NÍVEA MARIA DE FREITAS

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DOS GENES IL-1A (-889) E TNFA (-308) E A PERIODONTITE AGRESSIVA

São Paulo

2004

Nívea Maria de Freitas

Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador:Prof.Dr.Roberto Fraga Moreira Lotufo

São Paulo

2004

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Freitas, Nívea Maria de
Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva em indivíduos brasileiros brancos / Nívea Maria de Freitas; orientador Roberto Fraga Moreira Lotufo. – São Paulo, 2004.
71p : tabs., figs.; 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Periodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Polimorfismo – Doenças periodontais – Associação 2. Periodontite – Fatores genéticos – Relação 3. Periodontia

CDD 617.632
BLACK D64

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Freitas NM Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

São Paulo, / / 2004

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Cida e Rubens**, que com todo amor, dedicação e apoio me ajudaram a cumprir mais esta etapa na minha vida,

Ao meu irmão **Reinaldo**, pela amizade, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida,

Ao meu marido **Clécio**, que com todo o seu amor, companheirismo, compreensão e inesgotável paciência esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando ao longo do período de elaboração deste trabalho,

Às minhas afilhadas **Giovanna** e **Clara Alissa**, pela alegria de vocês existirem.

Dedico com muito amor este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo**, a quem muito admiro desde os tempos de graduação, por sua competência, sua tranqüilidade, seu incentivo e principalmente por sua confiança e apoio constantes. Meu agradecimento por ter acreditado que este trabalho era possível.

À **Prof. Dra. Ana Vitória Imbronito**, minha amiga, pela ajuda contínua, pela sua dedicação à profissão, pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades pessoais e profissionais.

Ao **Prof. Ass. Fábio Daumas Nunes**, pela sua dedicação e ensinamentos, pela sua confiança, apoio e amizade, muito obrigada.

Ao **Dr. Ricardo Wagner Modes**, pela confiança, apoio, amizade e exemplo que é para mim.

À Doutoranda **Adriana Neves** pela amizade e agradável convívio durante a elaboração deste trabalho. Sua colaboração tornou possível este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, pela oportunidade de integrar este curso. Agradeço a você pelos ensinamentos concedidos para a minha formação.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOUSP, **Prof. Ass. Cesário Antônio Duarte, Prof. Ass. Luís Antônio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Dr. Giorgio de Micheli, Prof. Dr. Koto Nakae, Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti, Profa. Dra. Rosana Gerab. Tramontina, Profa. Dra. Sívia Rosana Carneiro Soares, Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, pelos valiosos ensinamentos e agradável convívio durante todo o curso de graduação e de pós-graduação.

Ao **Prof. Titular José Hildebrando Todescan**, por ter dedicado sua vida à Disciplina de Periodontia.

Aos meus colegas de Mestrado: **Ariana Soares Rodrigues, Fernando Peixoto Soares, Débora Biscaro Garcia, Juliana Assef Ganhito, Fernando Hayashi, Ana Karina Pinto de Andrade, Carlos Cheque Bernanrdo, Christiane Watanabe Yorioka, Gláucia Santos Zimmermann, Karla Zanini Kantorski, Paula Marin Varella e Luciana Moreira Lima Safioti** pela amizade e companheirismo durante o transcorrer do curso.

À **Profa. Dra. Luciana Saraiva**, agradeço pela convivência durante todos estes anos e pela força em todos os momentos

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, pela amizade, incentivo e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos da Disciplina de Peridontia: **Marina Clemente Conde, Ilíria S. Feist, Alessandra Quedas Feraro, Eliane Matsura, Dácio Pântano Júnior, Cássio V. Carvalho**, pela amizade e companheirismo constantes.

À minha amiga e auxiliar na Clínica de Pós-Graduação **Maria Christina de Miranda Matias** meu especial agradecimento e carinho por todos os maravilhosos momentos que compartilhamos juntas.

As secretárias da Disciplina de Periodontia **Gilmara Luisa Hortêncio, Márcia Maria dos Santos e Simone Ciafreis**, pela amizade e pela ajuda sempre pronta em qualquer momento.

Às minhas amigas e amigos do Laboratório de Patologia Molecular: **Elena Riet Correa Rivero, Adriana Etges, Fernanda Campos, Fabrício Bitu, Luciana F. Matizonkas, Tatiana Libório e Cláudia Caza**l pela amizade e atenção carinhosa dispensada.

À **Dra. Maria das Graças da Silva Valenzuela**, pelos ensinamentos e pela agradável convivência no Laboratório de Patologia Molecular.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Patologia Molecular **Lineu Perrone Júnior e Ricardo Shieh**, agradeço a amizade e as gentilezas.

As secretárias da Disciplina de Patologia Bucal **Zilda Alves e Néia Barbosa** pela atenção tantas vezes concedida.

Às técnicas do Laboratório de Patologia Bucal **Edna Toddai e Patrícia Goldino Leonel** pelos momentos compartilhados.

À bibliotecária Aguida pelo auxílio na revisão deste trabalho.

A todos os pacientes que participara desta pesquisa.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), que tornou viável a realização deste estudo através da concessão do Auxílio á Pesquisa, processo 02/04015-8.

Agradeço a todos aqueles que mesmo não citados, de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus familiares pela compreensão e apoio indispensáveis durante toda a minha vida.

Freitas NM. Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

RESUMO

A periodontite agressiva (PAg) compreende um grupo de doenças periodontais raras caracterizadas por rápida destruição dos tecidos periodontais, em indivíduos jovens e que geralmente não apresentam doenças sistêmicas. Estudos em populações e em famílias indicaram que fatores genéticos possuem influência na susceptibilidade a periodontite agressiva. Os polimorfismos genéticos da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral-α (TNF-α) foram associados com o aumento da severidade da periodontite crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva. Foram selecionados 60 indivíduos não fumantes, sendo 30 portadores de periodontite agressiva e os outros 30 sem doença periodontal. O polimorfismo genético foi analisado utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase e análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Foi observado que a freqüência do genótipo 1/1 para IL-1A foi de 63,3% no grupo controle e de 56,7% no grupo teste. A avaliação do genótipo 1/2 mostrou uma freqüência de 26,7% no grupo controle e de 40% no grupo teste. O genótipo 2/2 ocorreu com uma freqüência de 10% no grupo controle e de 3,3% no grupo teste. O genótipo 1/1 para TNFA estava presente em 73,3% do grupo controle e em 80% do grupo teste. O genótipo 1/2 ocorreu com freqüência de 20% em ambos os grupos. O genótipo 2/2 foi encontrado em 6,7% dos controles e não foi detectado no grupo

teste. Em relação aos alelos, o alelo 1 apresentou freqüência de 76,7% e o alelo 2 de 23,3% para ambos os grupos, para o gene IL-1A (-889). E para o gene TNFA (-308) o alelo 1 ocorreu com freqüência de 83,3% no grupo controle e de 90% no grupo teste e o alelo 2 de 16,7% no grupo controle e 10% no grupo teste. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos, para ambos os genes, entre os dois grupos estudados. Não foi encontrada associação entre a periodontite agressiva e o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) na população estudada.

Palavras-Chave: Periodontite agressiva, Interleucina-1, Fator de necrose tumoral-alfa, polimorfismo genético

Freitas NM. Evaluation of IL-1A (-889) and TNFA (-308) gene polymorphisms in aggressive periodontitis [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

ABSTRACT

Agressive periodontitis (AgP) is a relatively uncommon form of periodontal disease characterized by a rapid destruction of the periodontal supporting tissues in young adults who are usually systemically well. The results of population and family studies indicate that genetic factors seem to have a strong influence on susceptibility to AP. Genetic polymorphism at the interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha (TNFA) were associated with the increase on the severity of chronic periodontitis. The aim of this study was to explore a possible association between IL-1A and TNFA genotypes in Brazilian white Caucasian patients with aggressive periodontitis. Sixty nonsmoking subjects, 30 patients and 30 periodontal healthy controls were included in the study. All subjects were systemically healthy. Two polymorphisms, IL-1A (-889) and TNFA (-308), were analyzed by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The 1/1 genotype for IL-1A was present in 63.3% of the controls and in 56.7% of the aggressive periodontitis patients. The genotype 1/2 was present in 26.7% of the controls and in 40% of the patients. The 2/2 genotype was present in 10% of the controls and in 3.3% of the diseased subjects. The 1/1 genotype for the TNFA was present in 73.3% of the controls and in 80% of the patients. The genotype 1/2 was present in the 20% of both groups. The genotype 2/2 was present in 6.7% of the controls and was not detected in the patients group. With regard to the IL-1A (-889) genotype, 76.7% of controls and patients were positive for

allele 1. Allele 1 of the TNFA (-308) polymorphism was carried by 83.3% of the controls and 90% of the patients and allele 2 was carried by 16.7% of the controls and 10% of the patients. Statistical analysis revealed no significant difference in the distribution of genotypes for both genes between the two groups. No association was found between AgP and the IL-1A (-889) and TNFA (-308) polymorphisms investigated in the population presented here.

Key-works: Aggressive periodontitis; interleukin-1, Tumor necrosis factor-alpha; polymorphism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1A (-889) 41
Figura 4.2 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene TNFA(308) 41
Figura 5.1 - Gel de poliacrilamida 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1A (-889) 48
Figura 5.2 - Gel de poliacrilamida 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene TNFA(308) 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Relação dos iniciadores, enzimas de restrição utilizadas e os fragmentos 38
Tabela 5.1 - Resultados da comparação dos grupos com relação ao sexo 44
Tabela 5.2 - Resultados da comparação dos grupos com relação à idade 44
Tabela 5.3 - Número de pacientes, média, mediana, erro padrão, desvio padrão, valores máximo e mínimo entre os dois grupos quanto ao número total de dentes e de dentes afetados pela doença 45
Tabela 5.4 - Freqüência dos genótipos para IL-1A (-889) e alelos nos grupos controle e teste 46
Tabela 5.5 - Freqüência dos genótipos para TNFA (-308) e alelos nos grupos controle e teste 46
Tabela 5.6- Concordância entre os resultados dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) 47

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µg	unidade de medida referente a 1 micrograma
µL	unidade de medida referente a 1 microlitro
µM	unidade de concentração molar referente a 1 micromolar
A	refere-se ao nucleotídeo Adenina
AAP	"American Academy of Peridontology" / Academia Americana de Periodontia
APS	persulfato de amônia
C	refere-se ao nucleotídeo Citosina
DNA	"deoxyribonucleic acid" / ácido desoxirribonucléico
dNTP	solução de 2'-deoxinucleotídeos 5'-trifosfato: dATP, dTTP, dCTP e dGTP / deoxinucleotideo trifosfato
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EDTA	"Etylenediamine-Tetraacetic Acid" / ácido etileno-diaminotetracético
et al.	"et alli" – referência em latim que significa "e outros"
G	refer-se ao nucleotídeo Guanina
HCl	ácido clorídrico
HIV	"Human immudeficiency vírus" / vírus da imunodeficiência adquirida

IL	Interleucina
IL-1A	refere-se ao gene de mesmo nome
IL-1α	Interleucina - 1alfa
IP	índice de placa
KCl	cloreto de potássio
M	Molar ou molaridade
mA	miliampere
mL	unidade de medida referente a 1 mililitro
mM	unidade de medida referente a 1 milimolar
Mg	magnésio
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCI	nível clínico de inserção
ng	unidade de massa referente a 1 nanograma
PA	Periodontite agressiva
pb	pares de bases
PBS	tampão salino
PCR	“polymerase chain reaction” / reação em cadeia da polimerase
PCS	profundidade clínica de sondagem
pH	potencial hidrogeniônico
pM	unidade de medida referente a 1 picomolar
q.s.p	quantidade suficiente para
RFLP	“restriction fragment length polymorphism”
Rpm	rotações por minuto

SDS	sulfato de dodecil sódio
SS	sangramento à sondagem
T	refere-se ao nucleotídeo Timina
TAE	solução de Tris-HCl e EDTA
TNFA (-308)	refere-se ao gene de mesmo nome
TNF-α	“Tumor necrosis factor-alpha” / Fator de necrose tumoral-alfa
TEMED	N,N,N’,N’-tetrametiletilnodiamino
Tris	TRIS-Hidroximetil-Aminometano
Tris-HCl	TRIS-Hydroximetil-Aminometano/Ácido clorídrico
UV	ultra-violeta
V	Volts
W	Watts

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DA LITERATURA 20
2.1 Classificação, etiologia e prevalência da Periodontite Agressiva (PAg) 20
2.2 Aspectos genéticos associados à doença periodontal 23
2.3 Associação entre Interleucina-1 (IL-1) e a PAg 26
2.4 Associação entre o Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e a PAg 30

3 PROPOSIÇÃO 32

4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 Seleção da amostra 33
4.2 Coleta de saliva 34
4.3 Digestão enzimática 35
4.4 Extração do DNA 36
4.5 Quantificação 36
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 37
4.7 Análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) 39
4.8 Análise dos resultados 40
4.9 Análise estatística 42

5 RESULTADOS 44

6 DISCUSSÃO 50

7 CONCLUSÃO 58

REFERÊNCIAS 59

ANEXOS 67

APÊNDICES 69

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais constituem uma variedade de condições patológicas que afetam os tecidos gengivais e os tecidos de suporte do dente levando, eventualmente, à perda do elemento dental. São de etiologia complexa, mas está bem documentado pela literatura, que o principal fator etiológico é o biofilme bacteriano.

Bactérias patogênicas são essenciais para iniciar as doenças periodontais, mas cada paciente responde diferentemente à agressão bacteriana. Apenas 20% da variabilidade na expressão das doenças periodontais pode ser explicada pelo componente bacteriano da doença (HART; KORNMAN, 1997). Segundo dados da literatura, as diferenças clínicas na severidade e prevalência da periodontite podem ser explicadas pela presença de fatores ou indicadores de risco, tal como: idade, padrão de higiene bucal, fumo, diabetes, microrganismos periodontopatogênicos, estresse, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, fatores genéticos e outros (NUNN, 2003).

A influência genética na periodontite tem sido determinada a partir de uma variedade de fontes. Estudos em gêmeos, de história natural da doença, de anticorpos, de citocinas, e outros fatores apóiam o fato que existe um forte componente genético na periodontite. Fatores genéticos modificam a resistência e susceptibilidade para a doença periodontal e estima-se que cerca de 38 a 82% da

variação ocorrida na progressão e severidade da doença seja atribuída a fatores genéticos (GONZALES et al., 2003).

A investigação da relação entre fatores genéticos e doença periodontal é de intenso valor, pois este conhecimento permitirá a identificação de pacientes ou populações com maior susceptibilidade de desenvolver a doença e, por conseqüência, o desenvolvimento de um programa de prevenção ou a antecipação do tratamento periodontal, aumentando as chances de resultados favoráveis.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a presença do polimorfismo nos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308), em pacientes com periodontite agressiva, utilizando a técnica de PCR-RFLP, que se consistui em um método rápido e eficiente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação, etiologia e prevalência da Periodontite Agressiva (PAg)

A PAg compreende um grupo de doenças periodontais raras, com manifestações clínicas freqüentemente graves, que acometem indivíduos jovens, progridem rapidamente e com distribuição familiar. O diagnóstico de uma PAg requer a exclusão da presença de doenças sistêmicas que podem prejudicar gravemente as defesas do hospedeiro e levar à perda prematura dos dentes.

A PAg é dividida em localizada ou generalizada, baseada na extensão, severidade e tipo de dente afetado. Na periodontite agressiva localizada (PAgL), os indivíduos apresentam perda de inserção clínica nos primeiros molares e incisivos permanentes, havendo necessariamente o comprometimento de, no mínimo, um primeiro molar. A classificação de doença localizada implica que não mais que dois dentes, além dos primeiros molares e incisivos, sejam afetados (American Academy of Periodontology - AAP,1999).

Por outro lado, a periodontite agressiva generalizada (PAgG) caracteriza-se por apresentar perda de inserção clínica severa e rápida, envolvendo primeiros molares e incisivos e no mínimo outros três dentes permanentes. Geralmente afeta indivíduos até 30 anos de idade (AAP, 1999). Ambas as formas de PAg mostram

uma progressão rápida e, na ausência de diagnóstico e tratamento, o dente afetado mostra um aumento da mobilidade e pode eventualmente ser perdido. Embora existam casos na literatura onde a doença, aparentemente, comece como uma forma generalizada, freqüentemente este tipo de periodontite inicia-se como localizada e progride para a forma generalizada (ALBANDAR et al., 1997a).

Certas formas de periodontite que atingem jovens eram agrupadas e conhecidas como periodontite de incidência precoce (PIP). Classicamente, as várias formas de PIP eram reconhecidas com base na idade de manifestação e na forma como se distribuíam as lesões na dentição: periodontite pré-puberal (PPP), periodontite juvenil localizada (PJL), periodontite juvenil generalizada (PJG) e periodontite de progressão rápida (PPR). No World Workshop de 1999, a AAP divulgou uma nova classificação das doenças periodontais, propondo a mudança do termo PIP para periodontite agressiva. Na seqüência faremos referências às antigas denominações para não alterar as características originais das publicações.

A microbiota associada à PIP é composta principalmente por bacilos Gram-negativos, capnofílicos e anaeróbios (SLOTS, 1979). A presença do bacilo Gram-negativo *Actinobacillus actinomycetemcomitans* está freqüentemente associada à PJL. A prevalência deste microrganismo em pacientes com PJL pode variar de 89% a 100% (MANDELL; SOCRANSKY, 1981; SLOTS; REYNOLDS; GENCO, 1980). No Brasil, a associação entre PJL e a presença da bactéria *A. actinomycetemcomitans* é altamente significante (TINOCO et al., 1997). Este microrganismo é tido como agente etiológico primário na maioria dos casos de PJL. Esta indicação como agente etiológico baseia-se no fato que pacientes com PAL possuem resposta humoral elevada para o *A. actinomycetemcomitans*, quantidade elevada destes

microrganismos nas lesões de PJL e ausência ou números insignificantes dos mesmos em sítios saudáveis (CHRISTERSSON et al., 1985).

As lesões de PJG abrigam uma microbiota com composição diferente daquela encontrada na PJL. A *Porphyromonas gingivalis* é a forma mais comumente isolada e constitui 13 a 20% do total de células bacterianas. Outros microrganismos comumente encontrados são *F. nucleatum, C. rectus, T. denticola*, *Eikenella corrodens, Prevotella intermedia, Capnocytophaga e Neisseria*. O *A. actinomycetemcomitans* também está presente, porém em freqüências mais baixas do que na PJL.

A prevalência da PAg parece ser influenciada pela região geográfica, pelo grupo étnico, pela raça e pelo sexo. Estima-se que a prevalência de PAg seja de 0,4 a 0,8% na América do Norte, 0,3 a 1% na América do Sul, de 0,1 a 0,5% na Europa, de 0,5 a 5% na África e de 0,4 a 1% na Ásia (ALBANDAR; TINOCO, 2002).

No Brasil, verifica-se um número reduzido de estudos epidemiológicos que caracterizem dados prevalentes das periodontites em adolescentes e adultos jovens. Gjermo et al. (1984) utilizaram uma amostra de 304 jovens de 15 anos de idade, residentes em uma área de baixas condições sócio-econômica de Belo Horizonte. A avaliação foi feita utilizando-se a medida da distância entre a junção cemento-esmalte e a crista alveolar, através de radiografias interproximais. O diagnóstico para PJL foi definido como perda óssea vertical > 2mm em pelo menos três primeiros-molares. Os resultados mostraram que 2,6% dos adolescentes possuíam periodontite juvenil localizada. Albandar; Buischi; Barbosa (1991) examinaram 222 crianças com idade de 13 anos de uma escola particular em uma área de condições sócio-econômica alta em São Paulo utilizando os mesmos critérios de Gjermo et al (1984). Os resultados mostraram que 5,4% dos indivíduos tinham perda óssea

vertical em um ou mais sítios e que 1,3% das crianças examinadas possuíam perda óssea vertical em pelo menos dois primeiros molares. Tinoco et al. (1997) descreveram uma ampla variação na prevalência de PJL em três cidades brasileiras (Belo Horizonte, Rio de Janeiro e Votorantim). Foram examinados 7843 adolescentes, com idade de 12 a 19 anos e de condição sócio-econômica baixa. Os pacientes com PJL foram identificados através de um rigoroso exame clínico (PCS ≥ 5mm) e de radiografias interproximais. A prevalência encontrada foi em média de 0,3% com uma variação de 0,1 – 1,1% nas diferentes regiões. Cortelli et al. (2002) verificaram a prevalência de 1,66% de PAgL e de 3,66% de PAgG em pacientes de 15 a 25 anos de idade da região do Vale do Paraíba – São Paulo.

2.2 Aspectos genéticos associados à doença periodontal

Embora a presença da bactéria seja essencial para o início da doença, a quantidade e os tipos destas não são suficientes para explicar as diferenças nas respostas inflamatórias e imunes e, conseqüentemente a severidade da doença periodontal (PAGE et al., 1997). Atualmente, tornou-se evidente que para a maioria das doenças crônicas existem outros fatores que não causam a doença, mas que modificam o seu curso tornando-as mais severas. Dentre estes fatores temos algumas alterações genéticas denominadas de polimorfismo, que são comumente encontrados na população (KORNMAN; DI GIOVINE, 1998). O polimorfismo é uma variação genética que pode ser caracterizada como a transição de um par de bases

de um nucleotídeo contido no segmento de DNA que codifica uma citocina (NEWMAN, 1997).

Estudos de agregação familial, de análise de ligação e em gêmeos indicaram que fatores genéticos possuem uma forte influência na susceptibilidade a PIP (HART, 1996; SCHENKEIN et al., 1995).

A detecção e a avaliação da extensão da agregação familial são os primeiros passos na análise genética de qualquer característica. É sabido que esta agregação significa o compartilhamento, entre indivíduos de uma mesma família, de genes e fatores do ambiente. A existência desta agregação é evidenciada pela maior semelhança fenotípica entre pares de parentes do que entre dois indivíduos não-aparentados (RICE; BORECKI, 2001).

A análise de segregação é um método para estudar dados familiares com a finalidade de se estabelecer o modo de herança de uma determinada característica, quando o efeito de um gene não pode ser medido diretamente.

Embora todas as análises de segregação para PIP evidenciem uma transmissão genética (LONG et al., 1987) elas divergem quanto o padrão de herança, mas atualmente o mais aceito é o autossômico dominante (MARAZITA et al., 1994). Embora todas as análises de segregação para PIP mostrem um padrão de transmissão Mendeliano, é provável que cada população possua um padrão de transmissão diferente, por exemplo, na população americana é possível que a forma de transmissão seja autossômica dominante, na Europa e na América do Sul seja autossômica recessiva (LÓPEZ, 1992; MARAZITA et al., 1994; SAXEN; NEVALINNA, 1984).

A posição cromossômica de um gene de maior expressão para um traço como a susceptibilidade a PAg pode ser determinada pela análise de ligação. Uma

pesquisa utilizando esta metodologia descreve a articulação da PIP com o local de ligação da vitamina D na região q do cromossomo 4 em uma grande família da população de Brandywine (BOUGHMAN et al., 1986). Estes resultados, entretanto, não foram confirmados em estudos subseqüentes com utilização de populações afro-americanas e caucasianas (HART et al., 1993) e nem por Wang et al. (1996) que sugeriram ligação genética com o antígeno leucocitário humano (HLA), região do cromossomo 6 e cromossomo 9q32-33. Estes resultados sustentam a existência de heterogeneidade nas formas de PIP.

Vários fatores genéticos têm sido sugeridos para a PAg, a maioria deles baseados em dados que implicam em reações imunológicas ou inflamatórias exageradas. Dentre estes fatores podemos citar: antígenos HLA (KASLICK et al., 1975; SOAFER, 1990), variação genética influenciando a produção de imunoglobulinas, em particular, a produção de anticorpos IgG_2 herdados de forma polimórfica de um receptor para IgG_2 (FcγRII ou CD32) (WILSON; KALMAR, 1996), genes que promovem uma reação quimiotática exagerada dos leucócitos (Van DYKE; VAIKUNTAM, 1994) e elevada produção de citocinas e prostaglandinas (SHAPIRA; SOSKOLNE; VAN, 1996; SHAPIRA et al.,1994).

Na PIP, respostas inflamatórias locais são caracterizadas por altos níveis de mediadores inflamatórios como as PgE2, IL-1α e IL-1β tanto no fluido do sulco gengival quanto no tecido (MASSADA et al., 1990; OFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993). A produção de PgE2, em particular, tem se mostrado muito elevada em pacientes com PIP, quando comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis ou com periodontite do adulto (OFFENBACHER, 1996). Outro aspecto importante foi que o aumento da concentração local de mediadores

inflamatórios na PIP estava associado com uma redução na resposta dos monócitos circulantes.

Cox et al. (1998) revelaram que muitos genes responsáveis pela produção de citocinas abrigam pequenas alterações, denominadas de polimorfismo. Estas alterações podem modificar a produção de citocinas pró-inflamatórias como as Interleucinas-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral α (TNF-α) (ALEXANDER; DAMOULIS, 1994; PAGE, 1991). Em todos os casos, é sugerido que a resposta do hospedeiro frente a agentes etiológicos bacterianos é exagerada ou deficiente, resultando em problemas periodontais em idade precoce. Esta hipótese é suportada pela observação que o número de anormalidades genéticas associadas com uma diminuição na função dos fagócitos predispõe pacientes a periodontite durante a infância (ANDERSON et al., 1985). Nenhum destes estudos foi repetido e muitos avaliaram pequenas amostras, com resultados estatísticos pouco consistentes.

2.3 Associação entre Interleucina-1 (IL-1) e a PAg

O papel das citocinas na patogênese da periodontite tem sido o objetivo de várias pesquisas (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; GEMMEL, MARSHALL; SEYMOUR, 1997). A Interleucina 1 (IL-1) está implicada na patogênese da doença periodontal devido às suas múltiplas propriedades pró-inflamatórias (GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997).

A família da IL-1 é um grupo de nove ou mais proteínas composta de IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-18 (também chamada de IL-1γ) e, recentemente, foram clonadas

IL1δ, IL1ε, IL1ζ/IL-1H4, IL1η e IL-1H1 (KUMAR et al., 2000; SMITH et al., 2000). Os genes para todos os membros da família, com exceção da IL-18, estão localizados no braço longo do cromossomo 2 (AURON; WEBB, 1994; SMITH et al., 2000).

As IL-1 são citocinas pró-inflamatórias, multifuncionais, produzidas predominantemente por macrófagos ativados por substâncias bacterianas, complexos imunes, por outras citocinas ou por linfócitos, mas também são produzidas por plaquetas, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A produção de IL-1 também pode ser ativada por TNF-α e a própria IL-1 pode estimular a sua produção. Devido à sua auto-estimulação, ela tem a capacidade de ampliar e perpetuar a resposta inflamatória e a destruição tecidual. As várias propriedades das interleucinas-1 são decorrentes de seu efeito na regulação de outros genes. A IL-1 age diretamente em um grupo de genes que são expressos durante a inflamação. Cerca de 90 genes são afetados por IL-1 e entre estes estão: genes para outras citocinas, para receptores de citocinas, para fatores de crescimento, para enzimas de remodelação tecidual, para componentes da matriz extracelular e para adesão molecular (DINARELLO, 1996).

IL-1 é a citocina mais encontrada nos processos inflamatórios e está envolvida no início e na progressão de destruição do tecido conjuntivo e ósseo. Produtos bacterianos como os lipopolissacarídeos (LPS) aumentam a síntese de IL-1 (AURON; WEBB, 1994). A IL-1 proporciona o ingresso de células inflamatórias em sítios de infecção, promove reabsorção óssea, estimula a produção de fibroblastos, induze a síntese de prostaglandinas E2 (PGE2) pelos macrófagos e fibroblastos, estimula a produção de metalopreteinases que degradam as proteínas da matriz extracelular e participa da resposta imune do hospedeiro (TATAKIS, 1993).

O polimorfismo de vários genes para citocinas pode influenciar o nível de secreção destas substâncias e explicar as variações nas respostas imune-inflamatórias individuais frente a uma agressão bacteriana (KORNMAN; DI GIOVINE 1998). Recentes estudos têm indicado que o polimorfismo no gene IL-1 pode estar associado à maior severidade da doença em pacientes com periodontite crônica e com periodontite agressiva (DIEHL et al., 1999; GALBRAITH et al., 1999; GORE et al., 1998; KORNMAN et al., 1997; McDEVITT et al., 2000; PAPAPANOU et al., 2001; PARKHILL et al., 2000).

O papel do polimorfismo genético da IL-1α e da IL-1β foi avaliado em pacientes com PIP. Foram estudadas 28 famílias afro-americanas, onde 94 indivíduos apresentavam PIP e 85 não apresentavam doença periodontal e 7 famílias caucasianas com 31 sujeitos com PIP e 30 sem doença. O alelo 1 do lócus IL-1 α foi transmitido com mais freqüência que o alelo 2 nos caso de PJG. O alelo 1 do gene IL-1 β (+3953) foi também transmitido com mais freqüência que o alelo 2 para os caso de PJL. O alelo 1 do gene IL-1 β (+3953) é transmitido com mais freqüência que o alelo 1 do gene IL-1 α. Baseado nos resultados de desequilíbrio de ligação é sugerido que o polimorfismo para IL-1β é mais importante para a associação com a PJL. (DIEHL et al., 1999).

Walker et al. (2000) realizaram um estudo com a finalidade de determinar a prevalência do polimorfismo genético para IL-1α e IL-1β em 104 indivíduos afro-americanos sem doença periodontal e em 37 pacientes afro-americanos com PJL. Os resultados mostraram que o alelo 1 do gene IL-1B (+3953) aparece em 99% da população controle e em 100% dos pacientes com PJL. A prevalência do alelo 2 para ambos os genes foi de 14% para o grupo controle e de 8% para o grupo com

PJL. Dada a alta freqüência do alelo 1 para IL-1β é provável que este alelo sozinho seja um importante indicador de risco para a PIP.

Hodge; Riggio; Kinane (2001) investigaram a presença do polimorfismo do gene IL-1A(-889) em pacientes brancos de origem européia e portadores de PJG. O estudo avaliou 56 pacientes com PJG com média de idade de 31,36 anos e 48% destes pacientes eram fumantes. O grupo controle foi composto por 56 pacientes com média de 34,39 anos de idade e 29% eram fumantes. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com PJG e o grupo controle. O alelo 1 ocorreu em 66,1% do grupo teste e em 65,2% do grupo controle e alelo 2 em 33,9% do grupo teste e em 34,8% do grupo controle. O fato de alguns indivíduos serem fumantes também não influiu nos resultados, ou seja, não houve diferença entre o grupo controle e o teste.

Gonzales et al. (2003) exploraram a possível associação entre periodontite agressiva em duas diferentes populações. Vinte e oito pacientes brancos de origem européia, com média de idade de 28,9 anos e 16 pacientes da América Central, com média de idade de 27,7 anos com periodontite agressiva generalizada faziam parte do grupo teste. O grupo controle era formado por 33 pacientes brancos de origem européia (média de idade de 25 anos) e 14 pacientes da América Central. Uma similar distribuição de genótipos entre os pacientes e o grupo controle foi encontrada em ambas as populações. A presença do alelo 1 ocorreu em 100% do grupo teste em ambas as populações, enquanto 90,9% dos controles de origem européia e 92,9% dos de origem centro-americano foram positivos para o alelo 1. A freqüência do alelo 1 do gene IL-1A foi maior em pacientes com PAg de ambas as populações quando comparada com a população controle, entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significante.

2.4 Associação entre o Fator de Necrose Tumoral – α (TNF-α) e a PAg

O fator de necrose tumoral α (TNF-α) é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos, com papel biológico similar as IL-1 (ALEXANDER; DAMOULIS, 1994). Induz a secreção de colagenase, prostaglandina E2 (PGE2) e interleucina 6 (IL-6) por fibroblastos humanos e em cultura de células ósseas humanas. Possui importantes atividades imunológicas. Estimula, também, a reabsorção óssea pelos osteoclastos, embora seja 500 vezes menos potente que a IL-1 (STASHENKO et al., 1991; ALEXANDER; DAMOULIS, 1994). Está presente no fluído nos pacientes com gengivite e periodontite (ROSSOMANDO; KENNEDY; HADJI-MICHAEL, 1990). Vários estudos relatam que o polimorfismo do gene TNFA (alelo 2) está associado a doenças infecciosas e autoimunes, incluindo malária cerebral, artrite reumatóide, lúpus eritematoso e diabetes (WILSON et al., 1993).

Após o seqüenciamento da região 5'(-595 a +390) do gene humano TNFA (NEDOSPASOV et al., 1986). Wilson et al. (1992) descreveram uma mudança (polimorfismo) de base de G para A na posição -308. A digestão do produto da PCR com enzima de restrição NcoI confirmou a presença de dois alelos: alelo 1 com dois fragmentos de 87 pb e 20 pb e o alelo 2 com um único fragmento de 107 pb. A freqüência do alelo 1 foi de 84% e do alelo 2 foi de 16%. Os estudos de McGuire et al. (1994) e Warzocha et al. (1998) mostraram que a maior freqüência na presença do alelo 2 provoca um aumento nos níveis da citocina TNF-α e este fato estaria associado a um pior prognóstico para as doenças infecciosas.

Na literatura há poucos estudos sobre a associação entre o polimorfismo de gene TNFA e doença periodontal. Galbraith et al. (1998) relataram que neutrófilos

de pacientes com periodontite crônica e que apresentavam o polimorfismo do TNFA (-308) produziam maior quantidade de TNF-α, mas não houve diferença significativa na distribuição do genótipo entre os pacientes doentes e os saudáveis.

Kinane et al. (1999) estudaram a associação entre PIP e o polimorfismo dos genes TNFA (-308) e IL-10. Foram incluídos neste estudo 79 pacientes com PJG, com idade inferior a 35 anos, sistemicamente saudáveis e com perda de inserção interproximal > 5mm em pelo menos 8 dentes permanentes e 91 pacientes sem doença periodontal (grupo controle). Os resultados mostraram que não houve associação entre estes polimorfismos e a PJG.

Shapira et al. (2001) realizaram um trabalho com a finalidade de verificar a associação entre o polimorfismo do gene TNFA (-308) com periodontite agressiva. Dos 43 pacientes jovens que participaram do estudo, 16 eram portadores de PAgL e 9 de PAgG. Foi colhido 5 mL de sangue de cada indivíduo e realizada a PCR. Os resultados mostraram que 81% dos pacientes doentes apresentavam o alelo 1 e 19% o alelo 2 e entre os pacientes saudáveis 74% possuíam o alelo 1 e 26% o alelo 2. Portanto as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes e não foi possível demonstrar qualquer ligação entre o polimorfismo genético na posição -308 do gene TNFA e periodontite agressiva.

A associação entre o polimorfismo do gene TNFA (-308) e a PJG em pacientes japoneses foi estudada por Endo et al. (2001). Quarenta e seis pacientes com PJG e 107 japoneses saudáveis foram incluídos neste trabalho. A detecção do polimorfismo foi realizada pela técnica de PCR-SSOP. Os resultados mostraram que não houve diferença na freqüência do polimorfismo entre os pacientes doentes e os saudáveis e que a freqüência do polimorfismo é baixa na população japonesa.

3 PROPOSIÇÃO

Baseados nas considerações expostas anteriormente, a proposição deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer n° 140/01, protocolo 142/01 e todos os pacientes que participaram do estudo foram informados sobre a natureza do trabalho e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A).

Neste estudo caso-controle foram recrutados 60 indivíduos, sendo 30 pacientes com periodontite agressiva e com idade inferior ou igual a 30 anos. Para a forma localizada de PAg, a perda de inserção estava presente nos primeiros molares e incisivos e não envolvia mais do que dois dentes além dos citados acima. Para a forma generalizada da doença, a perda de inserção foi detectada em pelo menos três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos. A perda de inserção tanto para a forma localizada como para a generalizada foi $\geq$ 4 mm por dente afetado (AAP, 1999).

O grupo controle foi composto por 30 indivíduos com idade inferior ou igual a 30 anos e sem evidência clínica de perda de inserção $\geq$ 3 mm em nenhum dos dentes (AAP, 1999). Estes sujeitos apresentaram no mínimo 24 dentes.

A amostra foi pareada por sexo e idade.

Foi realizada uma completa investigação sobre a história médica e dental dos indivíduos, tanto do grupo teste como do controle e todos apresentaram boa saúde geral. Foram excluídos do trabalho os indivíduos com história de diabetes, mulheres grávidas ou em período de lactação, indivíduos que utilizavam antiinflamatórios de forma crônica, fumantes, indivíduos com história de hepatite e infecção por HIV.

Todos os participantes do estudo foram avaliados clinicamente por um único examinador e foram registrados os seguintes parâmetros clínicos: índice de sangramento à sondagem (SS), profundidade clínica de sondagem (PCS) em 6 sítios/dente e o nível clínico de inserção (NCI). Foram tomadas 14 radiografias periapicais para os pacientes com PAg. Os pacientes foram tratados periodontalmente e mantidos em um programa de controle e manutenção periodontal.

4.1 Coleta de saliva

Foram coletadas amostras de saliva, não estimulada, em um coletor universal estéril, sendo posteriormente transferidas para tubos eppendorf de 2mL. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C até a realização da extração do DNA. Para a coleta da saliva os pacientes foram instruídos para não comer ou escovar os dentes 30 minutos antes do exame.

4.2 Digestão enzimática

Saliva na quantidade de 500μL foi transferida para um tubo eppendorf com capacidade de 2 mL. Este material foi centrifugado por 5 minutos a 1000rpm, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado, duas vezes, com 1000μL de PBS 1X. Centrifugou-se novamente o tubo por 5 minutos a 2000rpm e o sobrenadante foi desprezado. O pellet no fundo do tubo foi novamente lavado com 1000μL de PBS 1X, centrifugado e o sobrenadante foi novamente desprezado. O pellet no fundo do tubo foi submetido à digestão enzimática com proteinase K.

Foi adicionado ao corpo de fundo de 200 a 400μL de tampão de lise estéril NaCl (cloreto de sódio) 1M; TRIS 1M [tris(hidroximetil)aminometanol], pH 8; EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,5M, pH 8; SDS 10% (sulfato de dodecil sódio) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) e proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) na concentração final de 500 μg/mL. Os tubos foram mantidos em banho Maria a 55°C e sob agitação por três a sete dias até a completa dissolução do corpo de fundo. Foi adicionada solução de proteinase K (200 – 400 μg/mL) em intervalos de 24 horas e os tubos foram invertidos pelo menos uma vez ao dia.

Após a completa dissolução do material, ou seja, quando a solução do tubo eppendorf ficou praticamente transparente, os tubos foram incubados a 95°C durante 10 minutos, para inativação da proteinase K.

4.4 Extração do DNA

A extração de DNA dos casos estudados foi realizada pelo método do acetato de amônio e do isopropanol, padronizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade De Odontologia da Universidade de São Paulo (NEVES et al., 2002).

Foram adicionados 200μL de acetato de amônio a 4M (Synth, BR) no tubo contendo o lisado, para precipitação da proteína. O tubo foi homogeneizado por 20 segundos, incubado em gelo durante 5 minutos e centrifugados a 13.000 x g por 3 minutos. A proteína precipitada foi observada como um corpo no fundo do tubo. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600μL de isopropanol 100%, homogeneizado e centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o corpo de fundo de DNA foi lavado com 600 μL de etanol 70% e centrifugado a 16.000 x g por 2 minutos. Foi removido o álcool e após a evaporação do etanol 70% à temperatura ambiente, o corpo de fundo de DNA foi dissolvido em 30 a 50 μL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, ph 8) e mantido a 4 °C até a quantificação em espectrofotômetro.

4.5 Quantificação

Foi realizada a quantificação em espectrofotômetro Beckman DU® 640 com leitura em 260/280nm utilizando uma alíquota de solução de cada amostra de DNA.

A absorvência de 260nm equivale à quantidade de DNA e a de 280nm, a de proteínas. A pureza dos extratos de DNA foi obtida pela razão de absorvência 260nm/280nm. O valor considerado ideal foi de 1,8 a 2,0.

4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA obtido foi amplificado pela técnica da PCR utilizando-se iniciadores específicos para cada gene que se desejava estudar, com seqüências obtidas da literatura, compreendendo de 18 a 30 nucleotídeos (Tabela 4.1).

Todas as reações foram feitas em tubos de 0,5 mL para PCR adicionando-se: formamida 1% (Invitrogen), tampão de PCR 1X (Tris-HCl 200mM, ph 8,4; KCl 500mM) (Invitrogen), dNTP 0,3 mM (2'- deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen), $MgCl_2$ (Invitrogen), iniciadores senso e antisenso (Invitrogen), Taq DNA 2U (Invitrogen), 100 - 300ng de DNA genômico e água estéril para um volume final de 25μL.

Para o gene IL-1A (-889) foi utilizado 2mM de $MgCl_2$, e para o TNFA (-308) foi utilizado 2,5 mM de $MgCl_2$. As quantidades de iniciadores senso e antisenso foram de 500pM para o gene IL-1A (-889) e de 250pM para o gene TNFA (-308).

As condições de ciclagem da PCR foram otimizadas para os diferentes iniciadores e como base foi utilizado, um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 38 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, associação a 50°C por 50 segundos para o gene IL-1A (-889) e a 61°C por 50 segundos para o

gene TNFA (-308), extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos finalizava a reação.

Em todas as reações de PCR foi utilizado um controle positivo e um controle negativo, constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA. O controle positivo para ambos os genes foi um caso de hiperplasia fibrosa inflamatória, o qual foi utilizado para padronização dos iniciadores.

O resultado da reação foi visualizado através da eletroforese do DNA amplificado (78 Volts por 20 minutos) em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (0,5 g/mL) e utilizando-se uma cuba horizontal com tampão de corrida TAE (Tris-acetato) 1x, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA foi utilizado um transluminador de luz ultravioleta (UV) (Fotodyne, Inc) e uma câmara fotográfica Polaroid modelo DS 4 (Fischer Biotech) com filme Polaroid tipo 667. Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de pares de base (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen), que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000 a 1000 pb.

Tabela 4.1 – Relação dos iniciadores, enzimas de restrição utilizadas e os fragmentos esperados

Gene	Senso (5' → 3')	Anti-Senso (5' → 3')	Enzima de restrição	Fragmentos
IL-1A (-889)	AAGCTTGTTCTACC ACCTGAACTAGGC	TTACATATGAG CCTTCCATG	NcoI	83pb + 16pb (alelo 1) e 99pb (alelo 2)
TNFA (-308)	AGGCAATAGGTTTT GAGGGCCAT	TCCTCCCTGCT CCGATTCCG	NcoI	87pb + 20pb (alelo1) e 107pb (alelo 2)

4.7 Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

O RFLP é baseado no padrão de fragmentos de DNA produzidos pela digestão do produto de PCR com uma endonuclease específica para a determinação de polimorfismos. A técnica do RFLP envolve a clivagem de moléculas de DNA por enzimas de restrição, a separação por eletroforese em gel dos fragmentos gerados e sua visualização em forma de bandas.

Para a análise de RFLP, tanto do gene IL-A (-889) quanto do TNFA (-308), foram utilizados 5μL do produto de PCR, digerido durante 5 horas, a 37°C, com 2U da enzima de restrição NCOI, na presença do tampão específico 1X e água estéril para um volume de 20μL.

Os fragmentos resultantes foram separados por tamanho, através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo glicerol 5% (2,6 mL TAE 10X, 5,2 mL glicerol 50%, 25 mL de acrilamida 30%, 520 μL de APS 10% e 52 μL TEMED, água milli-Q q.s.p. 50 mL). O produto da PCR foi misturado a um tampão de corrida (EDTA 10 mM, bromofenolblue 0,05% e xilenocyanol 0,05%). Foram utilizados dois padrões de pares de bases: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e 10 pb DNA Ladder (Invitrogen), utilizados para determinação do tamanho dos fragmentos. A corrida foi feita em tampão TAE 1x, durante aproximadamente 6 horas em temperatura ambiente.

Após o término da corrida, o gel foi então corado pela prata e revelado para a visualização das bandas do DNA. Inicialmente foi realizada a fixação com solução de etanol 10% e ácido acético 0,75% por 20 minutos, seguida pela impregnação

pela prata 0,2% por 30 minutos, lavagem em água milli-Q por 2 minutos e revelação com solução de Hidróxido de sódio 3% (NaOH) e formaldeído 0,03% por 20 minutos. A reação foi finalizada com solução de ácido acético 10% por 12 minutos e lavagem com água milli-Q por 12 minutos. Todos os procedimentos foram realizados no escuro e sob agitação (método modificado de BASSAM; CAETANO-ANOLLES; GRESSHOFF, 1991). Todos os géis foram escaneados para posterior análise.

4.8 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita de acordo com a literatura (KORNMAN et al., 1997; McDOWELL et al., 1995; WILSON et al. 1992) onde são observadas três possibilidades de bandas:

A - A banda cortada em dois fragmentos: indivíduos eram homozigotos para o alelo 1 (genótipo 1/1) ou

B - uma banda não cortada e a banda cortada em dois fragmentos: indivíduos eram heterozigotos (genótipo 1/2) ou

C - Apenas a banda não cortada: indivíduos eram homozigotos para o alelo 2 (genótipo 2/2 ou genótipo positivo para o polimorfismo).

Aplicando-se os conceitos descritos acima, a análise do gel de poliacrilamida a 15% mostrou fragmentos de bandas de aproximadamente 83 pb+ 16 pb (genótipo 1/1), ou de 99 pb + 83 pb + 16 pb (genótipo 1/2) ou ainda de 99 pb (genótipo 2/2) em relação ao gene IL-1A (-889). Para o gene TNFA (-308) observamos fragmentos de bandas de aproximadamente 87 pb + 20 pb (genótipo 1/1), ou de 107 pb + 87 pb + 20 pb (genótipo 1/2) ou ainda de 107 pb (genótipo 2/2). (Figuras 4.1 e 4.2)

Figura 4.1 – Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1A (-889)

Figura 4.2 – Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene TNFA (-308)

Esta análise foi feita utilizando-se os géis escaneados, em formato TIFF, RGB, 300 dpis. Após a análise dos géis as imagens foram passadas para preto e branco e adicionados textos explicativos, no programa AdobePhotoshop 5.0.

4.8 Análise estatística

Para caracterizar a amostra foram utilizadas as freqüências relativas (percentuais) e absoluta (N) das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas foram utilizadas médias e medianas para resumir as informações, e erros-padrão, desvio-padrão, mínimo e máximo para indicar a variabilidade dos dados.

Para comparar as distribuições de freqüências entre duas variáveis qualitativas foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson. O teste exato de Fischer foi utilizado nas situações onde os valores esperados foram inferiores a 5. Para valores de p menores do que 0,05 (p-valor<0,05) consideramos a associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Para compararmos os grupos com relação à variável quantitativa idade, aplicamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Foi utilizado o teste não paramétrico, pois a variável idade não apresentou distribuição normal. Para valores de p abaixo de 0,05, consideramos que os dois grupos são diferentes com relação à idade.

Para descrevermos a intensidade da concordância entre as alterações nos dois genes, utilizamos a medida Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo nos dois métodos. O Kappa corresponde a uma medida de concordância onde o valor zero indica nenhuma concordância e o valor 1 representa total concordância. Para avaliar se a concordância foi razoável, fizemos um teste estatístico para avaliar a significância do Kappa. Neste caso a hipótese a ser testada é se o Kappa é igual a

zero, o que indicaria concordância nula. No caso de rejeição da hipótese (Kappa=0) temos a indicação de que a medida de concordância é significantemente diferente de zero, o que indicaria que existe alguma concordância.

Em todas as análises foi calculado o P-Value associado à Hipótese de Nulidade (Ho) adotada em cada teste.

Os dados foram armazenados no programa MSOffice Excel versão 2000. Os dados foram analisados nos programas estatísticos: SPSS for Windows 10.0.

5 RESULTADOS

Este estudo caso-controle constou de 30 pacientes com periodontite agressiva (grupo teste) e 30 pacientes sem doença periodontal (grupo controle). A descrição das características demográficas e sua comparação em relação aos dois grupos experimentais analisados é apresentada nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1- Resultado da comparação dos grupos com relação ao sexo

			Grupo		Total
			Controle	Teste	
Sexo	Feminino	N	23	24	47
		(%)	(76,70)	(80,00)	(78,30)
	Masculino	N	7	6	13
		(%)	(23,30)	(20,00)	(21,70)
Total		N	30	30	60
		(%)	(100)	(100)	(100)

p-valor = 0,754 (teste Qui-Quadrado)

Tabela 5.2- Resultado da comparação dos grupos com relação à idade

	N	Média	Mediana	Erro padrão	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	30	26,4	27	0,58	3,16	21	30
Teste	30	25,93	25	0,6	3,27	21	30
Total	60	26,17	26	0,41	3,2	21	30

p-valor = 0,685 (teste Mann-Whitney)

A média de idade dos pacientes com PAg (25,93) foi similar a dos pacientes do grupo controle (26,4). A porcentagem total de mulheres foi de 78,3%, sendo que no grupo teste foi de 80% e no controle de 76,7%. Com estes resultados, pode-se afirmar que os grupos controle e teste são homogêneos com relação ao sexo e idade (p-valor >0,05).

Os números de dentes e de dentes afetados pela doença (NCI ≥ 4mm) são mostrados na Tabela 5.3. Verificou-se que o grupo controle apresentou em média 28,53 dentes e nenhum dente apresentou NCI ≥ 3mm. O grupo teste apresentou em média 29,53 dentes, com 15,53 dentes doentes.

Tabela 5.3- Número de pacientes, média, mediana, erro padrão, desvio padrão, valores máximo e mínimo dos dois grupos quanto ao número total de dentes e dentes afetados pela doença

	Grupo	N	Média	Mediana	Erro padrão	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Total de Dentes	Controle	30	28,53	28	0,23	1,28	28	32
	Teste	30	29,53	30	0,39	2,11	26	32
	Total	60	29,03	28	0,23	1,8	26	32
Dentes com Doença	Controle	30	0	0	0	0	0	0
	Teste	30	15,53	16	0,81	4,42	7	24
	Total	60	7,77	3,5	1,09	8,42	0	24

Através da análise do gel de poliacrilamida a 15% foi possível observar fragmentos de aproximadamente 83 pb+ 16 pb (genótipo 1/1), ou de 99 pb + 83 pb + 16 pb (genótipo 1/2) ou ainda de 99 pb (genótipo 2/2) em relação ao gene IL-1A (-889). Para o gene TNFA (-308) observamos fragmentos de aproximadamente 87 pb + 20 pb (genótipo 1/1), ou de 107 pb + 87 pb + 20 pb (genótipo 1/2) ou ainda de 107 pb (genótipo 2/2). (Figuras 5.1 e 5.2)

As freqüências de genótipos e de alelos dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) dos grupos controle e dos pacientes com PA estão representadas nas Tabelas 5.4 e 5.5.

Tabela 5.4- Freqüência dos genótipos para IL-1A (-889) e alelos nos grupos controle e teste

		Grupo Controle		Grupo Teste		Total	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Genótipos	1/1	19	(63,30)	17	(56,70)	36	(60,00)
	2/1	8	(26,70)	12	(40,00)	20	(33,30)
	2/2	3	(10,00)	1	(3,30)	4	(6,70)
	Total	30	(100)	30	(100)	60	(100)
Alelos	Alelo 1	46	(76,70)	46	(76,70)	92	(76,70)
	Alelo 2	14	(23,30)	14	(23,30)	28	(23,30)
	Total	60	(100)	60	(100)	120	(100)

Genótipos: p-valor = 0,381 (teste Exato de Fisher)
Alelos : p-valor > 0,999 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Tabela 5.5- Freqüência de genótipos para TNFA (-308) e alelos nos grupos controle e teste

		Grupo Controle		Grupo Teste		Total	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Genótipos	1/1	22	(73,30)	24	(80,00)	46	(76,70)
	2/1	6	(20,00)	6	(20,00)	12	(20,00)
	2/2	2	(6,70)	-	-	2	(3,30)
	Total	30	(100)	30	(100)	60	(100)
Alelos	Alelo 1	50	(83,30)	54	(90,00)	104	(86,70)
	Alelo 2	10	(16,70)	6	(10,00)	16	(13,30)
	Total	60	(100)	60	(100)	120	(100)

Genótipos: p-valor = 0,660 (teste Exato de Fisher)
Alelos: p-valor = 0,283 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Analisando os resultados da comparação dos grupos com relação às alterações nos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308), podemos afirmar que não existe associação estatisticamente significante entre grupo e alteração, ou seja, os dois grupos (controle e teste) não se diferem com relação às alterações nos genes pesquisados (p-valor > 0,05).

A freqüência de associação entre os genes IL-1A (-889) + TNFA (-308) é mostrada na Tabela 5.6.

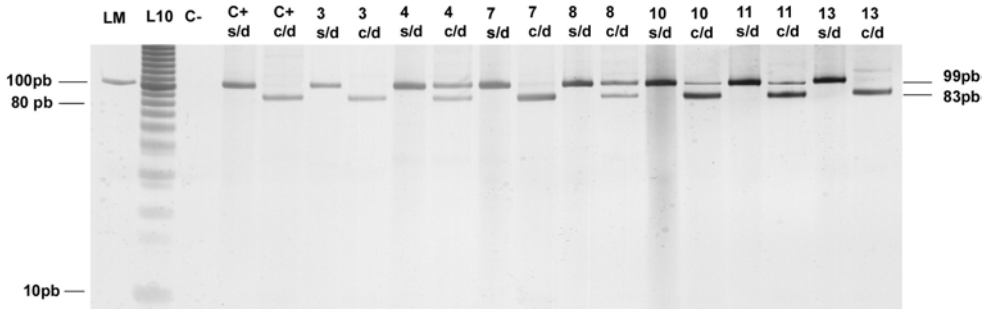
Tabela 5.6- Concordância entre os resultados dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308)

			TNFA			Total
			1/1	2/1	2/2	
IL-1A	1/1	N	27	8	1	36
		(%)	(58,70)	(66,70)	(50,00)	(60,00)
	2/1	N	16	3	1	20
		(%)	(34,80)	(25,00)	(50,00)	(33,30)
	2/2	N	3	1	-	4
		(%)	(6,50)	(8,30)	-	(6,70)
Total		N	46	12	2	60
		(%)	(100)	(100)	(100)	(100)

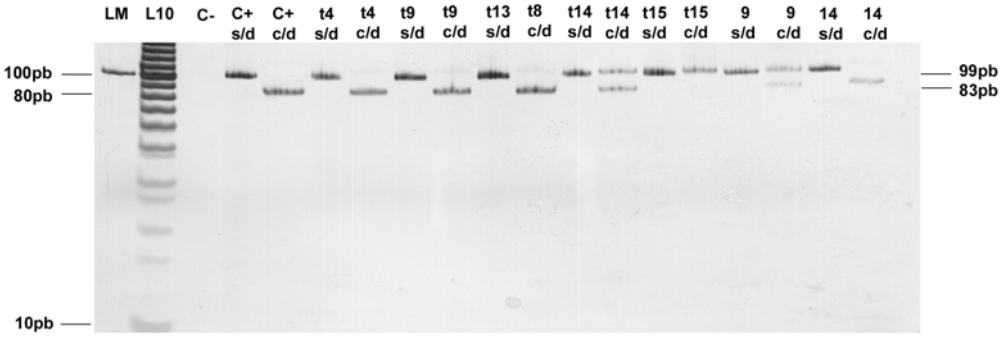
Kappa = -0,061 (p-valor = 0,556)

Não foi possível considerar que exista concordância entre os genótipos analisados, pois o valor Kappa não foi significativo.

IL-1A – gel 1



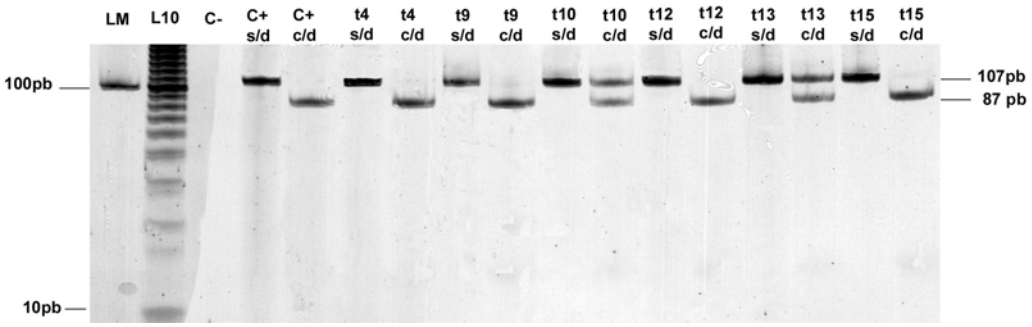
IL-1A – gel 2



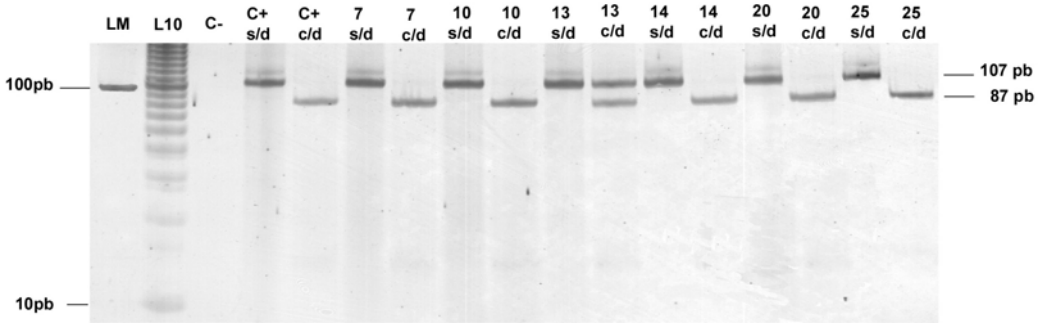
LM:marcador de pares de base
L10: marcador de pares de base
pb: padrão de pares de bases
t: grupo teste
c: grupo controle
s/d: sem digestão enzimática
c/d: com digestão enzimática
C-: controle negativo
C+: controle positivo
genótipo 1/1: gel 1) 3,7, 13; gel 2) t4, t9, t8, 14
genótipo 1/2: gel 1) 4, 8, 10, 11; gel 2) t14
genótipo 2/2: gel 2) t15, 9

Figura 5.1 – Gel de poliacrilamida 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1A (- 889)

TNFA – gel 1



TNFA – gel 2



LM:marcador de pares de base
L10: marcador de pares de base
pb: padrão de pares de bases
t: grupo teste
c: grupo controle
s/d: sem digestão enzimática
c/d: com digestão enzimática
C-: controle negativo
C+: controle positivo
genótipo 1/1: gel 1) t4, t9, t12, t15; gel 2) 7, 10, 14, 20, 25
genótipo 1/2: gel 1) t10, t13 ; gel 2) 13

Figura 5.2 – Gel de poliacrilamida 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene TNFA (- 308)

6 DISCUSSÃO

A associação entre o polimorfismo genético IL-1A (-889) e TNFA (-308) foi analisada em um grupo de 30 pacientes brancos e não fumantes com periodontite agressiva. Como grupo controle foram examinados 30 pacientes brancos e não fumantes sem doença periodontal.

Embora não tenha sido proposital, todos os pacientes portadores de PAg apresentavam a forma generalizada da doença, com média de 15,53 dentes doentes.

Um número expressivo de estudos foi realizado para se determinar à prevalência de doença periodontal em indivíduos jovens e, ao se analisarem esses dados, observa-se variação de 0,1 a 15% na prevalência de periodontitis agressivas localizada e generalizadas (LÖE; BROWN, 1991; MARAZITA et al.,1994; HART et al., 1993). No Brasil, os estudos têm mostrado resultados extremamente diferentes na prevalência das PAg. Tinoco et al. (1997) relataram prevalência de 0,3%, Gjermo et al. (1984) observaram 2,63% de pacientes com PJL e Cortelli et al. (2002) encontraram prevalência de 1,66% para PAgL e de 3,66% para PAgG. Estas variações de resultados são possivelmente decorrentes de características regionais e socioeconômicas dos diferentes locais onde os estudos foram realizados, dos diferentes critérios de classificação da doença, do tamanho da amostra e

principalmente da faixa etária das populações estudadas, que em geral fica próxima dos 15 anos de idade.

Um importante aspecto a ser considerado são os diferentes tamanhos de amostras utilizadas. No presente estudo a amostra foi pequena em comparação aos estudos de Hodge; Riggio; Kinane (2001) que avaliaram a relação polimorfismo e a PIP em 56 pacientes com PJG e em 56 controles, Endo et al. 2001 que utilizaram 44 pacientes com PAgG e 104 pacientes sem doença periodontal e Walker et al. que estudaram 37 pacientes com PJL e 104 pacientes saudáveis. Segundo Gunsolley et al. (1995), estudos realizados em amostras pequenas podem não indicar diferenças estatisticamente significantes, que apareceriam observando-se populações maiores.

Também se deve salientar que foram utilizados critérios rígidos na seleção da amostra deste estudo. O exame clínico foi realizado por um único examinador, a sondagem clínica periodontal foi realizada em seis pontos em todos os dentes, observando-se as medidas de profundidade à sondagem e nível clínico de inserção. Foram utilizados exames radiográficos periapicais, com o propósito de auxiliar o estabelecimento do diagnóstico periodontal. O critério de classificação da doença foi o definido pela AAP (1999). Nenhum paciente recebeu algum tipo de tratamento periodontal previamente à realização dos exames clínico e radiográfico. Além disso, nenhum paciente poderia ser fumante.

Para Walker et al. (2000), os resultados entre associação de polimorfismos genéticos e severidade da doença periodontal, só podem ser extrapolados para uma determinada população quando a amostra for de aproximadamente 180 pacientes com PAg e 540 controles. Entretanto, a realização de um estudo com uma amostra tão grande pode ser inviável devido à baixa prevalência da doença na população. Gunsolley et al. (1995), demoraram 15 anos para diagnosticar 142 pacientes com

PJL e 185 com PJG. Isto se deve provavelmente à baixa prevalência destas doenças na população.

Em nosso trabalho, os dois grupos experimentais foram homogêneos em relação às variáveis demográficas sexo e idade. Tanto no grupo teste como no controle, havia mais mulheres do que homens. O predomínio da população feminina com PAg, também foi encontrado nos trabalhos de Endo et al. (2001) e de Hodge; Riggio; Kinane (2001). Isto pode ser explicado por uma maior busca de terapia periodontal por mulheres acarretando número elevado de probandos do sexo feminino (HART et al., 1991). Todavia, este fato não é comprovado quando se analisam os descendentes diretos dos probandos, em que se verifica distribuição equivalente da doença periodontal entre indivíduos do sexo feminino e masculino (HART et al., 1991; BOUGHMAN et al., 1986).

Baseados em estudos anteriores (KORNMAN et al., 1997; SALVI; LAWRENCE; OFFENBACHER, 1997) estabeleceram-se alguns critérios de exclusão e pacientes que apresentavam indicadores ou fatores de risco sistêmicos ou comportamentais não foram incluídos neste trabalho. Um dos fatores de risco mais relacionados com o aumento na incidência e na severidade da doença periodontal é o fumo (BECK; KOCH; OFFENBACHER, 1995; GROSSI et al., 1994; RIVERA-HIDALGO, 2003). Pacientes fumantes não participaram deste estudo com o objetivo de se eliminar este fator de risco da nossa amostra, pois o fumo poderia ocultar a relação polimorfismo-doença. A associação do polimorfismo genético com o aumento da severidade da periodontite crônica encontrada por Kornman et al. (1997), somente ocorreu em pacientes não fumantes.

Schenkein et al. (1995) mostraram que pacientes fumantes com PJG tinham mais dentes afetados e maior perda de inserção do que pacientes não

fumantes, mas a perda de inserção não foi afetada pelo cigarro em pacientes com PJL. Fumantes com idade entre 19 e 30 anos têm em média 3,8 vezes mais chance de desenvolver periodontite que um paciente não fumante (HABER et al., 1993).

Há fortes evidências mostrando que certos grupos raciais estão associados com um risco maior de desenvolver PIP (ALBANDAR et al., 1997). Löe; Brown (1991) mostraram uma maior prevalência de PIP em negros e que estes possuem 15 vezes mais chance de desenvolver a doença que os caucasianos. Mas quando indivíduos de diferentes raças (americanos caucasianos e negros) pertencentes ao mesmo grupo sócio-econômico foram comparados, não houve diferença quanto à susceptibilidade à destruição periodontal (GROSSI et al., 1994; GROSSI et al., 1995).

Uma forte evidência entre a associação do polimorfismo genético IL-1A (-889) e IL-1B (+3953) com a severidade da doença periodontal foi mostrada através do trabalho de Kornman et al. (1997), onde pacientes europeus, não fumantes, com periodontite crônica e que carregam o alelo 2 apresentaram um risco 19 vezes maior de desenvolver a doença periodontal quando comparados aos portadores do alelo 1.

Poucos estudos têm avaliado esta associação em diferentes formas de periodontite em diferentes países do mundo (ARMITAGE et al.; 2000, TAI et al., 2002; THOMSON et al., 2001; WALKER et al., 2000). Contrária às freqüências encontradas em pacientes caucasianos, a prevalência do genótipo positivo para IL-1 foi baixa (2,3%) em chineses portadores de periodontite crônica (TAI et al., 2002) e de 22,5% para indivíduos afro-americanos, também portadores de periodontite crônica (WALKER et al., 2000).

Embora a amostra deste estudo tenha sido pequena, os resultados encontrados estão de acordo com os descritos por outros autores que utilizaram amostras de pacientes com periodontite agressiva. No grupo controle foi encontrado a freqüência de 63,3% para o genótipo 1/1, 26,7% para o genótipo 2/1 (heterozigoto) e 10,0% para o genótipo 2/2 do gene IL-1A (-308). A freqüência dos mesmos genótipos no grupo teste pareceu não ser estatisticamente diferente: 56,7% para o genótipo 1/1, 40% para o genótipo 1/2 e 3,30% para o genótipo 2/2. A freqüência do alelo1 para ambos os grupos foi de 76,7% e do alelo 2 foi de 23,3%, também para ambos os grupos.

A transmissão do alelo 1 do gene IL-1A (-889) em indivíduos afro-americanos e caucasianos com PIP foi mais freqüente do que a do alelo 2 (DIEHL et al., 1999). Hodge; Riggio; Kinane (2001) também não conseguiram mostrar a associação entre o polimorfismo genético IL-1A (-889) com periodontite juvenil generalizada em pacientes europeus brancos. A freqüência do alelo 2 foi de 33,9% no grupo teste e de 34,8% no grupo controle. Os resultados de Gonzalez et al. (2003) também não conseguiram associar a presença do polimorfismo para IL-1A (-889) com periodontite agressiva generalizada em pacientes europeus e da América Central. Todos os pacientes apresentaram o alelo 1, enquanto 90.9% dos controles europeus e 92.2% dos controles da América Central foram positivos para o alelo 1. O fumo não alterou os resultados e pareceu não ser significante quando se comparou pacientes com PJG e controles. Entretanto, Mc Guire; Nunn (1999) relataram que um genótipo positivo para polimorfismo IL-1 aumenta em 2,7 o risco de perda dental, enquanto o fumo aumenta em 2,9 vezes. Quando ambos estão combinados o risco é de 7,7 vezes.

Com o mesmo objetivo de se avaliar a susceptibilidade à doença periodontal, outros polimorfismos genéticos foram estudados; entre eles o TNFA. Entretanto, poucos são os estudos que avaliaram esta possível associação.

Shapira et al. (1994), demonstraram que monócitos isolados do sangue de pacientes com PIP secretavam mais TNF-α do que pacientes sem doença periodontal. Este resultado sugeriu que uma produção aumentada deste mediador químico pode influenciar a patogênese da periodontite agressiva. Entretanto, Shapira et al. (2001) não conseguiram demonstrar nenhuma associação entre o polimorfismo genético e a periodontite agressiva localizada.

Em relação ao gene TNFA (-308) este estudo mostrou uma freqüência de 73,3% para o genótipo 1/1, 20% para o genótipo 2/1 e 6,7% para o genótipo 2/2 no grupo controle e de 80% para o genótipo 1/1 e 20% para o genótipo 2/1 no grupo teste. O alelo 1 ocorreu com freqüência de 83,3% para o grupo controle e de 90% para o grupo teste. O alelo 2 foi observado com freqüência de 16,7% para o grupo controle e de 10% para o grupo teste.

Este resultado está de acordo com os de Kinane et al. (1999) que também não encontraram nenhuma associação entre o polimorfisno do gene TNFA e a periodontite agressiva generalizada. Trabalhos em pacientes com periodontite crônica também não conseguiram detectar diferenças entre a população doente e a saudável em relação à distribuição do genótipo TNFA (-308) (KORNMAN et al., 1997). Galbraith et al. (1999) encontraram que o alelo 1 é mais freqüente (95%) em pacientes com doença periodontal severa comparado com pacientes com gengivite (65%). Entretanto, a prevalência do alelo 1 foi de 76%, sem nenhuma diferença entre as populações de pacientes com periodontite crônica e de indivíduos saudáveis. O resultado de Shapira et al. (2001), mostrou um ligeiro aumento, mas

não estatisticamente significante, na prevalência do genótipo 1/1 em pacientes com PA.

Quando se avaliou, neste estudo, a freqüência de genótipos do IL-1A e TNFA não foi possível considerar que exista concordância entre os dois genes estudados. Talvez fosse importante estudar outros genes para que seja possível avaliar a concordância entre eles.

Para Schenkein (2002) se a informação genética não for importante para se estabelecer um diagnóstico, prognóstico ou terapêutica, então o exercício de se definir o risco genético para periodontite não é muito praticável. Além disso, os clínicos são treinados para identificar os fatores etiológicos responsáveis pela doença e sugerir planos de tratamento dirigidos a modificar estes fatores. Entretanto, pelo menos por enquanto, os genes são inalteráveis e não podemos tratá-los ou modificá-los. Para Nevins, M; Nevins, ML (1998) a presença de um polimorfismo genético não deve ser considerada como diagnóstico para doença periodontal. Ele deve atuar como um indicador de prognóstico, auxiliando um profissional a optar pela melhor conduta de tratamento, pois a escolha da terapia é baseada não só na destruição periodontal que o paciente apresenta, como também no seu risco futuro de desenvolver problemas periodontais mais severos. O conhecimento do perfil genético de indivíduos que são susceptíveis à periodontite identificaria aqueles indivíduos cuja exposição ambiental deve ser modificada para prevenir a doença.

Os dados apresentados mostram que as PA são consideradas doenças multifatoriais, desenvolvidas como resultado de complexas interações entre o hospedeiro, a microbiota e o ambiente. As dificuldades em se associar o polimorfismo genético com a periodontite agressiva pode ser explicada pela ausência de um único gene de maior expressão para a doença. Talvez existam

outros genes que podem alterar a expressão de outros genes e influenciar a expressão clínica da doença ou pode ser necessária à associação de múltiplos polimorfismos para que se possa ocorrer um aumento na severidade da doença ou, ainda, genes específicos podem ser diferentes em várias populações e/ou grupos étnicos e uma verdadeira heterogeneidade na susceptibilidade à doença pode estar presente.

Dentro das limitações metodológicas, deve-se considerar a possibilidade de realização de avaliações microbiológicas nos pacientes do nosso estudo. A detecção de microrganismos periodontopatogênicos com *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* poderia complementar uma possível avaliação de risco à periodontite agressiva nestes pacientes. Também nos parece razoável pensar no monitoramento clínico dos pacientes que não apresentaram um genótipo positivo para a periodontite agressiva, a fim de verificarmos se estes sujeitos não apresentarão a doença periodontal. Além disso, pesquisar o polimorfismo de outros genes como: IL-1B (-511), IL-1B (+3953), IL-1RN, IL-6, IL-10, o que constitui a próxima etapa deste trabalho. Sendo assim, poderemos avaliar de maneira mais precisa a influência dessas variáveis sobre a doença periodontal.

7 CONCLUSÃO

Dentro das imitações do presente estudo, pode-se concluir que:

não houve a associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva.

REFERÊNCIAS[1]

Albandar JM, Tinoco EMB. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. Periodontology 2000 2002;29:153-76.

Albandar JM, Brown LJ, Genco RJ, Löe H. Clinical classification of periodontitis in adolescents and young adults. J Periodontol 1997,68(6):545-55.

Albandar JM, Buischi YA, Barbosa MF. Destructive forms of periodontal disease in adolescents and young adults. A 3-year longitudinal study. J Periodontol 1991,62(6): 370-6.

Alexander MB, Damoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Curr Opin Periodontol 1994;3:39-53.

American Academy of Periodontology - AAP. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999;4:53-4.

Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes Bj, Rothlein R, Miller LJ et al. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definitions and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. J Infect Dis 1985;152:668-89.

Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, Di Giovine, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. J Periodontol 2000;71(2):164-71.

Auron PE, Webb AC. Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. Eur Cytokine Netw 1994;5:573-92.

[1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bassam, BJ, Caetano-Anolle G, Gressho FF. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. Anal Biochem 1991;196(1):80-3.

Beck JD, Koch GG, Offenbacher S. Incidence of attachment loss over 3 years in older adults – new and progression lesions. Community Dent Oral Epidemiol 1995;23:291-6.

Birkedal-Hansen H. Role of cytocines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res 1993;28:500-10.

Boughman JA, Halloran SI, Roulston D, Schwartz S, Suzuki JB, Weitkamp LR et al. An autossomal dominant form of juvenile periodontitis (JP): its localization to chromosome no 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and GC. J Craniofac Gent Dev Biol 1986;6(4):341-50.

Christersson LA, Slots J, Rosling BG, Genco RJ. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1985;12:465-76.

Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AOC. Prevalência de periodontite agressiva em adolescentes e adultos jovens do Vale do Paraíba. Pesqui Odontol Bras 2002;16(2):162-8.

Cox A, Camp NJ, Nicklin MJH, Di Giovine FS, Duff GW. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. Am J Hum Genet 1998;62:1180-8.

Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S,et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphism with early-onset periodontitis. J Periodontol 1999;70(4):418-30.

Dinarello CA. Biological basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996;87:2095-147.

Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie M. J Periodontol 2001; 72(11):1554-9.

Galbraith GMP, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. J Periodontol 1998;69:428-33.

Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. J Clin Periodontol 1999;26(11):705-9.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytocines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontology 2000 1997;14:112-43.

Gjermo P, Bellini HT, Santos VP, Martins JG, Ferracyoli JR. Prevalence of bone loss in a group of Brazilian teenagers assessed on bite-wing radiographs. J Clin Periodontol 1984;11:104-13.

Gonzales JR, Michel JR, Rodriguez EL, Herrmann Jm, Bödeker RH, Meyle J. Comparison of interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. Eur J Oral Sci 2003;111: 395-9.

Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1 beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. J Clin Periodontol 1998;25:781-5.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R et al. Assesment of risk for periodontal disease. II. Risl indicators for alveolar bone loss. J Periodontol 1995;66:23-9.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch GD, Dunford RG, Machtei EE et al. Assesment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol 1994;65:260-7.

Gunsolley JC, Califano JV, Koertge TE, Burmeister JA, Cooper LC, Schenkein HA. Longitudinal assessment of early onset periodontitis. J Periodontol 1995;66(5):321-8.

Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. J Periodontol 1993;64:16-23.

Hart TC. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. J Periodontol 1996;67(3):355-66.

Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:202-15.

Hart TC, Marazita ML, McCanna KM, Schenkein HA, Diehl SR. Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. Hum Genet 1993;91: 416-22.

Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Brooks CN, Gunsolley JG, Diehl SR. No female preponderance in juvenile periodontitis after correction for ascertainment bias. J Periodontol 1991;62(12):745-9.

Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. J Clin Periodontol 2001;28(5):430-6.

Kaslick RS, West TL, Chasens AI, Terascki PI, Lazzara R, Weinberg S. Assocation between HLA-A2 antigen and various periodontal disease in young adults. J Dent Res 1975;54:424.

Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. J Periodontal Res 1999;34(7):379-86.

Kornman KS, Crane A, H-Y W, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol 1997,24(1),72-7.

Kornman KS, Di Giovine FS. Genetic variation in cytocine expression: a risk factor for severety of adult periodontitis. Ann Periodontol 1998;3(1):327-38.

Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. J Biol Chem 2000;275:10308-15.

Löe H, Brown LJ. Juvenile periodontitis in the United States of America. J Periodontol 1991;62:608-16.

Long JC, Nance WE, Waring P, Burmeister JA, Ranney RR. Early onset periododntitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. Genet Epidemiol 1987;4:13-24.

López NJ. Clinical, laboratory and immunological studies of a family with a high prevalence of prepubertal and juvenile periodontitis. J Periodontol 1992;63:457-68.

McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, Di Giovane FS, Timms J, et al. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. J Periodontol 2000;71(2):156-63.

McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin 1α polymorphism. Arthritis Rheum 1995;38(2):221-8.

McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. VI. The effectiveness of clinical parameters ando IL-1 genotype in accurately prediciting prognoses and tooth survival. J Periodontol 1999,79:49-56.

McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwjatkowski D. Variation in the TNF-α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature 1994;371:508-11.

Mandell RI, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J Periodontol 1981;52:593-8.

Massada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and 1-beta in gingival crevicular fuid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res 1990;25:156-63.

Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake L, Schenkein HA. Evidence for autossomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. J Periodontol 1994 65:623-30.

Nedospasov SA, Shakhov AN, Turetskaya RL, Mett VA, Azizov MM, Georgiev GP et al.Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genetic. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1986;51:611-24.

Neves AC, Rivero ERC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SCOM, Nunes FD. Método de extração de DNA de material de arquivo pelo acetato de amônio e pelo isopropanol (resumo Pb329). Pesqui Odontol Bras 2002;16:210.

Nevins M, Nevins ML. Genetic susceptibility to periodontal disease. Dent Today 1998;17(2):94-9.

Newman MG. Genetic risk for a severe periodontal disease. Compend Contin Educ Dent 1997;18(9):881-8.

Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontology 2000 2003;32:11-23.

Offenbacher S. Periodontal disease: Pathogenesis. Ann Periodontol 1996;1:821-78.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol 1993;64:432-44.

Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res 1991;26(3):230-42.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontology 2000 1997;14:216-48.

Papapanou PN, Neiderud, Am, Sandros J, Dahlén G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. J Clin Periodontol 2001;28(5): 389-396.

Parkhill JM, Hennig BJW, Chapple ILC, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphism with early-onset periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27(9) 682-9.

Rice TK, Borecki IB. Familial resemblance and heritability. Adv Genet 2001;42:35-44.

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. Periodontology 2000 2003; 32:50-58.

Rossomando EF, Kennedy JE, Hadji-michael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. Arch Oral Biol 1990;35:431-4.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:173-201.

Saxen L, Nevalinna HR. Autossomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. Clin Genet 1984; 25:332-5.

Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? Periodontology 2000 2002;30:79-90.

Schenkein HA, Gunsolley JC, Koertge TE, Schenkein JR, Tew JG. Smoking and its effects on early-onset periodontitis. J Amer Dent Assoc 1995;126(8):1107-13.

Shapira L, Soskolne W, Van DT. Prostaglandin E2 secretion, cell maturation, and CD14 expression by monocyte-derived macrophages from localized juvenile periodontitis patients. J Periodontol 1996;67:224-8.

Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-α promoter region in families with localized early-onset periodontitis. J Periodontal Res 2001;36(3):183-6.

Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PGE2, IL-1β, IL-6 and TNFα by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. J Periodontol 1994;65(2):139-46.

Slots J. Subgingival microflora in periodontal disease. J Clin Periodontol 1979;6:351-82.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 1980;29:1013-20.

Smith DE, Renshaw BR, Tetchem RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. Four new mwmbers expand the interleukin-1 superfamily. J Biol Chem 2000;275:1169-75.

Soafer JA. Genetic approaches to the study of periodontal disease. J Clin Periodontol 1990;7:401-8.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytocines in periodontal disease. J Periodontol 1991;62:504-9.

Tai H, Endo M, Shimada Y, Gou E, Orima K, Kobayashi T, Yamaza YH. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism with early onset periodontitis in Japanese. J Clin Periodontol 2002;29(10):882-8.

Tatakis D. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. J Periodontol 1993;64:416-31.

Thomson WM, Edwards SJ, Dobson-Le DP, Tompkins R, Poulton R, Knight DA et al. IL-1 genotype and adult periodontitis in young New Zealanders. J Dent Res 2001;80(8):1700-3.

Tinoco EMB, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NMB et al. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. Eur J Oral Sci 1997;105(1):9-14.

Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. Curr Opin Periodontol 1994;19-27.

Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, Di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphism of the IL-1α and IL-1β genes in African-American LJP patients and an Africa-American control population. J Periodontol 2000;71(5):723-8.

Wang S, Sun C, Gillanders E, Wang Y-F, Duff D, Bock C, et al. Genome scan for susceptibility loci to the complex disorder early onset periodontitis. [abstr 1386]. Am J Hum Genet 1996;59.

Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D et al. Genetic polymorpism in the tumor necrosis factor lócus influence non-Hodgkin's lymphoma outome. Blood 1998;91(10):3574-81.

Wilson AG, De Vries N, Pociot F, Di Giovine AIF, Van Der Putte LBA, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. J Exp Med 1993;177:557-60.

Wilson AG, Di Giovane FS, Blakemore AL, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNFα) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992;1(5):353.

Wilson ME, Kalmar JR. Fc-gamma-RIIA(DC32): a potential marker defining susceptibility to localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1996;67:323-31.

,

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER nº 140/01
Protocolo 142/01

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***"Associação do polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3953), IL-1RN e TNFα-308 com periodontite de incidência precoce"***, de responsabilidade da pesquisadora **Nívea Maria de Freitas,** sob orientação do Professor Doutor **Roberto Fraga Moreira Lotufo.**

São Paulo, 26 de outubro de 2001

Profa.Dra. ***Célia Regina Martins Delgado Rodrigues***
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP Diretoria Telefax(011) 3814 0062 – 3818 7817/60 Compras Telefax (011) 3814 9281
impresso no S.D.O

APÊNDICE

APÊNDICE A

APÊNDICE A – Distribuição dos indivíduos do grupo controle segundo as variáveis sexo, idade, total de dentes e total de dentes com doença periodontal

No.	Sexo	Idade	Total de Dentes	Dentes com Doença
1	F	30	28	0
2	F	24	30	0
3	M	29	28	0
4	F	28	28	0
5	F	30	28	0
6	F	30	28	0
7	M	24	28	0
8	F	28	28	0
9	F	25	28	0
10	F	30	28	0
11	F	22	28	0
12	F	28	32	0
13	F	25	28	0
14	M	30	28	0
15	F	30	28	0
16	F	30	28	0
17	F	29	28	0
18	M	30	28	0
19	F	22	28	0
20	M	27	28	0
21	F	23	28	0
22	F	25	28	0
23	F	22	32	0
24	F	28	30	0
25	M	27	28	0
26	F	22	28	0
27	F	24	32	0
28	F	21	28	0
29	F	22	28	0
30	M	27	28	0

APÊNDICE B

APÊNDICE B- Distribuição dos indivíduos do grupo teste segundo as variáveis sexo, idade, total de dentes e total de dentes com doença periodontal

No.	Sexo	Idade	Total de Dentes	Dentes com Doença
1	F	25	32	18
2	F	22	28	12
3	F	30	32	22
4	F	23	30	20
5	F	25	26	11
6	F	22	30	12
7	F	21	30	17
8	F	30	28	14
9	F	27	28	15
10	M	30	30	20
11	M	23	28	16
12	F	25	31	7
13	M	22	32	13
14	M	30	30	15
15	F	28	28	24
16	M	28	32	12
17	F	30	27	19
18	F	24	26	18
19	F	30	32	22
20	F	28	32	22
21	F	22	32	14
22	F	25	27	8
23	F	30	27	8
24	F	22	32	17
25	F	25	28	17
26	F	30	28	13
27	F	30	28	17
28	M	25	32	10
29	F	22	32	17
30	F	24	28	16