



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



Arles Naisa Amaral Silva

**Polimorfismos em genes marcadores do Diabetes mellitus tipo 2 estariam
associados à Periodontite?**

Araraquara

2022



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



Arles Naisa Amaral Silva

Polimorfismos em genes marcadores do Diabetes mellitus tipo 2 estariam associados à Periodontite?

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

Araraquara

2022

S586p	Silva, Arles Naisa Amaral Polimorfismos em genes marcadores do Diabetes mellitus tipo 2 estariam associados à Periodontite? / Arles Naisa Amaral Silva. -- Araraquara, 2022 61 f. : tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga 1. Polimorfismo Genético. 2. Diabetes mellitus. 3. Periodontite. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Arles Naisa Amaral Silva

Polimorfismos em genes marcadores do Diabetes mellitus tipo 2 estariam associados à Periodontite?

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

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

2º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

3º Examinador: Profa.Dra. Belen Retamal-Valdes.

4º Examinador: Profa.Dra. Gisele Faria

5º Examinador: Profa.Dra. Suzane Cristina Pigossi

Araraquara, 24 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Arles Naisa Amaral Silva

NASCIMENTO: 21/09/1996 – Paramirim – Bahia

FILIAÇÃO: Milton Agenor Silva e Elza Guedes do Amaral Silva

2015-2019: Curso de Graduação em Odontologia, pela Universidade UNIVERITAS UNG (UNIVERITAS - UNG), com bolsa integral do Programa Federal Universidade para Todos (ProUni).

2018-2019: Iniciação científica na área de concentração em Dentística, com o projeto intitulado: Influência da umidade no grau de conversão e resistência adesiva de diferentes sistemas adesivos, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2018/0685-0, orientado pelo Prof.Dr. Dimorvan Bordin.

2018-2019: Iniciação Científica voluntária na área de concentração em Periodontia, com a revisão sistemática intitulada: "Are there specific differences in the composition of the microbiota that colonizes the periodontal pocket and the other oral surfaces of subjects with periodontitis? A systematic review", orientada pela Profa. Dra. Magda Feres e coorientação da Profa.Dra. Belen Retamal-Valdes.

2019 – 2020: Três premiações em 1 lugar em congressos nacionais:

1º Lugar na XIX Jornada Odontológica da Universidade Guarulhos-UNIVERITAS com o trabalho intitulado: Influência da umidade no grau de conversão e resistência adesiva de diferentes sistemas adesivos, Universidade Guarulhos – UNIVERITAS.

1º Lugar na modalidade Profissional e Pós-Graduando com o trabalho científico: ANÁLISE DA DOR PÓS-OPERATÓRIA DE RETRATAMENTO ENDODÔNTICO DE SESSÃO ÚNICA VERSUS SESSÕES MÚLTIPLAS: REVISÃO SISTEMÁTICA, Universidade de Mogi das Cruzes.

1º Lugar na categoria pesquisa científica com o trabalho intitulado: Tratamentos de superfície para reparo de resina bulkfill com convencional. Centro Universitário UniRuy.

2020 – 2022 - Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de concentração em Periodontia – Nível Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A Deus, que me guiou em todos os momentos, mostrando os melhores caminhos e sempre me abençoando.

Aos meus queridos e amados pais, Elza Guedes do Amaral Silva e Milton Agenor Silva, muito obrigada pelo amor incondicional, paciência, educação, carinho, amizade e por tudo que proporcionaram para o meu aprendizado, muitas vezes deixando seus sonhos de lado para possibilitar a realização dos meus. Vocês dois são exemplos de honestidade, trabalho e amor. Alicerces da minha vida!

Aos meus irmãos e amigos, Érica, Mateus, Marcos e Tábata, obrigada simplesmente por tudo. Minhas grandes inspirações.

Ao meu sobrinho e afilhado, João Roberto, obrigada pela felicidade que trouxe em minha vida. Você me motiva a crescer cada vez mais.

A minha amada tia Edileusa Costa Silva, por todo o suporte fornecido desde o início da minha vida acadêmica em São Paulo. Minha eterna gratidão!

À toda a minha família, meu muito obrigada.

Agradeço especialmente,

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na presença de seu Reitor, Professor Doutor Pascoal Barretti.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri, pela dedicação, competência e empenho em todas as atividades.

À minha orientadora, Professora Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, grande exemplo de Pesquisadora. Eu sou infinitamente grata por todas as oportunidades que tem me proporcionado durante esses últimos anos, principalmente pela oportunidade de aprender e crescer ao seu lado. Obrigada por todo o carinho e atenção que sempre me tratou, principalmente pela preocupação em meu bem-estar nestes anos atípicos de pandemia. A senhora é um grande exemplo a ser seguido! Obrigada por tudo!

Ao Professor Dr. Dimorvan Bordin, obrigada por ter sempre me incentivado a estudar, pela oportunidade do primeiro contato com a pesquisa, pelos conselhos, preocupações e ensinamentos. Muito obrigada por ter acreditado em mim e nos meus sonhos de crescer. Meu eterno orientador!

À Professora Dra. Bélen Retamal Valdés, exemplo de mestre e pesquisadora. Cada momento ao seu lado é enriquecedor ao meu conhecimento. Obrigada por toda a confiança sempre depositada e pela torcida em minhas conquistas. Minha grande referência!

À Professora Dra. Magda Feres, exemplo de extrema competência e humildade. Muito obrigada por todas as oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Jamil Shibli, por toda ajuda e ensinamentos. Exemplo de Professor e Pesquisador!

A todos os meus familiares, amigos e colegas pela torcida pelo meu crescimento profissional e por todo o carinho. Esse momento é nosso!

Agradeço a todos aqueles que torceram por mim, cada um de vocês ocupa um lugar especial em minha memória e no meu coração.

Agradeço,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, pelo apoio para a realização do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq (Processo nº 445336/2014-5 e 304570/2017-6), pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Aos Professores, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, Profa. Dra Estela Sasso Cerri, Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio, Profa.Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e a Profa. Dra. Daniela Leal Zandim, que colaboraram com a minha formação.

A todos os funcionários da Disciplina de Periodontia, cujo trabalho e dedicação possibilitou a realização desse trabalho.

Aos funcionários do Setor de Pós-Graduação José Alexandre, Cristiano Lamounier e Leticia Sorrechia, pelo excelente trabalho que desempenham em suas atividades.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Ana Cristina Jorge, pela atenção e excelente revisão bibliográfica.

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

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”.
(Antoine de Saint Exupéry)*

"Eu asseguro que, se vocês tiverem fé e não duvidarem, poderão fazer não somente o que foi feito à figueira, mas também dizer a este monte: 'Levante-se e atire-se no mar', e assim será feito. E tudo o que pedirem em oração, se crerem, vocês receberão".
(Mateus 21:21-22)**

* Saint-Exupéry A. O pequeno príncipe. Rio de Janeiro: Editora Bibliomundi, 2022.

** Bíblia Sagrada. Barueri: Sociedade Bíblica do Brasil, 2018.

Silva ANA. Polimorfismos em genes marcadores do Diabetes mellitus tipo 2 estariam associados à Periodontite? [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A busca em compreender melhor as inter-relações entre a Periodontite (P) e Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) por variantes genéticas associadas a suscetibilidade de ambas doenças, é de grande interesse da comunidade científica em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi investigar polimorfismos em genes considerados biomarcadores moleculares do DM2, para avaliar se estão associados à P. Tais polimorfismos também foram investigados se estão relacionados com parâmetros periodontais, perfil glicêmico e lipídico do paciente. Considerando o cálculo amostral, foram investigados: pacientes com DM2 e Periodontite severa ou moderada (Grupo P+DM2 n=206); pacientes sem DM2 com periodontite severa ou moderada (Grupo Periodontitis, n=346); e pacientes sem DM2 e sem periodontite, ou seja, sistemicamente e periodontalmente saudáveis (Grupo Healthy, n= 345). Após o exame periodontal completo, aos participantes deste estudo foi oferecida a realização de exames bioquímicos (perfil glicêmico e lipídico). Células da mucosa bucal de cada paciente foram obtidas para extração do DNA pelo método de *salting-out*. Foram investigados três polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes *AGER* (Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor), *RBMS1* (RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1) e *VEGFA* (Vascular Endothelial Growth Factor A), por meio do sistema de genotipagem *TaqMan* utilizando PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. Os dados periodontais e genéticos foram comparados entre os grupos, realizando análises de regressão logística múltipla ajustada para idade, sexo e tabagismo. Regressões lineares múltiplas foram realizadas para investigação da associação das variantes genéticas com os parâmetros glicêmicos, lipídicos e periodontais. Como principais resultados, foi observado que pacientes com genótipo T/T para o SNP rs7593730 (gene *RBMS1*), no modelo recessivo na comparação do grupo Healthy versus Periodontitis, apresentou suscetibilidade duas vezes maior à Periodontite (OR = 2.29; IC 95% = 1.04 – 5.01; p = 0.033). Verificou-se para os polimorfismos nos genes *AGER* e *VEGFA*, que pacientes que nunca fumaram e são portadores do genótipo CC para *AGER*-rs184003 e *VEGFA*-rs9472138 apresentaram, respectivamente, 51% e 46% menor suscetibilidade de desenvolver Periodontite. Os portadores de *AGER*-rs184003-AA apresentaram menor número de dentes remanescentes na cavidade oral. Em relação ao gene *VEGFA*-rs9472138, os portadores do genótipo TT demonstraram menor porcentagem de sítios com características de doença periodontal ativa (sangramento à sondagem e nível de inserção clínica = 4-5mm). Conclui-se que na população estudada, importantes variantes genéticas consideradas marcadoras para DM2, como rs7593730 (gene *RBMS1*), rs184003 (gene *AGER*) e rs9472138 (gene *VEGFA*) foram associados à P isoladamente ou conjuntamente ao DM2.

Palavras chave: Polimorfismo Genético. Diabetes mellitus. Periodontite.

Silva ANA. Could polymorphisms in type 2 Diabetes mellitus marker genes be associated with Periodontitis? [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The search to better understand the interrelationships between Periodontitis (P) and Diabetes mellitus type 2 (T2DM) by genetic variants associated with the susceptibility of both diseases is of great interest to the scientific community worldwide. The aim of this study was to investigate polymorphisms in genes considered molecular biomarkers of T2DM, to assess whether they are associated with P. Such polymorphisms will also be investigated if they are related to periodontal parameters, glycemic and lipid profile of the patient. Considering the sample size calculation, the following were investigated: patients with T2DM and severe or moderate periodontitis (Group P+T2DM n=206); patients without T2DM with severe or moderate periodontitis (Periodontitis Group, n=346); and patients without T2DM and without periodontitis, that is, systemically and periodontally healthy (Healthy Group, n=345). After the complete periodontal examination, all participants in this study had biochemical tests (glycemic and lipid profile). Cells from the oral mucosa of each patient were obtained for DNA extraction using the salting-out method. Three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *AGER* (*Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor*), *RBMS1* (*RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1*) and *VEGFA* (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) genes were investigated through the TaqMan genotyping system using real-time PCR (Polymerase Chain Reaction). Periodontal and genetic data were compared between groups, performing multiple logistic regression analyzes adjusted for age, sex and smoking status. Multiple linear regressions were performed to investigate the association of genetic variants with glycemic, lipid and periodontal parameters. As main results, it was observed that patients with T/T genotype for SNP rs7593730 (*RBMS1* gene), in the recessive model, when comparing the Healthy versus Periodontitis group, presented twice as much susceptibility to Periodontitis (OR = 2.29; 95% CI = 1.04 – 5.01; p = 0.033). For the polymorphisms in the *AGER* and *VEGFA* genes, patients who had never smoked and are carriers of the CC genotype for *AGER*-rs184003 and *VEGFA*-rs9472138 had, respectively, 51% and 46% lower susceptibility to developing Periodontitis. *AGER*-rs184003-AA carriers had a smaller number of remaining teeth in the mouth. Regarding the *VEGFA*-rs9472138 gene, carriers of the TT genotype showed a lower percentage of areas with characteristics of active periodontal disease (bleeding on probing and Clinical Attachment Loss = 4-5mm). It is concluded that, in the studied population, important genetic variants considered markers for T2DM, such as rs7593730 (*RBMS1* gene), rs184003 (*AGER* gene) and rs9472138 (*VEGFA* gene), were associated with P alone or together with T2DM.

Keywords: Polymorphisms, Genetic. Diabetes mellitus. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Diabetes mellitus Tipo 2 (DM2)	11
1.2 Periodontite	12
1.3 Inter-Relação Entre DM2 e Periodontite	13
1.4 Polimorfismos Genéticos.....	14
2 PROPOSIÇÃO	18
3 PUBLICAÇÃO	19
3.1 Artigo.....	19
4 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE A - MATERIAL E MÉTODOS	51
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ De ÉTICA.....	61

1 INTRODUÇÃO

Esta introdução foi dividida em seções abordando o Diabetes mellitus tipo 2, Periodontite, Inter-relação das doenças e Polimorfismos Genéticos.

1.1 Diabetes mellitus Tipo 2 (DM2)

Diabetes mellitus (DM) é um conjunto de desordens metabólicas crônica, de caráter multifatorial, em que o desencadeamento ocorre pela influência de fatores genéticos, ambientais e/ou comportamentais¹. A principal evidência clínica para o diagnóstico é a presença da hiperglicemia, resultado da disfunção das células beta pancreáticas (β) (responsáveis pela produção da insulina) ou pela ação da própria insulina, bem como na combinação de ambas situações². Com base na etiologia apresentada, o DM é classificado em tipo 1, tipo 2, gestacional e também relacionado a outras causas; por exemplo induzido por produtos químicos ou pelo uso de medicamentos, como glicocorticoides³. O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é o mais comum na população, perfazendo aproximadamente 90-95% dos casos de DM⁴. De acordo com a American Diabetes Association (ADA), o DM2 ocorre devido à perda progressiva da secreção de insulina das células β pancreáticas, e regularmente associada a resistência à insulina³.

O número de casos crescentes de DM2 estão ligados, além da influência do fator genético que age parcialmente na suscetibilidade do distúrbio glicêmico⁵,⁶, como o estilo de vida sedentário, dieta não saudável, sobrepeso, falta de atividade física, hábito de fumar e consumo de álcool sem moderação. Estes são considerados os principais motivadores da prevalência de DM2 em todo o mundo^{7, 8}.

O DM trata-se de um problema de saúde pública mundial, sendo que sua prevalência aumenta em todo o mundo, estimando-se que mais de 693 milhões de indivíduos sejam afetados até 2045^{2, 8}. DM está interligado com algumas comorbidades (Câncer, Periodontite, Depressão, Fraturas Ósseas)⁹, sendo bem estabelecido que a Periodontite (P) é a sexta maior complicação associada ao DM¹⁰.

Estudar os mecanismos patológicos e os métodos disponíveis para a prevenção e tratamento de DM2 é de grande relevância¹¹. DM2 é um distúrbio

metabólico complexo com forte componente genético que contribui para sua patogênese¹².

1.2 Periodontite (P)

A Periodontite (P) caracteriza-se como uma doença crônica imuno-inflamatória, de caráter multifatorial e poligênica. É associada a um biofilme em disbiose¹³, o qual se exhibe estruturalmente complexo e organizado¹⁴. Embora o desequilíbrio bacteriano seja o principal fator etiológico da P, ela conta com uma etiopatogenia complexa, natureza poligênica e também está relacionada a influência ambiental (fumo, dieta alimentar, estresse, etc), determinando assim na resposta do hospedeiro a suscetibilidade à doença¹⁵.

A P causa a migração do epitélio juncional, levando consequentemente a destruição dos tecidos de sustentação do dente (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal). É diagnosticada pela perda de inserção periodontal junto ao sangramento à sondagem, reabsorção óssea alveolar e até a perda dentária^{13, 16}. Além disso, ocorre o processo de desregulação imunológica¹⁵.

De acordo com a nova classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantes do Workshop Internacional de 2017, a P não é mais categorizada em periodontite crônica ou agressiva, mas somente em Periodontite. Atualmente, é classificada com base no estágio/estadiamento (I a IV) e no grau (A, B e C). Nesse sentido, avalia-se a severidade, complexidade, extensão e distribuição da doença (localizada, generalizada e perfil incisivo/molar), e em graus, a taxa de progressão (lenta, moderada ou rápida), em que leva muito em conta o histórico de perda óssea do paciente, suas características biológicas, saúde geral do paciente e fatores modificadores do grau como, por exemplo, diabetes ou tabagismo, reconhecidos e amplamente verificados na literatura científica como fatores de risco da P¹⁷.

É interessante notar que fatores genéticos, ambientais e comportamentais e a disbiose bacteriana ligados a P, levam a variações individuais no desenvolvimento da patogênese, taxa de progressão e na resposta do hospedeiro ao tratamento. O prognóstico de dentes acometidos periodontalmente torna-se um desafio devido a sua etiologia multifatorial e complexa^{18,19}. Por isso, protocolos de manutenção

personalizados/individualizados são propostos e devem ser estabelecidos durante o tratamento periodontal²⁰.

A P assim como o DM2, trata-se de um problema de saúde pública mundial, devido a sua alta prevalência na população e as consequências que decorrem da doença como à perda dentária, que afeta negativamente a função mastigatória e a estética, motivando a desigualdade social e prejudicando a qualidade de vida do indivíduo. Assim, a P é tida como umas das responsáveis pela proporção de casos de edentulismo e disfunção mastigatória, as quais impactam em custos significativos e além do impacto negativo na saúde geral¹⁷.

1.3 Inter-Relação Entre DM2 e Periodontite

Tem sido cada vez mais frequente encontrar pacientes afetados concomitantemente pela DM2 e P. Conforme revisado por Masumoto et al. (2019), uma série de estudos de medicina periodontal sugere uma associação entre doença periodontal e doenças sistêmicas²⁰, incluindo DM²¹. Foi detectado maior extensão e severidade da P em indivíduos portadores de DM²¹.

Estudos confirmam a relação bidirecional já bem definida do DM2 com a P, em que ambas condições resultam de características patológicas subjacentes comuns, resultando em uma forte associação entre si. Desta forma, o controle ou desequilíbrio de uma doença influencia também sobre a outra^{13,22}, como exemplo o controle glicêmico¹³. Conforme revisado por Preshaw and Bisset (2019), indivíduos portadores de DM são mais propensos de desenvolverem P com aumento de duas a três vezes, do que naqueles não diabéticos. Ainda neste mesmo estudo, os indivíduos com DM2 e P, apresentaram maiores níveis de Hemoglobina Glicada (HbA1c) e piores complicações do DM, mas o tratamento periodontal resultou em um melhor controle glicêmico e reduções dos níveis de HbA1c nos indivíduos com DM²³.

O efeito da P no DM2 é correlacionado pela entrada de patógenos nos tecidos periodontais do hospedeiro ou ainda pelo processo de degradação de seus produtos sistemicamente. Assim, a ativação de uma intensa resposta inflamatória sistêmica promovida pelos periodontopatógenos subgengivais leva a uma fase aguda de explosão proteica e elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios na circulação sistêmica, os quais agem facilitando a resistência à insulina^{24,25}. O processo de desregulação metabólica no DM, resultante da

exposição prolongada à hiperglicemia crônica pode ocasionar a glicação de proteínas e lipídios, denominados de produtos finais de glicação avançada (AGEs). É importante destacar que a P sofre influência da resposta inflamatória monocítica exagerada induzida pelo acúmulo de AGEs, evidenciado pela destruição dos tecidos periodontais e ainda pela secreção exagerada de mediadores locais e sistêmicos, levando a uma P com estado periodontal mais severo²⁶.

Outra associação da P influenciando no DM2 foi visto em uma meta-análise, onde indivíduos periodontalmente comprometidos aumentaram o risco de microangiopatia diabética em indivíduos com DM2, com destaque para a retinopatia diabética e nefropatia diabética²⁷.

A DM2 e a P são doenças caracterizadas como poligênicas²⁸, devido a contribuição de muitos genes para uma determinada característica, ao contrário das doenças mendelianas. Estudos de varredura ampla do genoma, ou seja, *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) tem sido realizados para identificação de variantes genéticas associadas a diferentes doenças, incluindo DM2 e P, isoladamente²⁹.

1.4 Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos genéticos são variações comuns em uma determinada população, no qual o alelo mais raro ocorre com uma frequência maior que 1% ([MAF, Minor Allele Frequency]> 1%)²⁹. Dentre os tipos de polimorfismos, destaca-se o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), em que há a alteração de uma única base, seja em sua substituição ou exclusão³⁰, com localização em uma região particular e específica do genoma³¹.

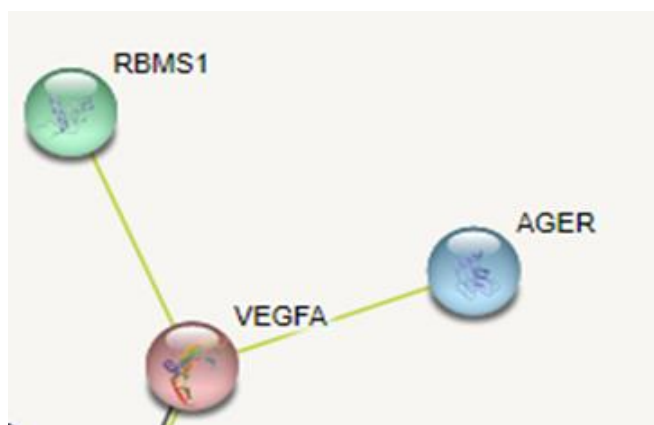
Há estudos em concordância com grupos europeus e americanos, que demonstraram que polimorfismos em genes candidatos relacionados ao sistema imune foram associados à maior chance de desenvolver a P³²⁻³⁴. Como mencionado no subitem anterior, há estudos de GWAS que demonstraram forte evidência da predisposição ou suscetibilidade genética isoladamente à Periodontite Crônica³⁵⁻³⁷ bem como ao DM2^{38,39}.

Assim, é plausível supor que haja uma combinação de fatores genéticos que favoreçam o desenvolvimento de ambas doenças. Genes que atuam no desenvolvimento de diferentes doenças são chamados “pleiotrópicos”, e a

comunidade científica tem buscado identificar se existe compartilhamento de genes que contribuam simultaneamente para a ocorrência de diferentes doenças. Schaefer et al. (2009)⁴⁰ identificaram o *ANRIL* (*CDKN2B antisense RNA 1*) como o primeiro fator de risco genético compartilhado de doença arterial coronariana e periodontite agressiva⁴¹. Essa associação foi posteriormente replicada em várias populações independentes com periodontite agressiva e periodontite crônica de ascendência alemã e holandesa⁴², em uma população alemã e irlandesa do norte⁴³, e em uma população turca⁴⁴.

Os SNPs rs184003 no gene *AGER*, rs7593730 próximo ao gene *RBMS1* e rs9472138 no gene *VEGFA* foram identificados como marcadores da DM2⁴⁵⁻⁴⁷. Considerando as características funcionais de cada gene e as evidências da literatura como sendo marcadores importantes do DM2, utilizamos a ferramenta de pesquisa (<https://string-db.org/cgi/network>) para verificar se há interação entre as proteínas codificadas por esses genes. A Figura 1 a seguir mostra que há interação entre as referidas proteínas, reforçando a hipótese que conjuntamente possam estar associadas não somente com o DM2, mas também com P.

Figura 1 - Interação entre as proteínas codificadas pelos genes *AGER*, *RBMS1* e *VEGFA*



Fonte: Elaboração própria utilizando a ferramenta disponível em: <https://string-db.org/cgi/network>.

O gene *AGER* (*Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor*) (OMIM 600214) apresenta polimorfismos que podem ser responsáveis ou co-responsáveis pelo desenvolvimento de doenças^{48,49}. Este gene foi identificado

em 1994, tendo sua localização no braço curto do cromossomo 6: 6p21.3. Este locus está ligado a respostas imunológicas e inflamatórias, sendo também considerado o locus principal do complexo de histocompatibilidade III^{49,50}. O gene *AGER* foi associado à inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial que ocorre na DM2⁵¹. O gene *AGER* é responsável pela codificação do *RAGE* (*Receptor for Advanced Glycation End-products*), que é um receptor de superfície celular pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Sendo um receptor multiligante, liga-se principalmente produtos finais (proteínas ou lipídios) de glicação avançada (AGE). A interação entre RAGE e seus ligantes induz algumas vias de sinalização incluindo vias pró-inflamatórias, estando implicado na suscetibilidade de muitas doenças⁵².

Foi verificada a associação do SNP rs184003 do gene *AGER* com a suscetibilidade à P⁴⁵, DM⁴⁹, Câncer de mama⁵³, Doença das artérias coronárias⁵⁴. O SNP rs184003 do gene *AGER* também foi associado com o índice HOMA-IR em pacientes com DM2⁵¹.

O polimorfismo rs7593730 próximo ao gene *RBMS1* é localizado no cromossomo 2q24.2⁴⁷. O gene *RBMS1* (*RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1*), tem como função a codificação de uma pequena família de proteínas que se ligam ao DNA/ RNA^{55,56}. O *RBMS1* está envolvido também na replicação de DNA, transcrição gênica, apoptose (morte celular programada) e progresso do ciclo celular ao interagir com a proteína c-Myc⁵⁵. É um gene bastante investigado e associado a alguns tipos de câncer, como carcinoma de próstata⁵⁷ e câncer gástrico⁵⁸.

O gene *RBMS1* é expresso em tecidos de importância biológica para a DM2 como músculo, coração, tecido adiposo e fígado^{47,59}. Estudos corroboram a associação do SNP rs7593730 no gene *RBMS1* com a suscetibilidade ao DM2^{47,55,59}. Não há na literatura qualquer estudo investigando o SNP rs7593730 no gene *RBMS1* em relação à P. O gene *RBMS1* foi verificado como responsivo à inflamação⁶⁰, como exemplificado por doenças crônicas inflamatórias como Psoríase⁶¹ e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica⁶².

O gene *VEGFA* (*Vascular Endothelial Growth Factor A*), localizado no cromossomo 6, codifica a proteína VEGFA⁶³. O SNP rs9472138 no gene *VEGFA* é associado com a suscetibilidade ao DM2 em diferentes populações, como na população Chinesa Han¹² e na população do Cazaquistão⁶⁴.

Considerando a característica poligênica do DM2 e P, e do papel pleiotrópico que alguns genes podem ter, nossa hipótese é que muitos genes e suas variantes ainda merecem ser investigadas pois podem ser biomarcadores moleculares do DM2, em conjunto à P.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar polimorfismos em genes pré-determinados na literatura científica como marcadores moleculares do Diabetes mellitus tipo 2, para avaliar se estes estão também associados com a Periodontite. Tais polimorfismos também foram investigados se estão relacionados com parâmetros periodontais, perfil glicêmico e lipídico 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*

Polymorphisms in biomarkers of type 2 Diabetes mellitus could be also markers of Periodontitis susceptibility?

Arles Naisa Amaral Silva ^{1,2*}, Ingra Gagno Nicchio ^{1,2*}, Bárbara Roque da Silva ^{1,2}, Maurício Gandini Giani Martelli ^{1,2}, Marco A. Rimachi Hidalgo ^{1,2}, Rafael Nepomuceno ^{1,2}, Thamiris Cirelli ^{1,5}, Letícia H Theodoro ³, Joni A Cirelli ¹, Silvana R P Orrico ^{1,4}, Silvana P Barros ⁵, Raquel M Scarel-Caminaga ²

*These authors share the first authorship

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

Correspondence:

Raquel Mantuanelli 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

Conflicts of interest and sources of funding

*Artigo em fase de avaliação para posterior submissão.

The authors state explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article. This study was supported by the Foundation for Research Support of the State of São Paulo – FAPESP, Grants 2014/13295-1, 2016/03753-8, 2016/08070-6 and 2016/18313-3; and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Grants 445336/2014-5, 304570/2017-6 and 306073/2020-0.

Abstract

Background: There is a strong interest of the scientific community to understand interrelationships between Periodontitis (P) and systemic conditions such as Type 2 Diabetes mellitus (T2DM). This study aimed to investigate polymorphisms in genes considered as molecular biomarkers of T2DM, to assess whether they are associated with P, also relating them to the periodontal status, glycemic and lipid profile of the patient.

Material and Methods: We investigated patients with T2DM also affected by Periodontitis (P+T2DM group, n = 206), patients affected by only P (Periodontitis group, n = 346) and patients without any T2DM or P (Healthy group, n = 345). The patients underwent complete periodontal examination and biochemical evaluation. DNA from buccal cells of each patient was utilized for investigating three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *AGER*, *RBSM1* and *VEGFA* genes. Periodontal and genetic results were analyzed among groups by multiple logistic regression analysis, adjusting for covariates and also considering stratifications by sex and smoking habits. Multiple linear regressions were performed to investigate the association of genetic variants with glycemic, lipid and periodontal parameters.

Results: Patients with TT genotype for the SNP rs7593730 (*RBMS1* gene), in the recessive model comparing the Healthy vs Periodontitis group, were twice as susceptible to Periodontitis (OR = 2.29; 95% CI = 1.04 – 5.01; P value = 0.033). Regarding polymorphisms in the *AGER* and *VEGFA* genes, it was found that patients who had never smoked, carriers of the CC genotype for *AGER*-rs184003 and *VEGFA*-rs9472138 had, respectively, 51% and 46% less susceptibility of developing Periodontitis. *AGER*-rs184003-CA carriers had a higher percentage of sites with visible plaque and *AGER*-rs184003-AA carriers had a lower number of remaining teeth in the mouth. Regarding the *VEGFA*-rs9472138 gene, carriers of the TT genotype showed a lower percentage of sites with characteristics of active periodontal disease (bleeding on probing and CAL = 4-5mm).

Conclusions: It is concluded that in the studied population important genetic variants considered markers for T2DM, such as rs7593730 (*RBMS1* gene), rs184003 (*AGER* gene) and rs9472138 (*VEGFA* gene) were associated with isolated Periodontitis or Periodontitis together with T2DM.

Keywords: Polymorphisms, Genetic, Diabetes mellitus, Periodontitis, Biomarker, GWAS.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a worldwide rapidly growing chronic metabolic syndrome¹, involving carbohydrates, lipids and proteins^{2,3}. The development of DM is motivated by genetic predisposition, physical and social environments and/or behavioral factors⁴, being classified as Type 1, Type 2, Gestational and also related to other causes, for example, the use of drugs or induced by chemicals, such as the use of glucocorticoids⁵. Diabetes mellitus Type 2 (T2DM) occurs in more than 90% of DM cases⁶, and its increasing occurrence is largely attributed to changes in lifestyle factors such as smoking⁷⁻⁹, obesogenic environments, aging and growing and rapid urbanization^{10,11}. T2DM is a metabolic disorder characterized by insulin resistance or deficiency, or both^{9,12}. DM is strongly associated with Periodontitis, and it is well established as the sixth major complication associated with DM^{13,14}.

Periodontitis (P) is a multifactorial chronic inflammatory disease. The etiological factor of P is the dental biofilm in dysbiosis¹⁵. It is characterized by the progressive destruction of the dental support apparatus (periodontal ligament, cementum and alveolar bone), which can lead to tooth loss¹⁶. The main clinical characteristics of P are: periodontal attachment loss presented by radiographically assessed bone loss, presence of periodontal pockets and gingival bleeding. According to the 2017 International Workshop Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions new classification, P is classified into a single category, i.e. the terms chronic and/or aggressive are no longer used, only P being characterized based on its stage (I to IV), and in degrees (A, B or C)¹⁶.

Studies have confirmed the well-defined bidirectional relationship of P with DM2, in which both conditions result from common underlying pathological features, resulting in a strong association with each other. In this way, the control or imbalance of one disease also influences the other^{17,18}. As reviewed by Preshaw & Bisset (2019)¹⁹, individuals with DM are more likely to develop periodontitis with a two- to three-fold increase than those without diabetes. Also in this same study, individuals with T2DM and P, had higher levels of glycated hemoglobin (HbA1c) and worse complications of DM, and periodontal treatment resulted in better glycemic control and reductions in HbA1c levels in individuals with DM.

DM2 and P are diseases characterized as polygenic²⁰, as they present the contribution of many genes to a particular trait, unlike Mendelian diseases. In the meantime, Genome-Wide Association Studies (GWAS) studies seek to identify genetic polymorphisms associated with diseases. Genetic polymorphisms are common variations in a given population, in which the rarest allele occurs at a frequency greater than 1% ([MAF]> 1%)²¹. Among the types of polymorphisms, the single nucleotide polymorphism (SNP) stands out, in which there is an alteration of a single base, either in its replacement or exclusion²².

Through Genome-Wide Association studies (GWAS), at least 24 genetic susceptibility loci have been reported for T2DM, including the rs9472138 SNP in the *VEGFA* gene and the rs7593730 SNP²³. The rs9472138 SNP in the *VEGFA* gene was also reviewed by Sanghera et al (2012)²⁴, and the rs7593730 SNP, located at 2q24 near the *RBMS1* gene²⁵ was reviewed by Shu et al (2010)²⁶ and Sanghera et al (2012)²⁴. The SNP rs184003 in the *AGER* gene was associated with susceptibility to P²⁷, as well to DM²⁸, and was associated with the HOMA-IR index in T2DM patients²⁹.

Considering the polygenic characteristic of T2DM and P, and the pleiotropic role that some genes may have, there are many genes which should be investigated. Therefore, this study aimed to investigate polymorphisms in genes considered as molecular biomarkers of T2DM, to assess whether they are associated with P, also relating them to the periodontal status, glycemic and lipid profile of the patient.

Materials and Methods

Patient's Selection

The study was approved by the Ethics in Human Research Committee of the School of Dentistry at Araraquara (UNESP – São Paulo State University, Araraquara, Brazil; Protocol number 50/06). The patients were recruited at the Periodontics Clinic of the same Institution. All volunteers were informed about the aims and methods of this study, and they provided their written consent to participate.

Basic inclusion criteria were patient's at minimum age of 30 years old who had at least 15 natural teeth. Patients were excluded based on the following criteria: history of antibiotic therapy in the previous 3 months and/or nonsteroidal

anti-inflammatory drug therapy in the previous 6 months and pregnancy or use of contraceptives or any other hormone. All patients answered a structured questionnaire about demographic characteristics, personal and family medical history, and use of medications. The patients underwent a physical examination to assess waist circumference (cm), waist/hip ratio, body weight (kg), and height (m) to derive the body mass index (BMI) in kg/m^2 .

Periodontal clinical examination profiles

The periodontal examination was performed assessing the following clinical signs and parameters 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. The presence of visible plaque and marginal bleeding³⁰, as well as bleeding on probing (BOP) were recorded as a percentage of the total number of interproximal sites assessed. Interproximal BOP (BOPi) was checked by the presence or absence of bleeding, 30 seconds after measuring the probing depth³¹. All fully erupted teeth, except the third molars and teeth with extensive destruction of the clinical crown, were examined.

The patients were diagnosed with their periodontal condition as periodontally healthy or mild periodontitis, or affected by periodontitis (moderate-severe)^{32, 33}. Such criteria have already been used in genetic studies^{34,35}.

A history of smoking was defined according to Miyake et al. (2014) as follows: (i) never smoked or (ii) ever smoked (including patients who are current smokers and former smokers)³⁶.

The needed sample size was calculated by the G* Power Calculator, version 3.1.9.4³⁷ software, as detailed in the Supplementary material.

Biochemical evaluation of glycemic and lipid profiles

All blood samples were collected in the same Clinical Analysis Laboratory (Community Service Center – UNESP) after at least 8 hours of overnight fasting, to evaluate insulin levels by the chemiluminescence method (U/L), blood count (ABX Micros 60), fasting plasma glucose (mg/dL) by modified Bondar & Mead method, glycated hemoglobin (HbA1c) by enzymatic immunoturbidimetry (Roche kit), triglycerides (TGs), Total Cholesterol and HDL by enzymatic methods. The

VLDL and LDL fractions determined by the Friedewald formula. For the results of the lipid profile, patients with at least one of the above-mentioned clinical parameters are considered dyslipidemic according to the European Association of Atherosclerosis³⁸.

A subject was considered normoglycemic when presented $\text{HbA1c} \leq 5.6\%$ and fasting glucose levels $\leq 99 \text{ mg/dL}$, while subjects diagnosed by an Endocrinologist with T2DM presented fasting plasma glucose concentration of 7.0 mmol/L (126 mg/dL) or higher and $\text{HbA1c} \geq 6.5\%$. Individuals with T2DM were divided in two groups: with poorly glycemic control ($\text{HbA1c} \geq 7.1\%$) or well-controlled demonstrating a metabolic compensation ($\text{HbA1c} \leq 7.0\%$)³⁹.

After the assessment of the glycemic and periodontal profiles and the periodontal status, all the 897 selected patients were divided into 3 groups: P+T2DM group comprising 206 individuals with T2DM and Periodontitis; Periodontitis group containing 346 individuals affected by only moderate-severe Periodontitis; and Healthy group containing 345 individuals systemically and periodontally healthy.

DNA Extraction and Genotyping

The subjects made a mouthwash for 2 minutes with 3ml of 3% of dextrose solution to obtain buccal epithelial cells, which were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes and stored in a buffer solution (TrisHCl 10mM, EDTA 0.1 M, SDS 0.5% - pH 8.0). After the proteinase K digestion, the DNA was extracted using 8M of ammonium acetate⁴⁰. The genomic DNA of each sample was evaluated for concentration (ng/ μL) and purity (260/280nm; 260/230nm) in the NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), followed by quantification using the Qubit 2.0 fluorescence system (Fisher Scientific, USA).

All samples showed $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ ratios between 1.7 and 2.0, and concentration was adjusted to 50 ng/ μL to genotype the SNPs in the genes presented in the Table 1. Each of the 3 SNPs were analyzed by Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) using TaqMan® (Thermo Fischer Scientific, Foster City, CA, EUA) systems. The amplification was performed in 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). The quality value of the data points for the genotyping was determined by a threshold above 95%⁴¹.

Statistical Analysis

The general characteristics of each group were submitted to a descriptive and analytical statistics using IBM SPSS Statistics 20.0, BioEstat 5.0 and GraphPad Prism 8.4.3 software. First, all data was evaluated by normality tests (D'Agostino & Pearson), and nonparametric tests (multiple comparison by Kruskal-Wallis' test followed by Dunn's test). The chi-squared test was used for categorical variables (sex 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 Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) formula was applied to the genotype frequencies, separately for each group, using chi-square goodness-of-fit for any deviations from the expected genotype equilibrium, as well the minor allele frequency (MAF) was calculated separately for each group. For these analyses and to detect differences in distributions of each SNP among the groups it were used the PLINK software⁴².

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 Periodontitis (when comparing Healthy *versus* Periodontitis groups);
- the occurrence of T2DM together with Periodontitis (when comparing Healthy *versus* P+T2DM groups);
- the occurrence of T2DM together with Periodontitis (when comparing

conjunctly normoglycemic individuals = Healthy + Periodontitis groups *versus* P+T2DM);

- the occurrence of Periodontitis independently of T2DM (when comparing conjunctly Periodontitis + P+T2DM *versus* Healthy individuals).

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. All the multiple logistic regressions were performed by using the SNPStats software⁴³. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

It could be observed in the Table 1, that the genotypes of the three SNPs investigated here (rs184003, rs7593730, rs9472138) were in the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in all the studied population as well as in the Healthy group. The alleles showing the minor frequency in the Healthy, Periodontitis and P+T2DM groups were in agreement with the minor allele frequency (MAF) recorded in the European population (according to the 1000 Genome database, accessed in July, 2, 2021). Excepting the *AGER* which was about twice more frequent in Brazilians than in Europeans.

The Table 2 presents the demographic characteristics of the three groups under study. A total of 1158 patients were screened, being selected 897 individuals according to the inclusion and exclusion requirements. The general characteristics of the population is the presence of older patients in the T2DM+P group and different frequency of male/female between Periodontitis and T2DM+P groups ($p < 0.02$). Regarding smoking, there was significant difference between the Healthy and Periodontitis groups ($p < 0.0001$).

The T2DM+P group showed the highest percentage in Visible Plaque Index (VPI), Marginal Bleeding (MB), Bleeding on Probing (BOP), Probing pocket

Depth (PDi) ≥ 5 mm, Clinical Attachment Level (CALi) 4-5 mm and CALi ≥ 6 , representing worst periodontal conditions when compared with Periodontitis group. Better metabolic control and biochemical levels were observed in the Periodontitis group than in the T2DM+P group. To assess the obesity in patients, we calculated the Body Mass Index (BMI) and Waist-to-hip-ratio, which were also higher in the T2DM+P group in comparison with the other groups (Table 2).

In the Table 3, it is possible to observe that the C allele of each SNP was the more frequently found in every group. The Table 4 presented the multiple logistic regression analyzes considering all the studied population adjusted for age, sex, and smoking status. It was observed that there was significant difference for the rs7593730 SNP (*RBMS1* gene), in the recessive model in the Healthy vs Periodontitis group comparison, in which the T/T genotype presented a twice susceptibility to Periodontitis (OR=2.29; 95%CI = 1.04 - 5.01; P-value= 0.033). We observed that the Periodontitis vs P+T2DM group comparison presented results with statistical significance for the T/T genotype in the codominant model (OR= 0.28; 95% CI= 0.09 – 0.87; P-value = 0.04) and for the T/T genotype in the recessive model (OR = 0.27; 95% CI = 0.09 - 0.84; P-value = 0.012) (Table 4).

In multiple logistic regression of polymorphisms within sex adjusted by age and smoking status, there were no significant results for any of the studied groups (Table 5). Table 6 presents the multiple logistic regressions of polymorphisms within smoking adjusted by age and sex. It was observed that never-smokers in the Healthy vs Periodontitis group comparison showed a significant association, being carriers of rs184003-C/C (*AGER* gene) showing 51% less chance of developing Periodontitis (OR = 0.49; 95% CI = 0.32-0.75). Similarly, for rs184003-C/C (*AGER* gene) in the Healthy vs P+ T2DM group comparison, never-smokers had 49% less chance of developing P+T2DM (OR= 0.51; 95% CI = 0.30-0.87). In agreement, considering the Healthy vs Periodontitis + P+T2DM group comparison, never-smokers' carriers of rs184003-C/C (*AGER* gene) showed 50% less chance of developing Periodontitis independently of T2DM (OR = 0.50; 95% CI = 0.34-0.75). For the (*RBMS1* gene) never-smokers carrying the rs7593730-C/C showed 47% lower chance of developing Periodontitis (OR=0.53; 95% CI = 0.34-0.82) in comparison with the Healthy group. It was confirmed by observing that never-smokers carrying the *RBMS1*-rs7593730-C/C had 43%

lower chance of developing Periodontitis independently of the presence of T2DM (Periodontitis + P+T2DM groups *versus* Healthy individuals) (OR = 0.57; 95% CI = 0.37-0.87). When analyzing all normoglycemic individuals (Healthy + Periodontitis groups) *versus* P+T2DM group, the statistical significance was observed in *RBMS1*-rs7593730-C/T never-smokers which had 51% less chance of developing P+T2DM (OR= 0.49; 95% CI = 0.26-0.94). Finally, for the rs9472138-C/C (*VEGFA* gene) in comparison with the Healthy group, never-smokers had 46% lower chance of developing Periodontitis (OR=0.54; 95% CI = 0.34-0.87), as well as 43% lower chance of developing Periodontitis independently of T2DM (when comparing conjunctly Periodontitis + P+T2DM *versus* Healthy individuals) (OR=0.57; 95% CI = 0.36-0.88).

The Table 7 describes the results of the multiple linear regression analysis of all subjects for effects of SNPs on glycemic, lipid and obesity parameters (additive model adjusted by age, sex, and smoking habits). Significant direct association was found between the rs7593730-CT SNP (*RBMS1* gene) and Total cholesterol (β coefficient regression = 14.61; 95% CI = 3.96 - 25.26; P-value = 0.007). In the Table 8 the multiple linear regression analysis for effects of SNPs on periodontal parameters (additive model adjusted by age, sex, and smoking) of all subjects demonstrated statistically significant direct association of the rs184003-CA (*AGER* gene) with Visible Plaque Index (% of sites) (β coefficient regression = 4.38; 95% CI = 0.21 - 8.55; P-value = 0.03). The rs184003-AA (*AGER* gene) showed indirect association with Number of remaining teeth (β coefficient regression = -2.3; 95% CI = -3.90 - -0.71; P-value = 0.005), meaning that individuals carrying the *AGER*-rs184003-AA presented lower number of remaining teeth. There were also indirect association of the rs9472138-TT (*VEGFA* gene) with percentage of sites with Bleeding on pocket probing (β coefficient regression = -8.92; 95%CI = -16.53 - -1.32; P-value = 0.02) and CAL = 4-5mm (β coefficient regression = -4.94; 95%CI = -8.88 - -1.01; P-value = 0.01).

Discussion

The present study demonstrated for the first time to our knowledge, significant association of the rs7593730 SNP near the *RBMS1* gene with isolated Periodontitis and with Periodontitis together with T2DM. The *RBMS1* gene has

been involved in inflammatory pathways^{25, 44, 45}, and it has been associated with inflammatory burden diseases, such as psoriasis⁴⁶ and chronic obstructive pulmonary disease⁴⁷.

The multiple logistic regression analyzes, evidenced for all the studied population that homozygous TT individuals for the *RBMS1*-rs7593730 SNP were twice more susceptible to develop isolated Periodontitis. The present study is the first to demonstrate this association. When it was investigated the Periodontitis together with T2DM (P+T2DM), the comparison with the Periodontitis group showed significant lower chance (about 70%) of homozygous TT carriers to develop both diseases as comorbidities, both considering the codominant model (OR= 0.28; 95% CI= 0.09 – 0.87; P-value = 0.04) and the recessive model (OR = 0.27; 95% CI = 0.09 - 0.84; P-value = 0.012). The *RBMS1*-rs7593730 SNP has been investigated in different populations affected by T2DM, since the T allele was found as a T2DM risk-lowering by GWAS in a European population²⁵. Similar significant association of the T2DM risk-lowering T allele was found in a Chinese Han population⁴⁴. Here we also found the T allele in homozygosis as a lower risk of T2DM together with Periodontitis, as comorbidities. Unfortunately, it is not possible to make a direct comparison of this reported *RBMS1*-rs7593730 T2DM risk-lowering T allele with the presently found T allele lower risk of T2DM+Periodontitis, because we did not have a group comprised by individuals affected by only T2DM. On the other hand, there is the potential that the risk-lowering T allele previously associated with T2DM were actually associated conjunctly with Periodontitis, since those T2DM individuals enrolled from Consortia were not periodontally examined. Moreover, the less common allele (T) which was associated with reduced T2DM risk showed the frequency of 0.23 in Europeans²⁵, which did not differ from the current MAF of Europeans (0.21) and Brazilians (0.197) (Table 1). The similarity in the MAF frequency between Europeans and Brazilians is interesting, which occurred despite the high miscegenation of the Brazilian population^{48,49}.

Regarding the multiple logistic regressions of polymorphisms within smoking, in fact the smoking covariant was not our main focus on the designing of the study, but interesting results were obtained such as the association of the *RBMS1*-rs7593730-CC with lower risk of Periodontitis as isolated or as

comorbidity of T2DM (Table 6) in never-smokers in comparison with ever-smokers.

Interestingly, the *RBMS1*-rs7593730 T2DM risk-lowering T allele was related to lower levels of fasting glucose and/or HOMA-IR in Europeans²⁵. This finding was confirmed for fasting insulin ($P=0.010$) in Han Chinese⁴⁴. Noteworthy, in Brazilians we found significant association of the *RBMS1*-rs7593730-CT genotype with Total cholesterol (β coefficient regression = 14.61; 95% CI = 3.96 - 25.26; P -value = 0.007) by additive model adjusted by age, sex and smoking habits.

Regarding the polymorphisms in the *AGER* and *VEGFA*, it was found that never smokers' carriers of each CC for *AGER*-rs184003 and *VEGFA*-rs9472138 were respectively 51% and 46% lower susceptible to develop Periodontitis. The finding that these polymorphisms seemed to be influenced by the smoking habit is also original, as well as the significant association with lower chance of developing Periodontitis by this interaction.

In addition, carriers of the *AGER*-rs184003-CA present higher percentage of sites with visible plaque and those carrying the *AGER*-rs184003-AA presented lower number of remaining teeth. This suggests that the A allele of the rs184003 SNP seemed to be associated with the periodontitis phenotype, and this agrees with the finding that *AGER*-rs184003-CC carriers showed lower susceptibility to Periodontitis. Regarding the *VEGFA*-rs9472138, carriers of the TT genotype demonstrated lower percentage of sites with characteristics of active periodontal disease (Bleeding on probing and CAL = 4-5mm). It is interesting to make regular follow-up of these individuals, and it is plausible to suppose that, whether confirmed by future studies, that these individuals would suffer lower impact of the periodontal tissue damage by the periodontitis. Considering that this data was never reported before, this demands deep functional investigation to verify the interrelationships among polymorphisms, periodontal parameters, and smoking habits.

The main limitation of this study is the lack of a group comprised by individuals affected by only T2DM, which prevents comparisons with other groups. In fact, there is a high prevalence of periodontitis in patients with T2DM, mainly among patients with the T2DM diagnosis for some years. Moreover, despite we had chosen SNPs that were previously reported as molecular

biomarkers of T2DM, it is known that the genes investigated here harbor a variety of other SNPs, which might be the true causal SNPs. Therefore, the true association might be due to variations located in other regions of the studied genes, including SNPs in the vicinity.

In conclusion, relevant genetic associations were found in the studied population, for the investigated SNPs rs184003 (*AGER* gene), rs7593730 (*RBMS1* gene) and rs9472138 (*VEGFA* gene) gene biomarkers already described for DM2, which showed behavior of relevance in susceptibility to Periodontitis. Furthermore, multiple regression analyzes demonstrated important associations between the biochemical profile and periodontal disease. More studies are needed to confirm the association of genes in the occurrence in the group with only T2DM to compare the behavior together or not with P, unveiling the interconnected biological pathway of the diseases.

References

1. Li N, Wang LJ, Jiang B, Li XQ, Guo CL, Guo SJ, et al. Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Eur J Med Chem.* 2018; 151: 145-57.
2. Alberti KG, 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.
3. Mohamed HG, Idris SB, Ahmed MF, Astrom AN, Mustafa K, Ibrahim SO, et al. Influence of type 2 diabetes on local production of inflammatory molecules in adults with and without chronic periodontitis: a cross-sectional study. *BMC oral health.* 2015; 15: 86.
4. Hill J, Nielsen M, Fox MH. Understanding the social factors that contribute to diabetes: a means to informing health care and social policies for the chronically ill. *Perm J.* 2013; 17(2): 67-72.
5. American Diabetes A. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes care.* 2021; 44(Suppl 1): S15-S33.
6. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A review of multi-target drugs. *Molecules.* 2020;25(8).
7. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001; 414(6865): 782-7.
8. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat rev Endocrinol.* 2011; 8(4): 228-36.
9. Song S, Lee JE. Dietary Patterns Related to Triglyceride and High-Density Lipoprotein Cholesterol and the Incidence of Type 2 Diabetes in Korean Men and Women. *Nutrients.* 2018; 11(1).

10. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009; 373(9680): 2027-33.
11. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019; 157: 107843.
12. Ma Q, Li Y, Li P, Wang M, Wang J, Tang Z, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomed pharmacother*. 2019; 117: 109138.
13. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993; 16(1): 329-34.
14. Silva BRD, Cirelli T, Nepomuceno R, Theodoro LH, Orrico SRP, Cirelli JA, et al. Functional haplotype in the Interleukin8 (CXCL8) gene is associated with type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis in Brazilian population. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(6):1665-72.
15. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PloS one*. 2015; 10(8): e0136646.
16. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1:S173-S82.
17. Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, Figueiredo LC, Malheiros Z, Stewart B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res*. 2020; 34(suppl 1):e026.
18. Graziani F, Gennai S, Solini A, Petrini M. A systematic review and meta-analysis of epidemiologic observational evidence on the effect of periodontitis on diabetes An update of the EFP-AAP review. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(2): 167-87.
19. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes. *Br Dent J*. 2019; 227(7): 577-84.
20. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 91-8.
21. Lambert SA, Abraham G, Inouye M. Towards clinical utility of polygenic risk scores. *Hum Mol Genet*. 2019; 28(R2): R133-R42.
22. MedlinePlus. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US) 2020 [updated Sep 18; cited 2021 12/04]. Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/snp/>.
23. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008;40(5):638-45.
24. Sanghera DK, Blackett PR. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *J Diabetes Metab*. 2012; 3(198).
25. Qi L, Cornelis MC, Kraft P, Stanya KJ, Linda Kao WH, Pankow JS, et al. Genetic variants at 2q24 are associated with susceptibility to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(13): 2706-15.

26. Shu XO, Long J, Cai Q, Qi L, Xiang YB, Cho YS, et al. Identification of new genetic risk variants for type 2 diabetes. *PLoS genetics*. 2010; 6(9): e1001127.
27. Holla LI, Kankova K, Fassmann A, Buckova D, Halabala T, Znojil V, et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol*. 2001; 72(12):1742-6.
28. Serveaux-Dancer M, Jabaudon M, Creveaux I, Belville C, Blondonnet R, Gross C, et al. Pathological implications of Receptor for Advanced Glycation End-Product (AGER) gene polymorphism. *Dis Markers*. 2019; 2019:2067353.
29. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Solivera J, Garcia-Rios A, Perez-Caballero AI, Lovegrove JA, et al. Top single nucleotide polymorphisms affecting carbohydrate metabolism in metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *The J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(2): E384-9.
30. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4): 229-35.
31. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971;15(2):107-13.
32. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007; 78(7 Suppl): 1387-99.
33. 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.
34. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K, et al. Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. *J Dent Res*. 2012; 91(7 Suppl): 21S-8S.
35. 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. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(11): 2312-24.
36. 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.
37. 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.
38. Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S, Kolovou G, Baum H, Bruckert E, et al. Fasting Is Not Routinely Required for Determination of a Lipid Profile: Clinical and Laboratory Implications Including Flagging at Desirable Concentration Cutpoints-A Joint Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem*. 2016; 62(7): 930-46.
39. American Diabetes A. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes care*. 2021; 44(Suppl 1): S73-S84.
40. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007; 18(2): 148-52.
41. Nicchio IG, Cirelli T, Nepomuceno R, Hidalgo MAR, Rossa C, Jr., Cirelli JA, et al. Polymorphisms in Genes of Lipid Metabolism Are Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis, as Comorbidities, and with the Subjects' Periodontal, Glycemic, and Lipid Profiles. *J Diabetes Res*. 2021; 2021: 1049307.

42. 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.
43. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22(15): 1928-9.
44. Kazakova EV, Chen M, Jamaspishvili E, Lin Z, Yu J, Sun L, et al. Association between RBMS1 gene rs7593730 and BCAR1 gene rs7202877 and Type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Acta Biochim Pol.* 2018; 65(3): 377-82.
45. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The J Clin Invest.* 2006; 116(7): 1793-801.
46. Wang Q, Chang W, Yang X, Cheng Y, Zhao X, Zhou L, et al. Levels of miR-31 and its target genes in dermal mesenchymal cells of patients with psoriasis. *Int J Dermatol.* 2019; 58(2): 198-204.
47. Qiao D, Hu C, Li Q, Fan J. Circ-RBMS1 knockdown alleviates CSE-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress via up-regulating FBXO11 through miR-197-3p in 16HBE cells. *Int J Chron obstruct Pulmon Dis.* 2021; 16: 2105-18.
48. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(2): 444-61.
49. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003; 100(1): 177-82.
50. Cirelli T, Nepomuceno R, Orrico SRP, Rossa C Jr, Cirelli JA, North KE, Graff M, Barros SP, Scarel-Caminaga RM. Validation in a Brazilian population of gene markers of periodontitis previously investigated by GWAS and bioinformatic studies. *J Periodontol.* 2021; 92(5): 689-703.

Table 1 - Information regarding the genotyped polymorphisms and assays

SNP ID	Gene Symbol	Gene Name	Position†, Alleles	MAF - Estudo	MAF European	HWE		Assay ID
						All	Healthy	
rs184003	AGER	Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor	GRCh37. 6: g.32150296C>A	AA = 0.164	A=0.08	0.11 0.12		C__2412456_10
rs7593730	RBMS1	RNA Binding Motif; Single Stranded Interacting Protein 1	GRCh37.2:g.161171454T>C	TT = 0.197	T=0.21	0.52 0.31		C__30739116_10
rs9472138	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	GRCh37. 6:g.43811762C>T	TT = 0.257	T=0.28	0.16 0.67		C__11400700_20

† Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37.p13) or hg19; Minor Allele Frequency (MAF - European) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> - accessed July 2, 2021; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium of All subjects investigated here; or of Healthy group.

Fonte: Elaboração própria.

Table 2. Demographic characteristic of the studied groups, periodontal clinical parameters, glycemic and lipid profile and physical exams of all groups

	HEALTHY	PERIODONTITIS	P+T2DM
Demographic Characteristics	n= 345	n= 346	n= 206
Age, Median (IQR)	41.0 (35.0 - 50.7) ^a	48.0 (41.0 - 55.0) ^b	56.0 (50.0 - 62.0) ^c
Sex, n (%)			
Male	110 (32%) ^{a,b}	127 (36.8%) ^a	52 (25.4%) ^{a,b}
Female	235 (68%) ^{a,b}	219 (63.2%) ^a	154 (74.6%) ^{a,b}
Smoking habits, n (%)			
Former-Smoker	76 (22%) ^a	221 (64%) ^b	61 (29.8%) ^a
Never-Smoker	269 (78%) ^a	125 (36%) ^b	145 (70.2%) ^a
Periodontal Parameters Median (IQR)			
Number of teeth	27.0 (24.0 - 28.0) ^a	24 (20.0 - 27.0) ^b	21.5 (16.0 - 25.0) ^c
Visible Plaque Index (% site)	20.3 (8.4 - 36.4) ^a	41.0 (19.5 - 65.4) ^b	58.3 (36.7 - 77.9) ^c
Marginal Bleeding (% site)	4.16 (0.0 - 11.8) ^a	9.69 (1.78 - 24.3) ^b	10.1 (2.14 - 34.5) ^b
BOPi (% site)	1.00 (0.0 - 4.58) ^a	25.0 (5.15 - 50.0) ^b	54.3 (27.2 - 74.7) ^c
PPDi ≤ 4mm (% site)	100 (100 - 100) ^a	96.3 (85.2 - 100) ^b	87.2 (65.6 - 97.9) ^c
PPDi ≥ 5mm (% site)	0.0 (0.0 - 0.0) ^a	3.63 (0.0 - 14.7) ^b	12.7 (2.02 - 34.4) ^c
CALi ≤ 3mm (% site)	100 (99.0 - 100) ^a	81.9 (62.0 - 98.1) ^b	58.3 (33.0 - 81.3) ^c
CALi = 4-5mm (% site)	0.0 (0.0 - 0.92) ^a	12.5 (1.75 - 25.0) ^b	24.0 (11.3 - 34.2) ^c
CALi ≥ 6mm (% site)	0.0 (0.0 - 0.0) ^a	3.72 (0.0 - 11.4) ^b	11.1 (2.53 - 30.6) ^c
Biochemical and Physical data Median (IQR)			
Fasting Blood Glucose (mg/dL)	92.0 (86.0 - 96.0) ^a	93.0 (87.7 - 98.2) ^a	159 (118 - 228) ^b
HbA _{1c} (%)	5.50 (5.20 - 5.70) ^a	5.55 (5.20 - 5.92) ^a	7.90 (6.60 - 9.77) ^b
Insulin (UI/mL)	7.40 (5.60 - 12.9) ^a	10.4 (6.65 - 17.0) ^a	13.6 (9.30 - 28.2) ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	175 (152 - 198) ^a	174 (155 - 202) ^a	194 (159 - 228) ^b
HDL-Cholesterol (mg/dL)	55.0 (42.0 - 63.0) ^a	52.5 (41.5 - 62.5) ^a	44.0 (37.0 - 55.5) ^b
LDL-Cholesterol (mg/dL)	94.0 (78.0 - 121) ^a	99.9 (79.6 - 122) ^a	108 (70.1 - 149) ^a
Triglycerides (mg/dL)	107 (81.0 - 170) ^a	128 (85.2 - 203) ^{a,b}	155 (106 - 255) ^b
BMI (kg/m ²)	27.1 (22.6 - 29.4) ^a	26.8 (24.2 - 29.7) ^a	30.1 (26.7 - 33.8) ^b
Waist-to-Hip-Ratio (cm)	1.15 (1.05 - 1.27) ^a	1.12 (1.03 - 1.21) ^a	1.04 (0.98 - 1.09) ^b

BOPi= Interproximal Bleeding on Probing; P= Periodontitis; PPDi= Interproximal Probing Pocket Depth; CAL= Level of Interproximal Clinical Attachment. Chi Squared test was used to determine differences among groups for sex and smoking habits. Periodontal parameters and Biochemical and physical data = ^{a, b, c} Different letters means $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn's test). IQR=interquartile range (25% percentile - 75% percentile).

Fonte: Elaboração própria.

Table 3 -Allelic frequencies of each investigated gene

<i>AGER</i>	Healthy	Periodontitis	P+T2DM	Healthy + Periodontitis	Periodontitis + P+T2DM
rs184003	n=344	n=345	n=202	n=690	n=547
Allele	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
C	573 (0.83)	582 (0.84)	334 (0.83)	1156 (0.84)	916 (0.84)
A	115 (0.17)	108 (0.16)	70 (0.17)	224 (0.16)	178 (0.16)
<i>RBMS1</i>					
rs7593730	n=340	n=344	n=189	n=685	n=534
Allele	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
C	545 (0.80)	545 (0.79)	313 (0.83)	1091 (0.80)	859 (0.80)
T	135 (0.20)	143 (0.21)	65 (0.17)	279 (0.20)	209 (0.20)
<i>VEGFA</i>					
rs9472138	n=345	n=346	n=206	n=692	n=552
Allele	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
C	513 (0.74)	514 (0.74)	305 (0.74)	1028 (0.74)	819 (0.74)
T	177 (0.26)	178 (0.26)	107 (0.26)	356 (0.26)	285 (0.26)

Fonte: Elaboração própria.

Table 5 – Multiple logistic regressions of polymorphisms within sex adjusted by age and smoking status

AGER rs184003				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	C/C	161	144	1.00	80	1.00	1.00	305	1.00	224	1.00
Female	A/C	60	53	0.86 (0.54-1.35)	33	1.03 (0.58-1.83)	1.09 (0.63-1.88)	113	1.02 (0.62-1.67)	86	0.91 (0.60-1.38)
	A/A	11	8	0.85 (0.32-2.24)	5	1.44 (0.42-4.87)	1.16 (0.35-3.82)	19	1.24 (0.42-3.59)	13	0.91 (0.38-2.20)
	C/C	82	103	1.00	59	1.00	1.00	185	1.00	162	1.00
Male	A/C	27	35	1.08 (0.59-1.98)	23	1.25 (0.58-2.70)	1.07 (0.56-2.07)	63	1.08 (0.58-1.99)	58	1.10 (0.62-1.93)
	A/A	3	2	0.85 (0.13-5.60)	2	1.25 (0.08-19.40)	1.26 (0.11-14.51)	5	1.36 (0.15-12.30)	4	0.93 (0.16-5.32)
				Test for interaction in the trend: 0.83		Test for interaction in the trend: 0.92	Test for interaction in the trend: 1		Test for interaction in the trend: 0.99		Test for interaction in the trend: 0.88
RBMS1 rs7593730				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	C/C	146	135	1.00	73	1.00	1.00	281	1.00	208	1.00
Female	C/T	78	56	0.78 (0.50-1.19)	35	0.95 (0.54-1.66)	1.16 (0.67-1.99)	134	1.06 (0.65-1.73)	91	0.81 (0.55-1.21)
	T/T	7	11	1.75 (0.64-4.80)	4	1.68 (0.38-7.48)	0.47 (0.13-1.65)	18	0.76 (0.23-2.51)	15	1.49 (0.56-3.99)
	C/C	69	89	1.00	55	1.00	1.00	158	1.00	144	1.00
Male	C/T	37	41	0.95 (0.54-1.68)	23	0.64 (0.30-1.36)	0.95 (0.49-1.85)	79	0.81 (0.44-1.51)	64	0.89 (0.52-1.52)
	T/T	3	12	3.03 (0.80-11.42)	0	0.00	0.00	15	0.00	12	2.07 (0.55-7.88)
				Test for interaction in the trend: 0.72		Test for interaction in the trend: 0.043	Test for interaction in the trend: 0.2		Test for interaction in the trend: 0.09		Test for interaction in the trend: 0.91
VEGFA rs9472138				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	C/C	132	112	1.00	64	1.00	1.00	244	1.00	176	1.00
Female	C/T	87	85	1.12 (0.74-1.68)	50	1.07 (0.63-1.82)	0.95 (0.58-1.56)	172	1.02 (0.65-1.60)	135	1.10 (0.76-1.61)
	T/T	15	7	0.47 (0.18-1.26)	5	0.41 (0.12-1.42)	1.30 (0.38-4.48)	22	0.71 (0.24-2.12)	12	0.49 (0.21-1.17)
	C/C	60	72	1.00	46	1.00	1.00	132	1.00	118	1.00
Male	C/T	42	61	1.16 (0.67-1.99)	35	1.13 (0.56-2.26)	0.89 (0.50-1.62)	104	0.91 (0.53-1.59)	96	1.11 (0.67-1.86)
	T/T	9	9	0.93 (0.33-2.57)	6	0.81 (0.23-2.92)	1.11 (0.34-3.58)	18	1.08 (0.37-3.11)	15	0.90 (0.35-2.33)
				Test for interaction in the trend: 0.64		Test for interaction in the trend: 0.75	Test for interaction in the trend: 0.97		Test for interaction in the trend: 0.79		Test for interaction in the trend: 0.65

Fonte: Elaboração própria.

Table 6 – Multiple logistic regressions of polymorphism within smoking adjusted by age and sex

AGER rs184003				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
C/C		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	Ever smoker	50	94	1.00	58	1.00	1.00	143	1.00	152	1.00
	Never smoker	193	153	0.49 (0.32-0.75)	81	0.51 (0.30-0.87)	0.90 (0.57-1.42)	347	0.65 (0.43-1.00)	234	0.50 (0.34-0.75)
A/C											
	Ever smoker	25	25	1.00	19	1.00	1.00	50	1.00	44	1.00
	Never smoker	62	63	1.12 (0.57-2.20)	37	0.92 (0.40-2.10)	0.85 (0.39-1.83)	126	0.81 (0.40-1.61)	100	1.09 (0.58-2.02)
A/A											
	Ever smoker	2	4	1.00	4	1.00	1.00	6	1.00	8	1.00
	Never smoker	12	6	0.32 (0.04-2.35)	3	0.44 (0.04-4.43)	0.58 (0.07-4.78)	18	0.47 (0.07-3.14)	9	0.32 (0.05-2.01)
				Test for interaction in the trend: 0.2		Test for interaction in the trend: 0.44	Test for interaction in the trend: 0.74		Test for interaction in the trend: 0.86		Test for interaction in the trend: 0.22
RBMS1 rs7593730				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
C/C		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	Ever smoker	44	82	1.00	47	1.00	1.00	125	1.00	129	1.00
	Never smoker	171	142	0.53 (0.34-0.82)	81	0.62 (0.35-1.08)	1.11 (0.68-1.80)	314	0.79 (0.51-1.24)	223	0.57 (0.37-0.87)
C/T											
	Ever smoker	31	35	1.00	28	1.00	1.00	66	1.00	63	1.00
	Never smoker	84	62	0.70 (0.38-1.27)	30	0.51 (0.24-1.10)	0.61 (0.30-1.25)	147	0.49 (0.26-0.94)	92	0.64 (0.37-1.12)
T/T											
	Ever smoker	2	7	1.00	1	1.00	1.00	9	1.00	8	1.00
	Never smoker	8	16	0.84 (0.14-5.12)	3	1.77 (0.09-36.52)	0.85 (0.07-10.31)	24	1.16 (0.10-13.35)	19	0.82 (0.14-4.97)
				Test for interaction in the trend: 0.33		Test for interaction in the trend: 0.99	Test for interaction in the trend: 0.16		Test for interaction in the trend: 0.86		Test for interaction in the trend: 0.54
VEGFA rs9472138				Healthy vs Periodontitis		Healthy vs P+T2DM	Periodontitis vs P+T2DM		Healthy + Periodontitis vs P+T2DM		Healthy vs Periodontitis + P+T2DM
C/C		Healthy	Periodontitis	OR (95% CI)	P+T2DM	OR (95% CI)	OR (95% CI)	Healthy + Periodontitis	OR (95% CI)	Periodontitis + P+T2DM	OR (95% CI)
	Ever smoker	42	67	1.00	43	1.00	1.00	108	1.00	110	1.00
	Never smoker	150	117	0.54 (0.34-0.87)	67	0.59 (0.32-1.07)	0.95 (0.56-1.59)	268	0.68 (0.42-1.10)	184	0.57 (0.36-0.88)
C/T											
	Ever smoker	31	50	1.00	37	1.00	1.00	81	1.00	87	1.00
	Never smoker	98	96	0.74 (0.43-1.29)	48	0.63 (0.32-1.23)	0.70 (0.39-1.26)	195	0.64 (0.37-1.10)	144	0.70 (0.42-1.17)
T/T											
	Ever smoker	5	5	1.00	3	1.00	1.00	10	1.00	8	1.00
	Never smoker	19	11	0.68 (0.16-2.98)	8	0.67 (0.10-4.33)	1.48 (0.25-8.64)	30	0.92 (0.19-4.51)	19	0.76 (0.20-2.94)
				Test for interaction in the trend: 0.47		Test for interaction in the trend: 0.94	Test for interaction in the trend: 0.82		Test for interaction in the trend: 0.94		Test for interaction in the trend: 0.54

Fonte: Elaboração própria.

Table 7- Multiple linear regression analysis of all subjects for effects of SNPs on glycemic, lipid and obesity parameters (additive model adjusted by age, sex and smoking)

Gene-SNP	Fasting Glucose		Insulin		HbA1C		Triglycerides		Total Cholesterol		HDL		LDL		BMI (m/Kg2)		Waist-to-Hip-Ratio (cm)	
	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value	adjusted β † (95% CI)	p-value
<i>AGER</i> rs184003	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CA	-1,81 (-20.82 - 17.19)	0,85	1,17 (-4.92 - 7.28)	0,7	-0,2 (-0.80 - 0.39)	0,51	-1,52 (-30.69 - 27.6)	0,91	6,09 (-5.45 - 17.63)	0,3	4,13 (-3.08 - 11.36)	0,26	-0,8 (-18.87 - 17.2)	0,93	0,21 (-1.30 - 1.73)	0,78	-0,01 (-0.05 - 0.01)	0,35
AA	-12,66 (-56.57 - 31.23)	0,57	2,98 (-10.79 - 16.7)	0,67	0,006 (-1.39 - 1.41)	0,99	23,24 (-38.78 - 85.2)	0,46	-8,79 (-33.34 - 15.7)	0,48	-1,73 (-16.76 - 13.3)	0,82	-15,81 (-55.11 - 23.4)	0,42	-0,23 (-3.85 - 3.38)	0,9	-0,03 (-0.11 - 0.05)	0,43
<i>RBMS1</i> rs7593730																		
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CT	4,33 (-13.72 - 22.39)	0,63	-1,99 (-7.80 - 3.82)	0,5	0,08 (-0.49 - 0.66)	0,78	23,21 (-4.43 - 50.86)	0,09	14,61 (3.96 - 25.26)	0,007	-1,16 (-8.16 - 5.84)	0,74	13,65 (-1.97 - 29.28)	0,08	1,08 (-0.40 - 2.56)	0,15	-0,01 (-0.05 - 0.02)	0,41
TT	-1,5 (-43.41 - 40.41)	0,94	-4,51 (-17.83 - 8.80)	0,5	0,15 (-1.20 - 1.51)	0,82	-18,74 (-91.43 - 53.9)	0,61	-14,32 (-42.31 - 13.6)	0,31	6,31 (-11.53 - 24.1)	0,48	6,04 (-33.44 - 45.5)	0,76	-1,28 (-5.06 - 2.50)	0,5	0,02 (-0.05 - 0.11)	0,48
<i>VEGFA</i> rs9472138																		
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CT	-8,19 (-25.05 - 8.67)	0,34	3,12 (-2.41 - 8.66)	0,26	-0,01 (-0.55 - 0.51)	0,95	13,29 (-11.92 - 38.5)	0,3	-2,86 (-12.92 - 7.19)	0,57	-4,82 (-11.06 - 1.42)	0,13	13,41 (-2.28 - 29.10)	0,09	0,76 (-0.59 - 2.12)	0,26	-0,001 (-0.03 - 0.03)	0,94
TT	-3,71 (-39.82 - 32.39)	0,84	0,1 (-11.83 - 12.1)	0,98	0,85 (-0.29 - 2.01)	0,14	-44,96 (-100.4 - 10.5)	0,11	-2,77 (-24.95 - 19.4)	0,8	-7,44 (-20.96 - 6.06)	0,27	7,98 (-42.80 - 26.8)	0,65	-1,29 (-4.24 - 1.64)	0,38	-0,01 (-0.07 - 0.05)	0,75

Bold font indicates $p < 0.05$. β †the regression coefficient with 95% CI were estimated by multiple linear regression models after controlling for age, sex and smoking. Abbreviations: HbA1C: glycated hemoglobin HDL: High Density Lipoproteins, LDL: Low Density Lipoproteins; BMI: Body mass index β , regression coefficient; CI, confidence interval

Fonte: Elaboração própria.

Table 8 - Multiple linear regression analysis of all subjects for effects of SNPs on periodontal parameters (additive model adjusted by age, sex and smoking)

Gene-SNP	Number of remaining teeth		Bleeding on Marginal Probing (% of sites)		Visible Plaque Index (% of sites)		Bleeding on pocket probing (% of sites)		PPDi ≥ 5mm of sites		CALi = 4-5mm (% of sites)		CALi ≥ 6mm (% of sites)	
	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value	adjusted β† (95% CI)	p-value
<i>AGER</i> rs184003														
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CA	-0,46 (-1.13 - 0.21)	0,18	1,04 (-2.15 - 4.25)	0,52	4,38 (0.21 - 8.55)	0,03	-0,02 (-4.04 - 3.98)	0,99	1,91 (-0.38 - 4.21)	0,1	0,59 (-1.48 - 2.67)	0,57	1,01 (-1.15 - 3.16)	0,36
AA	-2,3 (-3.90 - -0.71)	0,005	5,89 (-1.64 - 13.43)	0,12	4,96 (-4.85 - 14.79)	0,32	3,66 (-5.791 - 13.11)	0,44	2,26 (-3.15 - 7.68)	0,41	-0,32 (-5.23 - 4.58)	0,89	2,56 (-2.52 - 7.65)	0,32
<i>RBMS1</i> rs7593730														
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CT	-0,61 (-1.26 - 0.38)	0,06	-1,27 (-4.34 - 1.78)	0,41	-1,99 (-5.99 - 2.00)	0,32	-0,32 (-4.16 - 3.52)	0,87	1,03 (-1.16 - 3.23)	0,35	-0,72 (-2.73 - 1.27)	0,47	0,29 (-1.77 - 2.37)	0,77
TT	-0,63 (-2.10 - 0.84)	0,39	-0,99 (-7.91 - 5.92)	0,77	7,97 (-1.06 - 17.00)	0,08	5,52 (-3.15 - 14.21)	0,21	3,04 (-1.92 - 8.02)	0,22	2,23 (-2.28 - 6.75)	0,33	1,74 (-2.95 - 6.43)	0,46
<i>VEGFA</i> rs9472138														
CC	Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref		Ref	
CT	0,42 (-0.18 - 1.03)	0,17	2,39 (-0.48 - 5.28)	0,1	1,01 (-2.74 - 4.77)	0,59	-1,01 (-4.60 - 2.59)	0,58	-1,12 (-3.19 - 0.95)	0,28	0,04 (-1.82 - 1.91)	0,96	-0,87 (-2.82 - 1.06)	0,37
TT	-0,004 (-1.29 - 1.29)	0,99	-3,81 (-9.88 - 2.26)	0,21	-0,35 (-8.29 - 7.57)	0,92	-8,92 (-16.53 - -1.32)	0,02	-3,23 (-7.60 - 1.13)	0,14	-4,94 (-8.88 - -1.01)	0,01	-2,38 (-6.48 - 1.71)	0,25

Bold font indicates $p < 0.05$. β †the regression coefficient with 95% CI were estimated by multiple linear regression models after controlling for age, sex and smoking. Abbreviations: PPDi: interproximal probing pocket depth; CAL: interproximal clinical attachment level; β: regression coefficient; CI: confidence interval

Fonte: Elaboração própria.

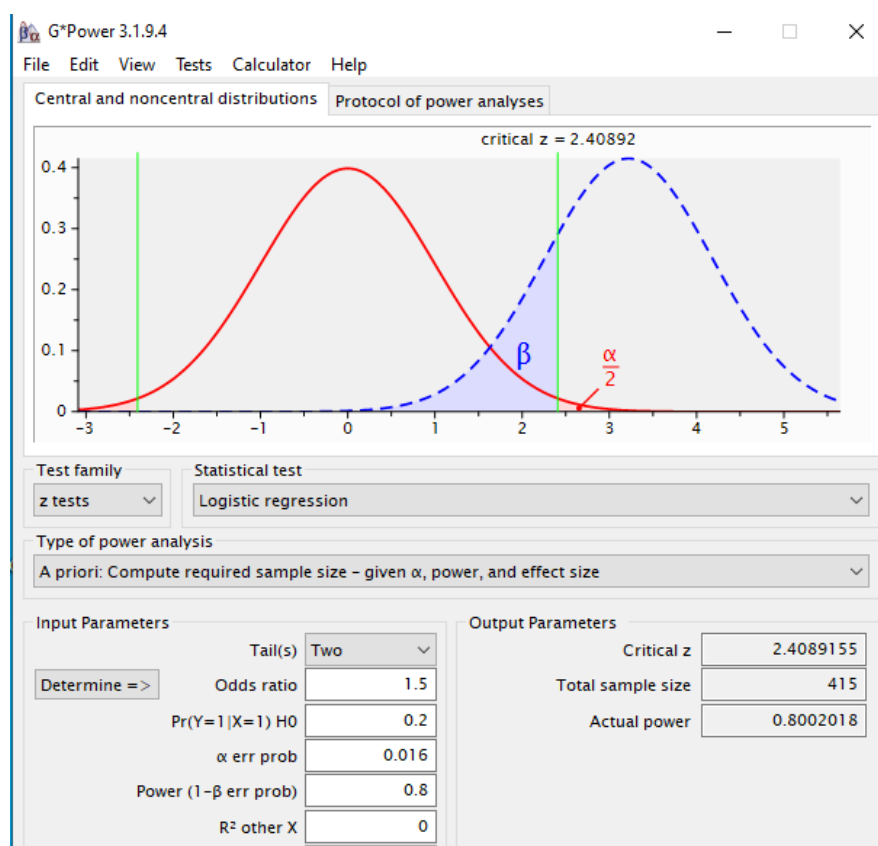
SUPPLEMENTARY MATERIAL

1. Material and Methods

1.1. Study subjects

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 3.1.9.4³⁷ program was used, considering the parameters: logistic regression; two tail, OR: 1.5; $\Pr(Y = 1 / X = 1) H_0 = 0.2$; alpha of 0.016 and 80% power, $R^2 = 0$. It is important to note that $\alpha = 0.05$ was obtained from $p = 0.05$ divided by 3 SNPs. This calculation resulted in a total sample of 415 patients, which could be 139 patients per group. Therefore, the genetic analyses in this study have a power greater than 80%, since each studied group comprises more than 139 patients.

Figure 1- Results obtained from the power size calculation with the GPower software.



Source: Own elaboration from the program G*Power Calculator, version 3.1.4³⁷.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que na população estudada, os polimorfismos genéticos considerados importantes marcadores de DM2, como rs7593730 (próximo do gene *RBMS1*), rs184003 (gene *AGER*) e rs9472138 (gene *VEGFA*) foram relevantes para a Periodontite. O *RBMS1*-rs7593730-TT foi associado a suscetibilidade à Periodontite, o genótipo homozigoto CC de cada polimorfismo em indivíduos que nunca fumaram foi associado à menor chance de desenvolver Periodontite isoladamente ou conjuntamente ao DM2. Também foram verificadas associação de *RBMS1*-rs7593730-CT com nível de colesterol total, de *AGER*-rs184003-AA com o número de dentes remanescentes, e de *VEGFA*-rs9472138-TT com sangramento à sondagem e perda do nível clínico de inserção 4-5mm.

REFERÊNCIAS*

1. Hill J, Nielsen M, Fox MH. Understanding the social factors that contribute to diabetes: a means to informing health care and social policies for the chronically ill. *Perm J*. 2013; 17(2): 67-72.
2. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nat Rev Nephrol*. 2020; 16(7): 377-90.
3. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes care*. 2021; 44(Suppl 1):S15-S33.
4. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*. 2020; 25(8).
5. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016; 536(7614): 41-7.
6. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(2): 88-98.
7. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017; 389(10085): 2239-51.
8. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 138: 271-81.
9. Tanaka H, Ihana-Sugiyama N, Sugiyama T, Ohsugi M. Contribution of diabetes to the incidence and prevalence of comorbid conditions (cancer, periodontal disease, fracture, impaired cognitive function, and depression): a systematic review of epidemiological studies in Japanese populations. *J Epidemiol*. 2019; 29(1): 1-10.
10. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1993;16(1):329-34.
11. Ma Q, Li Y, Li P, Wang M, Wang J, Tang Z, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora. *Biomed Pharmacother*. 2019;117:109138.
12. Rao P, Zhou Y, Ge SQ, Wang AX, Yu XW, Alzain MA, et al. Validation of Type 2 Diabetes Risk Variants Identified by Genome-Wide Association Studies in Northern Han Chinese. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(9).

* 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>

13. Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, Figueiredo LC, Malheiros Z, Stewart B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res.* 2020;34(suppl 1):e026.
14. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PloS one.* 2015;10(8):e0136646.
15. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2020; 83(1): 26-39.
16. Jian CX, Fan QS, Hu YH, He Y, Li MZ, Zheng WY, et al. IL-7 suppresses osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through inactivation of mitogen-activated protein kinase pathway. *Organogenesis.* 2016;12(4):183-93.
17. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018; 89 Suppl 1:S173-S82.
18. Miller PD, Jr., McEntire ML, Marlow NM, Gellin RG. An evidenced-based scoring index to determine the periodontal prognosis on molars. *J Periodontol.* 2014; 85(2): 214-25.
19. Kumar S. Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dent Clin North Am.* 2019; 63(1): 69-81.
20. Masumoto R, Kitagaki J, Fujihara C, Matsumoto M, Miyauchi S, Asano Y, et al. Identification of genetic risk factors of aggressive periodontitis using genomewide association studies in association with those of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2019; 54(3):199-206.
21. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent.* 2009; 7(2): 107-27.
22. Graziani F, Gennai S, Solini A, Petrini M. A systematic review and meta-analysis of epidemiologic observational evidence on the effect of periodontitis on diabetes An update of the EFP-AAP review. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(2): 167-87.
23. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes. *Br Dent J.* 2019; 227(7): 577-84.
24. Mesia R, Gholami F, Huang H, Clare-Salzler M, Aukhil I, Wallet SM, Shaddox LM. Systemic inflammatory responses in patients with type 2 diabetes with chronic periodontitis. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2016; 8;4(1): e000260.
25. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, Kulkarni RD. Systemic Cytokines in Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis. *Curr Diabetes Rev.* 2018; 14(2): 182-188.

26. Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontol 2000*. 2006; 40: 130-43.
27. Zhang X, Wang M, Wang X, Qu H, Zhang R, Gu J, Wu Y, Ni T, Tang W, Li Q. Relationship between periodontitis and microangiopathy in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2021 Dec; 56(6): 1019-1027.
28. Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol*. 2001; 6(1): 91-8.
29. Lambert SA, Abraham G, Inouye M. Towards clinical utility of polygenic risk scores. *Hum Mol Genet*. 2019; 28(R2): R133-R42.
30. Antunes LS, Carvalho L, Petean IBF, Antunes LA, Freitas JV, Salles AG, et al. Association between genetic polymorphisms in the promoter region of the defensin beta 1 gene and persistent apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021; 54(1): 38-45.
31. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35: 158-82.
32. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol*. 2010; 81(3): 392-402.
33. Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Sogumo PM, et al. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet*. 2011; 49(5-6): 292-302.
34. Scarel-Caminaga RM, Cera FF, Pigossi SC, Finoti LS, Kim YJ, Viana AC, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Nitric Oxide Levels in Individuals with Chronic Periodontitis. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(6).
35. 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. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(11): 977-85.
36. 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. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(11): 2312-24.
37. Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *J Periodontal Res*. 2014; 49(6): 683-95.
38. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007; 445(7130): 881-5.
39. Salonen JT, Uimari P, Aalto JM, Pirskanen M, Kaikkonen J, Todorova B, et al. Type 2 diabetes whole-genome association study in four populations: the DiaGen consortium. *Am J Hum Genet*. 2007; 81(2): 338-45.

40. Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari NE, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS genetics*. 2009; 5(2): e1000378.
41. Munz M, Richter GM, Loos BG, Jepsen S, Divaris K, Offenbacher S, et al. Genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease and periodontitis reveals a novel shared risk locus. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 13678.
42. Schaefer AS, Richter GM, Dommisch H, Reinartz M, Nothnagel M, Noack B, et al. CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. *J Med Genet*. 2011; 48(1): 38-47.
43. Ernst FD, Uhr K, Teumer A, Fanghanel J, Schulz S, Noack B, et al. Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 119.
44. Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, et al. Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(6): 563-72.
45. Holla LI, Kankova K, Fassmann A, Buckova D, Halabala T, Znojil V, et al. Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol*. 2001; 72(12): 1742-6.
46. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008; 40(5): 638-45.
47. Qi L, Cornelis MC, Kraft P, Stanya KJ, Linda Kao WH, Pankow JS, et al. Genetic variants at 2q24 are associated with susceptibility to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(13): 2706-15.
48. Vissing H, Aagaard L, Tommerup N, Boel E. Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3. *Genomics*. 1994; 24(3): 606-8.
49. Serveaux-Dancer M, Jabaudon M, Creveaux I, Belville C, Blondonnet R, Gross C, et al. Pathological implications of Receptor for Advanced Glycation End-Product (AGER) gene polymorphism. *Dis Markers*. 2019; 2019: 2067353.
50. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, et al. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics*. 1994; 23(2): 408-19.

51. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Solivera J, Garcia-Rios A, Perez-Caballero AI, Lovegrove JA, et al. Top single nucleotide polymorphisms affecting carbohydrate metabolism in metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(2): E384-9.
52. Ghafouri-Fard S, Noroozi R, Musavi M, Taheri M. Association analysis between genomic variants within advanced glycation end product specific receptor (AGER) gene and risk of breast cancer in Iranian women. *Heliyon*. 2019; 5(10): e02542.
53. Pan H, He L, Wang B, Niu W. The relationship between RAGE gene four common polymorphisms and breast cancer risk in northeastern Han Chinese. *Sci Rep*. 2014; 4: 4355.
54. Yu X, Liu J, Zhu H, Xia Y, Gao L, Li Z, et al. An interactive association of advanced glycation end-product receptor gene four common polymorphisms with coronary artery disease in northeastern Han Chinese. *PloS one*. 2013; 8(10): e76966.
55. Kazakova EV, Chen M, Jamaspishvili E, Lin Z, Yu J, Sun L, et al. Association between RBMS1 gene rs7593730 and BCAR1 gene rs7202877 and Type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Acta Biochim Pol*. 2018; 65(3): 377-82.
56. Aggarwal P, Bhavesh NS. Hinge like domain motion facilitates human RBMS1 protein binding to proto-oncogene c-myc promoter. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(10):5943-55.
57. Dankert JT, Wiesehofer M, Wach S, Czyrnik ED, Wennemuth G. Loss of RBMS1 as a regulatory target of miR-106b influences cell growth, gap closing and colony forming in prostate carcinoma. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 18022.
58. Lou S, Meng F, Yin X, Zhang Y, Han B, Xue Y. Comprehensive Characterization of RNA Processing Factors in Gastric Cancer Identifies a Prognostic Signature for Predicting Clinical Outcomes and Therapeutic Responses. *Front Immunol*. 2021;12: 719628.
59. Zhu XW, Deng FY, Wu LF, Tang ZX, Lei SF. Functional mechanisms for type 2 diabetes-associated genetic variants. *J Diabetes Complications*. 2015; 29(4): 497-501.
60. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The J Clin Invest*. 2006; 116(7): 1793-801.
61. Wang Q, Chang W, Yang X, Cheng Y, Zhao X, Zhou L, et al. Levels of miR-31 and its target genes in dermal mesenchymal cells of patients with psoriasis. *Int J Dermatol*. 2019; 58(2): 198-204.
62. Qiao D, Hu C, Li Q, Fan J. Circ-RBMS1 Knockdown Alleviates CSE-Induced Apoptosis, Inflammation and Oxidative Stress via Up-Regulating FBXO11 Through miR-197-3p in 16HBE Cells. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021; 16: 2105-18.
63. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*. 2013; 273(2): 114-27.

64. Sikhayeva N, Iskakova A, Saigi-Morgui N, Zholdybaeva E, Eap CB, Ramanculov E. Association between 28 single nucleotide polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in the Kazakh population: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2017; 18(1): 76.

APÊNDICE A- MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da amostra

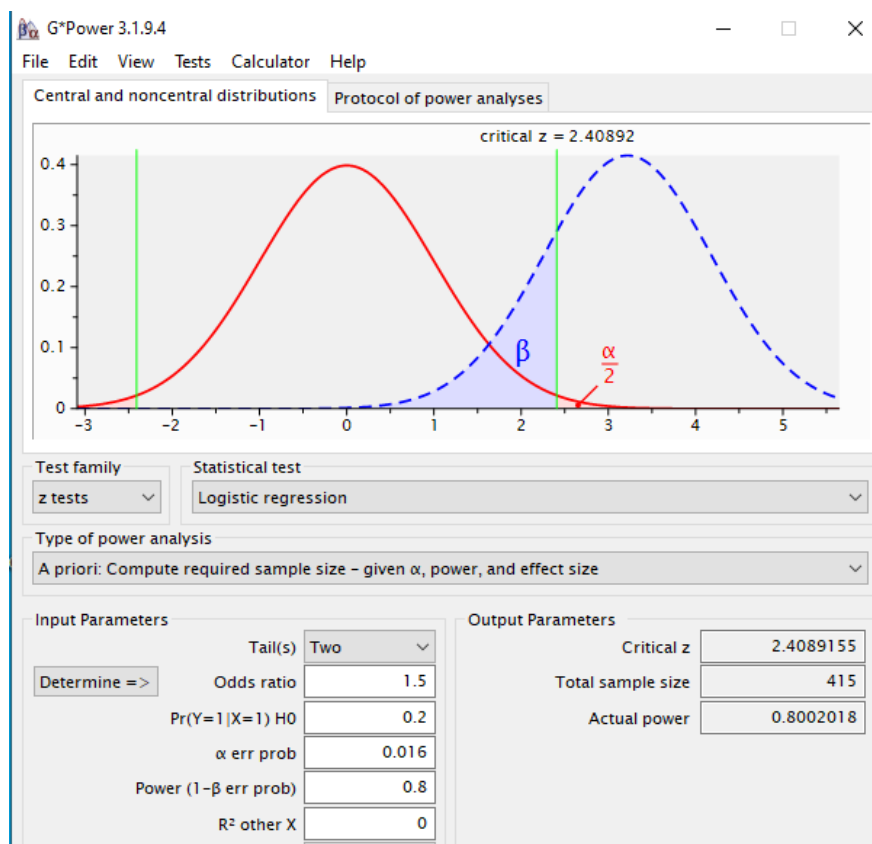
Este estudo tem a aprovação do comitê de Ética em Pesquisa em humanos da FOAr – UNESP Protocolo 50/60 (Anexo A). Os indivíduos com potencial para participarem desta pesquisa foram recrutados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Após esclarecer a natureza e os objetivos desta pesquisa, os indivíduos que mostraram interesse em participar foram solicitados a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e foram examinados periodontalmente por periodontistas ligados à esta pesquisa que estavam devidamente calibrados.

Os indivíduos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM) tiveram tal diagnóstico do médico Clínico Geral ou Endocrinologista que realizava seu tratamento e acompanhamento, sendo que muitos foram encaminhados à FOAr pelas Unidades Básicas de Saúde.

Após ser verificado que o paciente se enquadrava nos critérios de inclusão para os parâmetros periodontais, este era instruído a realizar um exame de sangue em data pré-agendada. Todos os participantes foram orientados a realizarem um jejum de ao menos 8 horas antecedentes à realização do exame de sangue, e foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas: Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC - UNESP) para realização gratuita de exames bioquímicos.

Para calcular o tamanho da população necessária para que o estudo tenha poder suficiente de atestar a associação do(s) alelo(s) com a P foi utilizado o programa *G*Power Calculator*, versão 3.1.9.4¹, considerando os parâmetros: regressão logística; *two tail*, OR: 1.5; $\Pr(Y=1/X=1) H_0 = 0,2$; alfa de 0,016 ($p=0,05/3$ SNPs) e poder de 80%, $R^2 = 0$. Este cálculo resultou em uma amostra total de 415 pacientes (Figura 1). Com o “*Total sample size*” de 415, considerando 3 grupos teríamos o valor por grupo de 138,3. Arredondando para 139 pacientes por grupo, a amostra total seria de 417 pacientes. Deste modo, como cada um dos grupos estudados aqui é maior que 138, o nível de confiança do nosso estudo ficou maior que 80%, demonstrando suficiente poder estatístico para nossos resultados de associação genética.

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



Fonte: Figura gerada pelo programa *G*Power Calculator* 3.1.9.4¹.

Anamnese, Exame Físico e Periodontal

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese completa para avaliar o histórico de saúde geral e bucal. Além disso também foram submetidos a exame físico para avaliar: circunferência abdominal (cm), proporção cintura/quadril, peso (kg) e altura (m) para obtenção do índice de massa corporal (IMC) em kg/m² de cada indivíduo.

Foi registrado o histórico do paciente com relação a seus hábitos tabagistas. De acordo com Miyake et al. (2014)², os pacientes foram considerados como: nunca fumantes, ou com histórico de tabagismo (ou *ever smoked*, incluindo pacientes fumantes e ex-fumantes). Foram considerados fumantes indivíduos que fumavam diariamente por ao menos por 1 ano; e ex-fumantes aqueles que pararam de fumar há pelo menos 1 ano.

O exame periodontal foi realizado com sonda periodontal (tipo Williams - Trinity® – Campo Mourão, Paraná, Brazil), e foi composto de 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.

- Índice de placa visível: presença ou não de placa bacteriana visível a olho nu, após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes³
- 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 dente³
- 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 30 segundos depois de mensurada a profundidade de sondagem⁴
- 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 em dois diferentes grupos conforme sua condição periodontal, de acordo com os critérios definidos pela CDC/AAP (*Centers for Disease Control and Prevention/ American Academy of Periodontology*)^{5,6}, Tabela 1. Tais critérios periodontais já foram utilizados em estudos de polimorfismos genéticos, incluindo estudos do tipo GWAS para Periodontite^{7,8}.

Tabela 1 - Classificação da Periodontite, de acordo com os critérios definidos pela CDC/AAP

Definição Clínica				
	Classificação	NI		PS
Grupo Healthy	Periodontite leve e Saudáveis	Não se enquadram nos critérios de periodontite severo ou moderada		
Grupo Periodontitis	Periodontite moderada	≥ 2 sítios com Nli ≥ 4mm	E	≥ 2 sítios com PSi ≥ 5mm
	Periodontite Severa	≥ 2 sítios com Nli ≥ 6mm	E	≥ 1 sítio com PSi ≥ 5mm

*Exclusão de terceiros molares. P: periodontite; PSi: profundidade de sondagem interproximal; Nli: nível de inserção interproximal.

Fonte: Tese Doutorado Thamiris Cirelli⁹.

Avaliação Exames Bioquímicos

Todos os participantes deste estudo foram instruídos a realizar jejum de ao menos 8 horas previamente ao encaminhamento para o Laboratório de Análises Clínicas: Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC - UNESP) para coleta de sangue por punção venosa para realização gratuita dos seguintes exames bioquímicos: Hemograma (ABX Micros 60), Insulina (método quimiluminescência), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), HbA_{1c} (método de imunoensaio 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). Foi utilizado 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)¹⁰:

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

De todos os resultados dos exames de sangue, uma cópia era entregue para o paciente. Os pacientes já diagnosticados com T2DM que participaram deste estudo levavam tais resultados para o médico Clínico Geral ou Endocrinologista que realizava seu acompanhamento, beneficiando-se destes resultados para avaliação do seu tratamento. Referente aos pacientes participantes com Periodontite, ao recebermos os resultados dos exames

bioquímicos, quando observávamos resultados alterados do perfil glicêmico e lipídico, instruíamos o mesmo a buscar orientação médica, levando os resultados desses exames.

Conforme sua condição periodontal, os indivíduos foram classificados em grupos de acordo com a Tabela 1. Os indivíduos sem T2DM apresentaram glicemia de jejum ≤ 99 mg/dL e HbA1c $\leq 5.6\%$ ¹¹. Considerando o diagnóstico médico, os portadores de T2DM apresentaram glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e foram divididos de acordo com o nível de hemoglobina glicada (HbA1c) em:

- metabolicamente compensados os que apresentaram HbA1c $\leq 7.0\%$ e $\geq 5.8\%$ ¹¹;
- metabolicamente descompensados os pacientes com T2DM que apresentarem HbA1c $\geq 7,1\%$ ¹¹.

Os pacientes foram divididos conforme seus níveis glicêmicos e seu perfil periodontal nos seguintes Grupos:

- **P+T2DM** (n=206) – Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite (moderada ou severa);
- **Periodontitis** (n=346) – Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e com periodontite severa ou moderada;
- **Healthy** (n=345) - Indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 e sem periodontite.

Para os resultados do perfil lipídico, foram considerados como dislipidêmicos os pacientes que apresentaram alterados pelo menos um dos seguintes parâmetros lipídicos, de acordo com a Sociedade Europeia de Aterosclerose e Federação Europeia de Química Clínica e Medicina Laboratorial¹²:

- Colesterol Total (CT): Considerado alto para valores ≥ 190 mg/dl.
- LDL (Low density lipoprotein): Considerado alto para valores ≥ 115 mg/dl.
- HDL (High density lipoprotein): Considerado baixo para valores:
 - Homens ≤ 40 mg/dl;
 - Mulheres ≤ 45 mg/dl.

- Triglicérides (TG): Considerado alto para valores ≥ 150 mg/dl.

Critérios de Inclusão e Exclusão para cada grupo estudado

Referente ao Grupo P+T2DM:

- CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: indivíduos com T2DM acima de 30 anos, de ambos os sexos, com pelo menos 15 dentes na cavidade bucal e sem distinção grupo étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado). Apresentar periodontite conforme descrito na página anterior.
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: indivíduos com história de hepatite e infecção por HIV, com anemia, com pré-medicação antibiótica nos últimos 6 meses ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Referente ao Grupo *Periodontitis*:

- 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 étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado). Apresentar periodontite conforme descrito na página anterior.
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: pacientes com história de diabetes, hepatite e infecção por HIV, com pré-medicação antibiótica recente ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, além de pacientes grávidas ou em lactação.

Referente ao Grupo *Healthy*:

- 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 étnico-racial (pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é difícil em um país altamente miscigenado). Sem presença de periodontite crônica conforme descrito na página anterior.
- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: pacientes com hepatite e infecção por HIV, com pré-medicação antibiótica recente 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 8M¹¹. 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).

Genotipagem

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 *repórter*” 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

Os dados demográficos e clínicos foram submetidos a análise estatística descritiva e analítica por meio do software IBM SPSS Statistics 20.0, SNPstats, BioEstat 5.0 e GraphPad Prism 8.4.3. Inicialmente os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de D'Agostino & Pearson, e em seguida, aplicados testes não paramétricos (comparação múltipla pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). O teste qui-quadrado foi usado para variáveis categóricas (sexo e tabagismo). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar 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.

A fórmula de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi aplicada às frequências genótípicas entre os sujeitos de controle para testar quaisquer desvios do equilíbrio genotípico esperado usando a adequação do qui-quadrado.

As diferentes variáveis independentes binárias (Grupo Healthy vs. *Periodontitis*; Grupo Healthy vs. Grupo *Periodontitis* moderada ; Grupo Healthy vs. Grupo *Periodontitis* severa) foram usadas para determinar a associação entre cada SNP e o diagnóstico de periodontite e da T2DM. Todas as análises de associação de caso-controle foram realizadas, as quais incluíram associações alélicas e genótípicas. Os genótipos foram categorizados em três Grupos (alelo homozigoto principal – 11. Heterozigoto – 12. E variante homozigoto – 22). Diferentes graus de gravidade da doença (moderada ou grave) foram avaliados pelo teste do qui-quadrado em quatro modelos: i) alelo 1 *versus* 2; ii) genótipo 11 *versus* 12 *versus* 22 (modelo aditivo); iii) genótipo 11 + 12 *versus* 22 (modelo dominante); e iv) genótipo 11 *versus* 12 + 22 (modelo recessivo).

A associação entre cada SNP com periodontite (moderada e severa) ou T2DM (compensada ou descompensada) foi estimada como odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% por meio de regressão logística múltipla ajustada por idade, sexo e tabagismo. Além disso, os polimorfismos genéticos foram avaliados, através do modelo de regressão logística, separadamente pelo sexo dos pacientes, para investigar a suscetibilidade à P, ajustada por idade e tabagismo.

REFERÊNCIAS*

1. 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.
2. 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.
3. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4): 229-35. 151.
4. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971; 15(2): 107-13.
5. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2007; 78(7 Suppl): 1387-99.
6. 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.
7. 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. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(11): 2312-24.
8. 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. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(11): 977-85.
9. Cirelli T. Investigação da suscetibilidade genética à periodontite crônica associada ao diabetes mellitus tipo 2 [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
10. Santos RD; Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia [III Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Guideline of Atherosclerosis Prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia]. *Arq Bras Cardiol*. 2001;77 Suppl 3 :1-48.
11. American Diabetes A. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes care*. 2021; 44(Suppl 1) :S73-S84.
12. Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S, Kolovou G, Baum H, Bruckert E, et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points—a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J*. 2016 ; 37(25) : 1944-58

* 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>

ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa

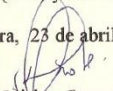
 

Certificado

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

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 24 de março de 2022

Arles Naisa Amaral Silva