, Ramakrishnan T, Emmadi P. Genetic polymorphisms in periodontal diseases: an overview. *Indian J Dent Res : Official publication of Indian Society for Dental Research.* 2010; 21(4): 568-74.
98. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 327-38.
99. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000.* 2010; 53: 138-53.
100. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(1): 30-6.
101. Correa JD, Madeira MFM, Resende RG, Correia-Silva JD, Gomez RS, de Souza DD et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and-17F genes and chronic periodontal disease. *Mediat Inflamm.* 2012; 2012: 846052.
102. Shibata T, Tahara T, Hirata I, Arisawa T. genetic polymorphism of interleukin-17A and-17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol.* 2009; 70(7): 547-51.
103. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clinical Immunol.* 2008; 28(1): 44-9.

- 104.Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one*. 2011; 6(10): e26229.
- 105.Zacarias JMV, Sippert EÂ, Tsuneto PY, Visentainer JEL, Sell AM. The influence of interleukin 17A and IL17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Mediat Inflamm*. 2015; 2015: 147056. doi: 10.1155/2015/147056.
- 106.Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. IL3 rs40401 polymorphism and interaction with smoking in risk of asthma in japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health study. *Scand J Immunol*. 2014; 79(6): 410-4.
- 107.Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G. Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39(2):175-91.
- 108.Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2): 263-5.
- 109.Wang J, Shete S. Testing departure from hardy–weinberg proportions. In: Elston RC, Satagopan JM, Su S, editors. *Statistical human genetics*: New York: Springer; 2012. p. 77-102.

APÊNDICE A -MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da Amostra

Foram convidados para participar deste estudo pacientes que procuraram atendimento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP). Também, alguns pacientes diagnosticados por seu médico como portadores de T2DM, foram encaminhados à FOAr-UNESP para tratamento e acompanhamento. Este estudo tem a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FOAr-UNESP Protocolo no 50/06 (Anexo A). Após esclarecer a natureza e os objetivos desta pesquisa, os pacientes que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, seguindo-se à realização do exame periodontal, coleta de dados e amostras biológicas.

Anamnese, Exame Físico e Periodontal

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese completa para avaliar o histórico de saúde geral e bucal, inclusive os pacientes advindos com o diagnóstico médico de T2DM. Os pacientes foram submetidos também a exame físico para avaliar: circunferência abdominal (cm), proporção cintura/quadril e peso (kg) e altura (m) para obtenção do índice de massa corporal (IMC), em m/kg^2 de cada indivíduo.

O exame periodontal foi efetuado com uma sonda periodontal (tipo Williams - Trinity® – Campo Mourão, Paraná, Brazil), e foi determinado o índice de placa visível (IPV), índice de sangramento marginal (ISM), sangramento à sondagem (SS), mensuração da profundidade de sondagem (PS), posição da margem gengival e nível de inserção clínica (NIC) examinados em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual) de cada dente, conforme detalhamento a seguir:

- Índice de placa visível: presença ou não de placa bacteriana visível a olho nu em 4 sítios , após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes;
- Índice de sangramento marginal: presença ou ausência de sangramento marginal após percorrer o espaço do sulco de uma proximal a outra, com a sonda periodontal milimetrada inclinada em 60 graus em relação ao dente;
- Posição da margem gengival: distância da margem gengival à junção cimento-esmalte;
- Mensuração da profundidade de sondagem: distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, medida com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mésio-vestibular, disto-lingual, lingual e disto-lingual;

- Sangramento à sondagem: presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem;
- Avaliação do nível clínico de inserção: corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio de cada elemento dentário.

Após o exame periodontal, os indivíduos foram classificados conforme os critérios determinados pela CDC/AAP (*Centers for Disease Control and Prevention/ American Academy of Periodontology*), tais critérios periodontais já foram utilizados em estudos de polimorfismos genéticos, incluindo estudos do tipo GWAS para Periodontite. Considerando-se as informações do exame periodontal, os pacientes foram classificados em dois diferentes grupos conforme sua condição periodontal (Tabela 1): grupo PERIODONTITIS (P=periodontite moderada e severa) e grupo HEALTHY (H=pacientes sem periodontite ou com periodontite leve).

Table 1- Periodontitis classification according to the criteria defined by the CDC / AAP

	Classification	Clinical Definition		
		Nli		PSi
HEALTHY Group	Slight and Healthy Periodontitis	Does not meet severe and moderate periodontitis requirements		
PERIODONTITIS Group	Moderate Periodontitis	≥ 2 sites with Nli ≥ 4mm	E	≥ 2 sites with PSi ≥ 5mm (different teeth)
	Severe Periodontitis	≥ 2 sites with Nli ≥ 6mm	E	≥ 2 sites with PSi ≥ 5mm (different teeth)

*Exclusion of third molar. P: periodontitis; PSi: interproximal probing depth; Nli: interproximal clinical attachment level

Fonte: Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83(12): 1449-54.

No dia da anamnese e do exame periodontal, todos os pacientes receberam um encaminhamento para comparecerem ao Laboratório de Análises Clínicas da UNESP (NAC) para coleta de sangue para realização de exames bioquímicos para avaliação do perfil glicêmico e lipídico, conforme detalhamento no item 6.1.3. Mesmo os pacientes com diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 que foram encaminhados por seus médicos à FOAr, receberam a orientação para comparecerem ao referido Laboratório para serem realizados os exames bioquímicos, sem custo para os pacientes. Desse modo, todos os exames foram realizados com

a mesma metodologia, e os resultados foram utilizados para classificar os pacientes em relação à presença do T2DM.

Apesar do diagnóstico dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 ter sido realizado pelo médico, os parâmetros glicêmicos considerados importantes na presente pesquisa foram a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada (HbA1c), que é considerada padrão-ouro para avaliar o estado de compensação metabólica do paciente. De acordo com a American Diabetes Association, foram considerados:

Pacientes com T2DM: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl e HbA1c $\geq 6,5\%$;

- Pacientes com T2DM metabolicamente descompensados: HbA1c $\geq 8\%$, o qual foi selecionado para impedir a inclusão de pacientes com descompensação metabólica transitória, e foi fundamentado em estudos prospectivos e randomizados que definem o limite de 7,1% da HbA1c como controle metabólico aceitável
- Pacientes com T2DM metabolicamente compensados: HbA1c $\leq 7,1\%$ e $\geq 6,5\%$.

Pacientes sem T2DM: glicemia de jejum ≤ 99 mg/dl e HbA1c $< 6,4\%$.

Desse modo, os pacientes (n=879) foram divididos conforme seus níveis glicêmicos e seu perfil periodontal nos seguintes grupos:

- **T2DM_P** (n=199) – Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite (moderada e/ou severa);
- **PERIODONTITIS** (n=342) – Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite moderada e/ou severa;
- **HEALTHY** (n=338) - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e sem periodontite ou com periodontite leve (Tabela 1).

Cabe ressaltar que o grupo PERIODONTITIS se caracteriza como um controle do grupo T2DM_P, enquanto que o grupo HEALTHY, caracteriza-se como controle do grupo T2DM_P e do grupo PERIODONTITIS.

Em relação ao hábito de fumar, os pacientes foram classificados de acordo com os critérios definidos por Miyake et al¹⁰⁶. (2014) como: (i) Never smokers = pacientes que nunca fumaram, ou (ii) Ever smokers = pacientes que são fumantes ou ex-fumantes¹⁰⁶

Avaliação dos Exames Bioquímicos

Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas da UNESP (NAC) para coleta de sangue por punção venosa para realização dos exames: Hemograma (ABX Micros 60), Insulina (método quimioluminescência), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), HbA_{1c} (método de imune ensaio de inibição turbidimétrica) (Kit Roche), Triglicérides (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest), Colesterol Total (método enzimático-Trinder) (Kit Labtest) e HDL-colesterol (método enzimático) (Kit Labtest), utilizando o equipamento COBAS MIRA plus.

As frações do VLDL e LDL-colesterol foram calculadas segundo a equação de Friedewald (válida se Triglicérides <400mg/dl) (Sociedade Brasileira de Cardiologia):

- *Colesterol VLDL = triglicérides / 5*
- *Colesterol LDL = Colesterol Total – (HDL + VLDL)*

Foram considerados como dislipidêmicos os pacientes com alteração em pelo menos um dos seguintes parâmetros lipídicos, de acordo com o National Cholesterol Educational Program (NCEP) Adult Treatment III (ATP III) (Cleeman et al., 2001):

- Colesterol Total (CT): Considerado alto para valores ≥ 240 mg/dl.
- LDL (Low density lipoprotein): Considerado alto para valores ≥ 160 mg/dl.
- HDL (High density lipoprotein): Considerado baixo para valores ≤ 40 mg/dl.
- Triglicérides (TG): Considerado alto para valores ≥ 200 mg/dl.

OBSERVAÇÃO: Todos os pacientes receberam cópia dos resultados dos seus exames bioquímicos. Os pacientes que não tinham sido diagnosticados com T2DM, que porventura apresentassem parâmetros suspeitos da presença de T2DM foram instruídos a buscar orientação médica. O mesmo foi feito em relação ao perfil lipídico do paciente, para que este pudesse investigar melhor a presença de dislipidemia.

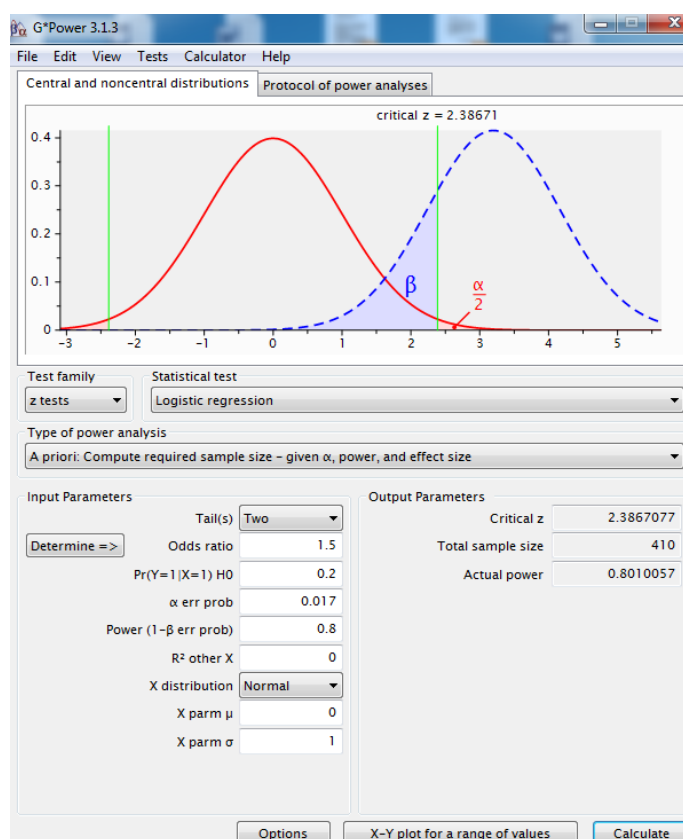
Cálculo do Número de Pacientes Para Ser Investigado Neste Estudo

Para calcular o tamanho da população necessária para que o estudo tenha poder suficiente de atestar a associação do(s) alelo(s) com a Periodontite foi utilizado o programa G*Power Calculator, versão 3.1¹⁰⁷, considerando os parâmetros: regressão logística; two tail, OR: 1.5; Pr(Y=1/X=1) H₀ = 0,2; alfa de 0,017 e poder de 80%, R² = 0, é importante salientar que o valor alfa de 0,017 foi obtido de p= 0,05 dividido por 3 (3 SNPS + 11 variáveis de ajuste

[idade, gênero e tabagismo] e 8 exames bioquímicos). Este cálculo resultou em uma amostra total de 410 pacientes (Figura 1).

Com o “Total sample size” de 410, considerando 3 grupos teríamos o valor por grupo de 136,6. Arredondando para 137 pacientes por grupo, a amostra total seria de 540 pacientes. Deste modo, como cada grupo foi maior que 180 pacientes, o nível de confiança do nosso estudo ficou maior que 80%.

Figura 1 - Resultado do G*Power utilizando os parâmetros descritos



Fonte: Elaboração própria utilizando o software G*Power

Critérios e Inclusão e Exclusão para cada grupo estudado

Referente ao grupo **T2DM P** os critérios de inclusão e exclusão foram:

- **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:** indivíduos com T2DM e Periodontite conforme os critérios anteriormente estabelecidos, acima de 30 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade bucal e sem distinção de qualquer grupo étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado).

- **CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** pacientes sem diabetes, com hepatite ou infecção por HIV, com anemia, com uso de antibióticos nos últimos 6 meses ou de medicamentos que causam hiperplasia gengival, ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, além de pacientes grávidas ou em lactação

Referente ao grupo **PERIODONTITIS** os critérios de inclusão e exclusão foram:

- **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:** indivíduos sem T2DM acima de 30 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade bucal e sem distinção de qualquer grupo étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado). Com presença de periodontite conforme os critérios estabelecidos na tabela 1.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: pacientes com diabetes, hepatite ou infecção por HIV, com uso de antibióticos nos últimos 6 meses ou de medicamentos que causam hiperplasia gengival, ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Referente ao grupo **HEALTHY** seguem os critérios de inclusão e exclusão:

- **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:** indivíduos sem T2DM acima de 30 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade bucal e sem distinção de qualquer grupo étnico-racial. Pacientes sem periodontite ou com periodontite leve;
- **CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** pacientes com diabetes, hepatite ou infecção por HIV, com uso de antibióticos nos últimos 6 meses ou de medicamentos que causam hiperplasia gengival, ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Coleta de Material Biológico e Extração de DNA

Foi solicitado a cada indivíduo que realizasse um bochecho com solução de dextrose a 3% autoclavada por 2 min. Os tubos contendo o bochecho foram mantidos resfriados (em caixa de isopor com gelo) do local da coleta até o momento do processamento em laboratório. Cada tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min para separar o *pellet* de células que se despregam da mucosa oral. A este *pellet* de células foi adicionado uma solução Tampão (TrisHCl 10mM, EDTA 0,1 M, SDS 0,5% - pH 8.0), sendo armazenado em freezer (–80°C) até a finalização das coletas de todos os indivíduos.

Para extração do DNA, como foi um grande número de amostras, e é necessária alta qualidade do DNA, foi utilizado o método do acetato de amônio a 8M. Nesta técnica as amostras foram descongeladas, adicionado 5 µL de proteinase K e incubado a 55°C por 2h. Em seguida

adicionou-se 500µL de acetato de amônio 8M e centrifugou-se a amostra a 14.000 rpm por 10 min a 25°C. Ao sobrenadante foi adicionado 540 µL de isopropanol e posteriormente centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. Foram feitas 2 lavagens do pellet obtido com etanol 70% para remover o isopropanol, e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min. O pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de tampão Tris-EDTA (TE).

O DNA genômico de cada amostra foi avaliado quanto à concentração (ng/µl) e pureza (260/280nm; 260/230nm) no aparelho *NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)*, e foi armazenado a -20°C até o momento da genotipagem. Em seguida, as amostras também foram quantificadas pelo sistema de fluorescência Qubit 2.0 (Thermo-Fisher).

Seleção e Genotipagem dos SNPs

Para a seleção dos SNPs foi utilizado o programa HAPLOVIEW¹⁰⁸ a partir de dados do banco do *International HapMap Project* (www.hapmap.org), um consórcio internacional contendo informações de milhares de polimorfismos de indivíduos de diferentes etnias. Utilizamos dados de SNPs validados nos blocos haplotípicos considerando as populações CEU+TSI (combinação de populações caucasianas: [CEU = indivíduos residentes de Utah com ascendência Europeia Ocidental e Norte] e [TSI = indivíduos da Toscana na Itália]) do Projeto HapMap. Por exemplo, verificamos nesse banco de dados a frequência do alelo mais raro (*Minimum Allele Frequency* – MAF) de cada SNP de interesse, de modo que fosse pelo menos 0,05 de preferência (equivale a 5%). Foram investigados 3 SNPs no gene *IL17A* presentes na Tabela 2, onde também é apresentada a frequência do alelo mais raro, ou MAF= (*Minimum Allele Frequency*) observada para a população CEU (Caucasoide da Europa) e TSI (região da Toscana na Itália - dados obtidos no banco de dados dbSNP), além do MAF identificado na população investigada neste estudo.

Table 2- Polymorphisms in candidate genes selected for investigation in this study

Genes relacionados à resposta Th17						
Code Assay	NCBI SNP Reference (rs)	Gene Symbol	Alleles	MAF CEU (white) %	MAF TSI (Italian) %	Study MAF
C__30123907_20	rs10484879	IL17A	G T	T T: 0.040	T T: 0.047	T T:0,036
C__15879983_10	rs2275913	IL17A	A G	A A: 0.121	A A: 0.159	A A:0,048
C__11545877_10	rs3819024	IL17A	A G	G G: 0.152	G G: 0.150	G G: 0,055

Code assay = código do ensaio para aquisição na Thermo Fisher Scientific; rs= (number that identifies each SNP); MAF= (Minimum Allele Frequency) frequência do alelo mais raro, conforme pesquisado no database dbSNP.

Fonte: Elaboração própria.

Os 3 SNPs foram investigados por meio de reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em Tempo Real com o sistema de genotipagem TaqMan® (Thermo-Fischer Scientific, Foster City, CA, EUA). Os alelos de cada SNP foram discriminados com um ensaio específico TaqMan®, que possui primers e sondas específicas para cada alelo marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, no qual, o alelo 1 é marcado com VIC e o alelo 2 é marcado com FAM. Assim, temos os resultados em VIC/VIC, VIC/FAM ou FAM/FAM. Desta forma, um indivíduo homozigoto para um alelo tem a emissão de somente um comprimento de onda (referente à sonda que se anelou no gene alvo), enquanto para um indivíduo heterozigoto há a emissão de ambos os fluoróforos das duas sondas empregadas para detecção do polimorfismo.

Esse método baseia-se na atividade 5'- endonuclease da *Taq* DNA Polimerase para clivar uma sonda anelada durante a extensão do DNA. O sinal de fluorescência é detectado quando as subunidades “*quencher*” e “*reporter*” da sonda se separam. A vantagem dos ensaios com TaqMan é a facilidade, rapidez na obtenção e confiabilidade dos resultados.

O DNA genômico de cada paciente foi acrescentado ao TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo-Fischer Scientific, Foster City, CA, EUA) em uma placa de 96 poços e esta foi inserida no termociclador StepOne Real Time PCR System (Thermo-Fischer Scientific, Foster City, CA, EUA) para realização da reação de PCR em tempo real.

Cada reação de genotipagem foi realizada com: 0,63 µl do ensaio TaqMan específico para genotipagem de cada referido SNPs (incluindo os iniciadores direto e reverso e as sondas marcadas com VIC e FAM); 6,25 µl de TaqMan® Genotyping Master Mix e 20ng de DNA genômico e água DNase /RNase free em quantidade suficiente para completar 12,5 µL finais. As seguintes condições foram empregadas para ciclagem dos SNPs: 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min.

A visualização gráfica dos resultados foi dada pelo programa StepOne System SDS Software que faz a correlação entre a fluorescência emitida com cada alelo em específico.

Análise Estatística dos Dados

As informações demográficas e clínicas foram submetidos a análise estatística descritiva e analítica pelo programa IBM SPSS Statistics 20.0 complementado com o software GraphPad Prism 6.0. A princípio os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de D'Agostino & Pearson, e em seguida, aplicados testes paramétricos ou não paramétricos para comparação entre grupos. As variáveis demográficas entre casos e controles foram comparadas pelo teste t de Student (idade e parâmetros periodontais) para variáveis contínuas, e pelo teste do χ^2 para variáveis categóricas (sexo e tabagismo). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a associação entre os parâmetros periodontais (número de dentes, placa visível, sangramento marginal, sangramento à sondagem, profundidade de bolsas periodontais e perda de inserção clínica interproximal) e genótipo individual de cada SNP independentemente.

O software PLINK¹⁰⁹ foi utilizado para o cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) que foi aplicado às frequências genotípicas dos sujeitos de cada grupo separadamente, para testar quaisquer desvios do equilíbrio genotípico esperado usando a adequação do qui-quadrado. Também foi utilizado o software PLINK para estimar as frequências alélicas e genotípicas de cada SNP em cada grupo, bem como a frequência do alelo mais raro (MAF). As diferentes variáveis independentes binárias (Grupo HEALTHY vs. Grupo PERIODONTITIS; Grupo HEALTHY vs. Grupo PERIODONTITIS SEVERA; Grupo HEALTHY vs. Grupo PERIODONTITIS MODERADA) foram usadas para determinar a associação entre cada SNP e o diagnóstico de periodontite, bem como entre cada SNP e os pacientes com T2DM_P. Todas as análises de associação genética caso-controle foram realizadas, incluindo associações alélicas (alelo 1 versus alelo 2), e as associações genotípicas utilizaram o modelo aditivo: genótipo 11 (homozigoto principal) versus 12 (heterozigoto) versus 22 (homozigoto variante).

Por meio de regressão logística múltipla ajustada para idade, sexo e tabagismo foi investigada na população total a associação entre cada SNP com a Periodontite (moderada e severa) ou T2DM (compensada ou descompensada) em comparação aos respectivos controles, estimando-se o odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%. Os polimorfismos genéticos também foram avaliados por regressão logística múltipla, realizando uma estratificação da população pelo sexo dos pacientes (e ajustando-se à idade e tabagismo), além da estratificação por tabagismo (ajustando-se ao sexo e idade). Todas as análises de regressão

logística múltipla foram realizadas pelo software STATA (Statistics / Data Analysis. Stata Corporation. College Station, Texas, EUA).

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA Comitê de Ética em Pesquisa Certificado	
	
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "DIABETES MELLITUS E DOENÇA PERIODONTAL: ANÁLISE CLÍNICA, GENÉTICA, MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E BIOQUÍMICA", sob o protocolo nº 50/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) SILVANA REGINA PEREZ ORRICO, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 04 (quatro) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.	
Certify that the research project titled "DIABETES MELLITUS AND PERIODONTAL DISEASE: CLINICAL, GENETICAL, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS", protocol number 50/06, under Dr SILVANA REGINA PEREZ ORRICO, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 04 (four)-years when the final review of this study will occur.	
Araraquara, 23 de abril de 2007. Profª Drª Mirian Aparecida Onofre Coordenadora	



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Faculdade de Odontologia

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Certificado

Certificamos que o relatório final do projeto de pesquisa intitulado *"AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E O PERFIL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 COM PERIODONTITE CRÔNICA. ESTUDO CLÍNICO, IMUNOLÓGICO E GENÉTICO"*, sob o protocolo nº **50/2006**, de responsabilidade do Pesquisador **RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA** está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 12/12/2012, publicada no DOU de 13/06/2013, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr-UNESP.

This is to certify that the final technical report of the research project entitled *"EVALUATION OF THE CORRELATION BETWEEN LIPID PEROXIDATION AND INFLAMMATORY MARKERS PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES AND CHRONIC PERIODONTITIS. A CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETIC STUDY"* protocol number **50/2006**, under **RAQUEL MANTUANELLI SCAREL CAMINAGA** responsibility, is according with the Resolution 466/12 of National Health Council/Ministry of Health of December 12th of 2012, published on DOU in June 13th of 2013. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP.

Araraquara, 05 de dezembro de 2019.

Profª Dra. Andréa Gonçalves
Profª Dra. Andréa Gonçalves
Coordenadora



www.foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de ... (até 2 anos após a data de defesa)

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 10 de abril de 2020

Marco Antonio Rimachi Hidalgo