NÍVEA MARIA DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DOS
GENES IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN
(ÍNTRON 2-VNTR) E TNFA (-308) E A PERIODONTITE AGRESSIVA**

São Paulo
2007

Nívea Maria de Freitas

**Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes
IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2-VNTR) e
TNFA (-308) e a periodontite agressiva**

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo

São Paulo
2007

Catálogo-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), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (ínton2-VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva / Nívea Maria de Freitas; orientador Roberto Fraga Moreira Lotufo. – São Paulo, 2007.

100p : tabs., figs.; 30cm.

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

1. Periodontite – Polimorfismo- Associação 2. Fator de necrose tumoral
alfa 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: nmfreita@usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Freitas NM. Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (ítron 2-VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, / / 2007

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: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) 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 tranquilidade, 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. Ass. Giorgio de Micheli**, **Prof. Dr. Koto Nakae**, **Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti**, **Profa. Dra. Sivia Rosana Carneiro Soares (*in memoriam*)**, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, 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.

Ao **Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo** pela amizade e pelas valiosas correções e sugestões no Exame de Qualificação.

A minha amiga **Silvia Linard Marcelino** meu especial agradecimento e carinho por todos os maravilhosos momentos que compartilhamos. Obrigada pela amizade fraternal.

Aos meus colegas de pós-graduação: **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, Cássio Volponi de Carvalho, Leandro Chambrone, Flávia Sukekava, Mariana S. Ragghianti, Vanessa T. E. Alves, Osmar Shizeo, Marcio Seto, Daniela Salami, André M. Hespanhol** 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. Saul Galileu Sartori** pelo exemplo de amizade e dedicação.

Aos amigos da Disciplina de Peridontia: **Marina Clemente Conde, Ilíria S. Feist, Alessandra Quedas Feraro, Eliane Matsura, Dácio Pântano Júnior, Mônica de Vuono**, 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 e Márcia Maria dos Santos e Vera**, 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 Cazal** 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 graduação **Adriana, Alexandre, Alina, Aline, Amanda, Carlos, Cibele, Cristiane, Da Hay, Daniela, Daniela Xavier, Maria do Carmo, Miriam, Pascoal, Samuel, Priscila**, 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 (*in memoriam*) e Patrícia Goldino Leonel** pelos momentos compartilhados.

Às bibliotecárias **Vânia, Solange e Rita** pelo auxílio na revisão deste trabalho.

A todos os pacientes que espontaneamente concordaram em participar 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 à 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), IL1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2-VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A periodontite agressiva (PAg) compreende um grupo de doenças periodontais 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 à PAg. 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. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2-VNTR) e TNFA (-308) e a PAg. O DNA genômico foi extraído de 150 indivíduos não fumantes, sendo 50 portadores de PAg e 100 indivíduos com periodonto saudável. O polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) foi analisado utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase e análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). O polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR) no íntron 2 do gene IL-1RN foi detectado pela técnica da PCR e análise do tamanho dos fragmentos. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa na frequência dos genótipos e alelos, entre o grupo com PAg e os indivíduos com periodonto saudável, para IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) (p -valor>0.05%). Entretanto,

houve diferença estatisticamente significativa, entre os dois grupos, na distribuição dos genótipos para IL-1RN (íntron 2-VNTR) (teste Exato de Fisher; p-valor=0,021) e alelos (teste Exato de Fisher; p-valor=0,04). Os achados sugerem que o polimorfismo do gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) está associado com a PAg na população estudada.

Palavras-Chave: Periodontite agressiva, Interleucina-1, Fator de necrose tumoral-alfa, Polimorfismo, Doença periodontal

Freitas NM. Correlation between IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (intron 2-VNTR) and TNFA (-308) gene polymorphisms and aggressive periodontitis [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Aggressive periodontitis (AgP) is a type of periodontal disease characterized by a rapid destruction of the periodontal supporting tissues in young adults who are usually systemically well. Population and family studies indicate that genetic factors seem to have a strong influence on susceptibility to AgP. Genetic polymorphism at the interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha (TNFA) were associated with the increase on the severity of periodontitis. This study aimed at finding a possible association between IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (intron 2-VNTR) and TNFA (-308) polymorphism in patients with aggressive periodontitis. Genomic DNA was extracted from the saliva of 150 nonsmoking subjects, 50 patients with AgP and 100 periodontal healthy subjects. All individuals were systemically healthy. The polymorphisms of IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) and TNFA (-308) were analyzed by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The polymorphism of a variable number tandem repeat (VNTR) in intron 2 of the IL-1RN gene was detected by PCR amplification and fragment size analysis. Statistical analysis revealed no significant difference in the IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) and TNFA (-308) genotypes and allele frequencies between AgP patients and periodontal healthy subjects ($p\text{-value} > 0.05\%$). However, there were significant differences among the groups in the distribution of IL-1RN (intron 2-VNTR) genotypes (Fisher's exact test; $p\text{-value} = 0.021$) and allele

frequencies (Fisher's exact test; p -value=0.04). These findings suggest that IL-1RN (intron 2-VNTR) polymorphism is associated with AgP in the population presented here.

Key-works: Aggressive periodontitis; Interleukin-1, Tumor necrosis factor-alpha; Polymorphism, Periodontal disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1A (-889)	54
Figura 4.2 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene TNFA(308).....	54
Figura 4.3 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1B (-511)	54
Figura 4.4 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1B (+3954) ...	55
Figura 4.5 - Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR)	55
Figura 5.1 - Freqüência dos genótipos para o polimorfismo nos genes IL-1A (-889), TNFA (-308), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (íntron 2-VNTR) no grupo-PAg e no grupo-controle	63
Figura 5.2 - Freqüência dos alelos para o polimorfismo nos genes IL-1A (-889), TNFA (-308), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (íntron 2-VNTR) no grupo-PAg e no grupo-controle	63
Figura 5.3 - Gel de acrilamida a 15% mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1A (-889).....	64
Figura 5.4 - Gel de acrilamida a 15% mostrando PCR-RFLP para o gene TNFA(308)	65
Figura 5.5 - Gel de acrilamida a 15% mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1B (-511).....	66
Figura 5.6 - Gel de acrilamida a 15% mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1B(+3954).....	67
Figura 5.7 - Gel de agarose a 3% mostrando os resultados para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Relação dos iniciadores, concentração de magnésio, concentração dos iniciadores, números de ciclos e temperatura de anelamento.....	48
Tabela 4.2 - Relação das endonucleases de restrição, concentração das endonucleases de restrição, temperatura e os fragmentos esperados.	51
Tabela 5.1 - Resultados da comparação dos grupos com relação ao sexo	57
Tabela 5.2 - Resultados da comparação dos grupos com relação à idade	57
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	58
Tabela 5.4 - Frequência dos genótipos e alelos para IL-1A (-889) nos grupos controle e PAg	60
Tabela 5.5 - Frequência dos genótipos e alelos para TNFA (-308) nos grupos controle e PAg	60
Tabela 5.6 - Frequência dos genótipos e alelos para IL-1B (-511) nos grupos controle e PAg	61
Tabela 5.7 - Frequência dos genótipos e alelos para IL-1B (+3954) nos grupos controle e PAg	61
Tabela 5.8 – Frequência de genótipos e alelos para IL-1RN (intron 2-VNTR) nos grupos controle e PAg	62

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	“ <i>deoxyribonucleic acid</i> ” / 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	“Ethylenediamine-tetraacetic acid” / ácido etileno-diaminotetracético
EOP	“ <i>early onset periodontitis</i> ” / periodontite de início precoce
et al.	“et alii” – referência em latim que significa “e outros”
G	refere-se ao nucleotídeo guanina
HCl	ácido clorídrico
HIV	“Human immunodeficiency virus” / vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	antígeno leucocitário humano
IL	interleucina

IL-1	interleucina 1
IL-1A	refere-se ao gene que codifica a IL-1 α
IL-1 α	interleucina - 1alfa
IL-1B	refere-se ao gene que codifica a IL-1 β
IL-1 β	interleucina - 1beta
IL-1Ra	antagonista do receptor da IL-1
IL-1RN	refere-se ao gene que codifica a IL-1Ra
IP	índice de placa
KCl	cloreto de potássio
Kd	kilo-Dalton
LPS	lipopolissacarídeos
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
PAg	periodontite agressiva
PAgL	periodontite agressiva localizada
PAgG	periodontite agressiva generalizada
pb	pares de bases

PBS	tampão salino
PCR	“polymerase chain reaction” / reação em cadeia da polimerase
PCS	profundidade clínica de sondagem
PGE ₂	prostrglandina E ₂
pH	potencial hidrogeniônico
PIP	periodontite de incidência precoce
pM	unidade de medida referente a 1 picomolar
q.s.p	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo do fragmento de restrição
rpm	rotações por minuto
SDS	sulfato de dodecil-sódio
SS	sangramento à sondagem
T	refere-se ao nucleotídeo timina
TAE	solução de Tris e EDTA
TE	Tris-EDTA
TM	temperatura de anelamento
TNF- α	“Tumor necrosis factor-alpha” / Fator de necrose tumoral-alfa
TNFA (-308)	refere-se ao gene que codifica a TNF- α
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilnodiamino
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-Aminometano / ácido clorídrico
UV	ultra-violeta
V	volts
VNTR	variação em número de repetições em <i>tandem</i>
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.....	38
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Seleção da amostragem	42
4.2 Coleta de saliva	43
4.3 Digestão enzimática	44
4.4 Extração do DNA	45
4.5 Quantificação.....	46
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	46
4.7 Análise dos polimorfismos genéticos	49
4.7.1 Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).....	49
4.7.2 Análise do polimorfismo de número variável de repetições em <i>tandem</i> (VNTR)	52
4.8 Análise dos resultados	53
4.9 Análise estatística	56
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS.....	97

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 tais como idade, padrão de higiene bucal, hábito de fumar, diabetes, microrganismos periodontopatogênicos, estresse, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, fatores genéticos e outros (NUNN, 2003).

A influência genética na periodontite foi determinada a partir de uma variedade de fontes. Pesquisas realizadas em gêmeos, de história natural da doença, de anticorpos, de citocinas, e outros fatores reiteram o fato de que existe um importante componente genético na periodontite. Fatores genéticos modificam a resistência e susceptibilidade à 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).

Assim, 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 consequência, o desenvolvimento de um programa de prevenção ou a antecipação do tratamento periodontal, aumentando as chances de resultados favoráveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação, etiologia e prevalência da periodontite agressiva (PAg)

A PAg compreende um grupo de doenças periodontais, com manifestações clínicas freqüentemente severas, que acometem indivíduos jovens, progridem rapidamente e com distribuição familiar.

A PAg é dividida em localizada ou generalizada, dependendo da extensão, severidade e dentes afetados. Na periodontite agressiva localizada (PAgL), os indivíduos apresentam perda de inserção clínica nos primeiros molares e incisivos permanentes, ocorrendo necessariamente o comprometimento de, no mínimo, um primeiro molar. NA PAg localizada, não mais que dois dentes, além dos primeiros molares e incisivos, são afetados (TONETTI; MOMBELLI, 1999).

Por outro lado, a periodontite agressiva generalizada (PAgG) caracteriza-se por apresentar dentes com perda clínica de inserção severa e rápida, envolvendo primeiros molares e incisivos e, no mínimo, outros três dentes permanentes. Geralmente, afeta indivíduos até 30 anos de idade (TONETTI; MOMBELLI, 1999). Ambas as formas 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 em que 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., 1997).

Certas formas de periodontite que atingem jovens eram agrupadas e conhecidas como periodontite de início 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 “*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*” (1999), a Academia Americana de Periodontia divulgou uma classificação das doenças periodontais, propondo a mudança de PIP para periodontite agressiva (PAg). 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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antes chamado de *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 de *A. actinomycetemcomitans* é altamente significativa (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 PJL possuem resposta humoral elevada para *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 PJI. *Porphyromonas gingivalis* é o microrganismo mais freqüentemente isolado, representando 13 a 20% do total de células bacterianas. Outros microrganismos comumente encontrados são *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* e *Neisseria*. *A. actinomycetemcomitans* também está presente, porém em freqüências mais baixas do que na PJI (OFFENBACHER; ZAMBON,1996).

A prevalência da PAJ parece ser influenciada pela região geográfica, pelo grupo étnico, pela raça e pelo sexo. Estima-se que a prevalência de PAJ 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 sobre a prevalência das periodontites em adolescentes e adultos jovens. Gjermo et al. (1984) avaliaram uma amostra de 304 jovens de 15 anos de idade, residentes em uma área de baixa condição sócio-econômica de Belo Horizonte. No estudo, mediu-se a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista alveolar, por radiografias interproximais. O diagnóstico para PJI 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 e Barbosa (1991) examinaram 222 crianças com idade de 13 anos de uma escola particular em uma área de condição 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 por rigoroso exame clínico ($PCS \geq 5\text{mm}$) 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 de bactérias seja essencial para o início da doença, a quantidade e a variedade de espécies não são suficientes para explicar as diferenças nas respostas inflamatórias e imunológicas 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 polimorfismos. KORNMAN; DI GIOVINE, 1998). O polimorfismo é uma variação genética na seqüência de alelos, na seqüência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica e que ocorre com uma freqüência maior do que 1% na população (STRACHAN; READ, 2002).

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

A detecção e a avaliação da extensão da agregação familiar são os primeiros passos na análise genética de qualquer característica. Tal agregação significa o compartilhamento de genes e fatores do ambiente entre indivíduos de uma mesma família. 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 aferido diretamente.

Todas as análises de segregação para PIP evidenciam transmissão genética com diferentes padrões de herança (LONG et al., 1987). Atualmente, o padrão de transmissão genética 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 dos Estados Unidos 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 à PAg pode ser determinada pela análise de ligação. Uma pesquisa utilizando esta metodologia descreveu 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: HLA (KASLICK et al., 1975; SOAFER, 1990), variação genética que influencia a produção de imunoglobulinas, em particular, a produção de anticorpos IgG₂ herdados de forma polimórfica de um receptor para IgG₂ (FcγRII ou CD32) (WILSON; KALMAR, 1996), genes que promovem uma reação quimiotática exagerada dos leucócitos (VAN DYKE; VAIKUNTAM, 1994) e elevada produção de citocinas IL-1β e TNF-α, e prostaglandinas (SHAPIRA; SOSKOLNE; VAN DYKE, 1996; SHAPIRA et al., 1994).

Na PIP, respostas inflamatórias locais são caracterizadas por altos níveis de mediadores inflamatórios como de prostaglandinas E₂ (PGE₂), interleucina-1α (IL-1α) e interleucina-1β (IL-1β) tanto no fluido do sulco gengival quanto no tecido gengival (MASSADA et al., 1990; OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993). A produção de PGE₂, em particular, mostrou-se muito elevada em pacientes com PIP, quando comparados com indivíduos com periodonto saudável ou com periodontite do adulto (OFFENBACHER, 1996). Foi observado também 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 algumas alterações polimórficas e 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, sugeriu-se que a resposta do hospedeiro frente a agentes etiológicos bacterianos é exagerada ou deficiente, resultando em problemas periodontais em idade precoce. Esta hipótese foi suportada pela observação que o número de anormalidades genéticas associadas com uma diminuição na função dos fagócitos predispõe pacientes à periodontite durante a infância (ANDERSON et al., 1985).

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 IL-1 está implicada na patogênese da doença periodontal devido às suas múltiplas propriedades pró-inflamatórias e antiinflamatórias (GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997).

A família da IL-1 é um grupo de dez proteínas composta por IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra (antagonista do receptor da IL-1), IL-18 (também chamada de IL-1 γ) e, recentemente, foram identificadas IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9 e IL-1F10 (KUMAR et al., 2000; SIMS et al., 2001; SMITH et al., 2000). IL-1 α e IL-1 β possuem propriedades agonistas e ligam-se a receptores específicos (IL-RI e IL-RII), enquanto

a IL-1Ra possui propriedade antagonista e liga-se aos mesmos receptores das IL-1 α e IL-1 β , neutralizando a atividade biológica na resposta imunológica e inflamatória dessas duas interleucinas. Os genes para todos os membros da família, com exceção da IL-18, estão localizados no braço longo do cromossomo 2 (região 2q13-14) (AURON; WEBB, 1994; NICKLIN et al., 2002; SMITH et al., 2000). O cromossomo 11 (região 11q22,2-q22,3) abriga o gene para IL-18 (NOLAN; GREAVES; WALDMANN, 1998).

As IL-1 α e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias, multifuncionais, produzidas predominantemente por macrófagos ativados por substâncias microbianas, complexos imunológicos, outras citocinas ou linfócitos. Também são produzidas por plaquetas, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A produção de IL-1 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 IL-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). A IL-1Ra é uma inibidora natural das IL-1 α e da IL-1 β . É produzida primeiramente pelos macrófagos como uma glicoproteína de 22-25 kd, composta por 152 aminoácidos e tem 26% e 19% de homologia com IL-1 β e com a IL-1 α , respectivamente. IL-1Ra é uma proteína secretada principalmente por monócitos e macrófagos, mas uma forma intra-citoplasmática foi recentemente demonstrada nos queratinócitos e células epiteliais. A IL-1Ra liga-se ao receptor IL-

1RI com a mesma afinidade das IL-1 α e IL-1 β , mas não induz um sinal intracelular para a tradução (DINARELLO, 1997; KASHIWAGI; SUZUKI, 1992; WITKIN; GERBER; LEDGER, 2002). A produção de IL-1Ra é estimulada por IgG, outras citocinas, por componentes bacterianos e virais e por proteínas de fase aguda (AREND et al., 1998).

As IL-1Ra são produzidas em altos níveis pelos tecidos gengivais. O epitélio gengival é um importante produtor desta citocina na doença e na saúde. Existe uma associação positiva entre os níveis de IL-1Ra e IL-1 β . Os dados sugerem uma expressão de IL-1 β e IL-1Ra, principalmente por macrófagos e células epiteliais em resposta a estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) e outros componentes bacterianos (ROBERTS et al., 1997).

O gene polimórfico para IL-1Ra está localizado no cromossomo 2 próximo ao genes que codificam IL-1 α e IL-1 β (DINARELLO, 1988, STEINKASSERER et al. 1992). No íntron 2 do gene para IL-1Ra existe uma VNTR de 86 pares de bases (TARLOW et al., 1993). A frequência dos alelos varia entre os diferentes grupos étnicos e populações, mas o alelo 1 contém quatro repetições e é mais comum do que o alelo 2 que contém duas repetições. Os demais alelos, representando três, cinco e seis repetições ocorrem com baixa frequência na maioria das populações. Vários estudos têm buscado demonstrar a relação entre os genótipos para IL-1Ra e as concentrações de IL-1 β e IL-1Ra produzidas. Dada a complexidade das interações entre as citocinas e a diversidade de fatores ambientais e populacionais, a presença do alelo 2 foi associada com o aumento, diminuição ou similar níveis de proteína IL-1Ra quando comparadas com outros alelos. Em alguns estudos os indivíduos homozigotos para o alelo 2 apresentaram níveis de circulação de IL-1Ra mais alto do que pessoas com outros genótipos. Estes resultados estavam

associados com uma maior e mais prolongada resposta imunológica e inflamatória. A associação entre o genótipo IL-1RN2 e doenças inflamatórias crônicas sugerem que indivíduos com o alelo 2 tem uma mais prolongada e severa resposta imunológica e inflamatória dos que indivíduos com outros genótipos. O polimorfismo para IL-1Ra está associado com doenças inflamatórias do intestino como colites inflamatórias e doença de Crohn, alopecia areata, psoríases, líquen escleroso, lupus eritematoso, vestibulites vulvares, esclerose múltipla e doenças coronárias (WITKIN; GERBER; LEDGER, 2002).

A 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 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 proliferação de fibroblastos, induz a síntese de PGE2 pelos macrófagos e fibroblastos, estimula a produção de metaloproteinases que degradam as proteínas da matriz extracelular e participa da resposta imunológica do hospedeiro (TATAKIS, 1993). A IL-1 predominante nos tecidos periodontais é a IL-1 β , produzida primeiramente pelos macrófagos (MATSUKI; YAMAMOTO; HARA, 1992)

O polimorfismo de vários genes para citocinas pode influenciar o nível de secreção destas substâncias e explicar as variações nas respostas imunológica e inflamatória 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).

Os níveis de IL-1 estão associados à destruição dos tecidos periodontais. IL-1 β é um potente estimulador da reabsorção óssea, da produção de proteases e pela síntese do ácido araquidônico e estas substâncias estão diretamente relacionadas com a doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Vários estudos mostraram que ocorre um aumento nos níveis de IL-1 β nos tecidos periodontais doentes (STASHENKO et al., 1991) e no fluido sulcular (MASSADA et al., 1990; WILTON et al., 1992) e que a variação dos níveis desta interleucina está relacionada com os períodos de destruição ativa dos tecidos periodontais (STASHENKO et al., 1991). Shirodaria et al. (2000) investigaram a relação entre os genótipos para IL-1 e a quantidade de IL-1 α e IL-1 β no fluido sulcular de pacientes com periodontite crônica severa. Os resultados mostraram que a presença do alelo 2 para IL-1A (-889) está associado com um aumento de quatro vezes nos níveis de IL-1 α no fluido sulcular. Engebretson et al. (1999) avaliaram a associação dos níveis de IL-1 α , de IL-1 β e de TNF- α no fluido gengival e nos tecidos antes e após a realização dos procedimentos básicos periodontais em pacientes com periodontite moderada a severa, não fumantes e sem alterações sistêmicas. Os resultados mostraram que em sítios com PCS < 4mm, os níveis de IL-1 β no fluido gengival foi 2,5 vezes maior nos pacientes com genótipo positivo antes do tratamento periodontal e 2,2 vezes maior após o tratamento. A redução na concentração de IL-1 β no fluido gengival foi observada nos pacientes com genótipo negativo e não em pacientes com genótipo positivo após o tratamento. Não houve diferença entre os diferentes genótipos e os níveis de TNF- α antes e após o tratamento. As diferença entre os diversos genótipos

e os níveis de IL-1 α e IL-1 β no tecido gengival não foram significantes antes e após o tratamento periodontal, enquanto TNF- α não foi detectada nos tecidos.

Pacientes com periodontite crônica apresentam níveis elevados de mediadores inflamatórios no sangue e as variações genéticas para as citocinas IL-1 e TNF- α estão associadas a um aumento na intensidade da resposta inflamatória e ao aumento destes mediadores no soro. Estes achados levam à hipótese que as infecções periodontais podem influenciar a resposta inflamatória sistêmica do indivíduo. Os dados sugerem que uma variabilidade genética nos indivíduos com doença periodontal pode afetar os níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios. Os achados sugerem que o polimorfismo genético pode conferir susceptibilidade para doenças inflamatórias sistêmicas na presença de doença periodontal (POCIOT; WILSON; DUFF; 1993).

Na sequência, faremos referências aos trabalhos sobre a relação entre a doença periodontal e os polimorfismos e alguns autores avaliaram o gene IL-1A (+4845) ao invés do gene IL-1A (-889), que foi avaliado em nosso trabalho, porque a análise da posição +4845 é mais fácil, este gene está em completo desequilíbrio de ligação (>99%) com o gene IL-1A (-889) e os dois são 100% concordantes (COX et al., 1998). O polimorfismo para IL-1B (+3953) foi renomeado para IL-1B (+3954), pois o sítio de transcrição para IL-1B inicia-se na posição +1 e não na posição zero como se acreditava (MCDEVITT et al, 2000).

O papel do polimorfismo dos genes IL-1A (-889) e IL-1B (+3953) na PJL e PJG foi avaliado em pacientes fumantes e não fumantes. Foram estudadas 28 famílias afro-americanas, em que 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 locus IL-1 α foi transmitido com mais frequência que

o alelo 2 nos caso de PJG. O alelo 1 do gene IL-1 β (+3953) foi também transmitido com mais frequência que o alelo 2 nos casos de PJL. O alelo 1 do gene IL-1 β (+3953) foi transmitido com mais frequência que o alelo 1 do gene IL-1 α . Baseado nos resultados de desequilíbrio de ligação foi sugerido que o polimorfismo para IL-1 β é mais importante para a associação com a PJL, tanto em fumantes quanto para não fumantes em ambas as raças (DIEHL et al., 1999).

Parkhill et al. (2000) exploraram a possível associação entre o polimorfismo dos genes IL-1B (+3953) e IL-1RN (ítron 2-VNTR) e a PIP em indivíduos caucasianos fumantes e não fumantes. Setenta pacientes com PIP (idade entre 16 e 50 anos - média de $36,1 \pm 7,3$ anos), sendo 21 com PJL (idade entre 16 e 50 anos – média de $32,2 \pm 8,1$ anos) e 72 sujeitos sem evidências de doença periodontal (idade entre 23 e 62 anos – média de $41,1 \pm 9,5$ anos) participaram do estudo. A frequência do genótipo 1/1 para IL-1B (+3953) foi significativamente maior nos pacientes com PJL e associada a este tipo de doença periodontal. Também foi encontrada diferença significativa na distribuição do genótipo 1/1 para IL-1B (+3953) entre pacientes com PIP fumantes e indivíduos fumantes sem doença periodontal, mas não entre pacientes com PIP não fumantes e controles não fumantes. A presença do alelo 1 para IL-1B (+3953) foi associada com a PIP em fumantes. Não foi encontrada diferença na frequência de genótipos e alelos para IL-1B (+3953) em pacientes com PIP não fumantes e indivíduos não fumantes sem doença periodontal. Não houve associação entre os genótipos e alelos para IL-1RN (ítron 2-VNTR) e a PIP. Entretanto, a associação entre os alelos 1 dos genes IL-1B (+3953) e IL-1RN (ítron 2-VNTR) foi associada com a PIP. Os resultados sugerem que a combinação do genótipo IL-1B e o hábito de fumar e a combinação entre dos

genótipos para IL-1 β e IL-1Ra são fatores de risco para a PIP e reforçam o papel dos fatores genéticos e ambientais na susceptibilidade à PIP.

Walker et al. (2000) determinaram a prevalência e a associação do polimorfismo genético para IL-1 α (+4845) e IL-1 β (+3953) em 104 indivíduos afro-americanos sem doença periodontal e em 37 pacientes afro-americanos com PJL com menos de 35 anos de idade. Não houve diferença na distribuição dos genótipos, para ambos os genes, entre os grupos teste e controle. Os resultados mostraram que o alelo 1 do gene IL-1B (+3953) aparece em 99% da população sem doença periodontal e em 100% dos pacientes com PJL. A prevalência do alelo 2 para ambos os genes foi de 14% para o grupo sem doença periodontal e de 8% para o grupo com PJL. Dada a alta prevalência do alelo 1 para IL-1B (+3953) na população estudada, é improvável que este alelo sozinho seja importante na determinação do risco à PIP.

Hodge, Riggio e Kinane (2001) não encontraram associação entre a presença do polimorfismo dos genes IL-1A(-889) e IL-1B (+3953) e a PJG em caucasianos de origem européia. 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 influenciou nos resultados, ou seja, não houve diferença entre o grupo-controle e o teste.

Após a avaliação da frequência dos polimorfismos dos genes IL-1A (+4845), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (ínton 2-VNTR) na população japonesa não

fumante Tai et al. (2002) sugeriram que há associação entre o polimorfismo do gene IL-1RN (ínteron 2-VNTR) e a PIP generalizada. O estudo foi composto por 47 pacientes com PAgG (23-35 anos, média de idade de 31,4 anos) e 97 indivíduos sem doença periodontal (22-35 anos, média de idade de 28,6 anos). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de genótipos e alelos dos genes IL-1A (+4845), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) entre os pacientes com PAgG e os sujeitos controles. Entretanto, a frequência do alelo polimórfico 2 para o gene IL-1RN (ínteron 2-VNTR) foi significativamente maior nos pacientes com PIP generalizada e este achado sugere que há associação entre a PAgG e o polimorfismo deste gene na população japonesa.

Trevilatto et al. (2002) avaliaram o perfil genético de 14 indivíduos de uma mesma família portadores de PAg. Foram investigados os polimorfismos para IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3953), IL-1RN (ínteron 2-VNTR) e TNFA (-308). Os genótipos 1/1 para IL-1B (+3953) e para TNFA (-308) estiveram presentes em todos os membros da família estudada. Todos os indivíduos foram homozigotos (2/2) para o gene IL-1A (-889). Para o gene IL-1B (-511) os genótipos 1/2 e 2/2 foram encontrados com frequência semelhante e o alelo 2 para o gene IL-1RN (ínteron 2-VNTR) foi encontrado em todos os indivíduos analisados. Os resultados mostraram que os parâmetros genéticos estudados não foram relevantes para a susceptibilidade à doença periodontal nesta família.

Gonzales et al. (2003) exploraram a possível associação entre a PAg e os genótipos polimórficos para IL-1A (+4845) e IL-1B (+3954) em duas diferentes populações. Vinte e oito pacientes brancos de origem européia, com média de idade de $28,9 \pm 6,5$ anos e 16 pacientes da América Central, com média de idade de $27,7 \pm 6$ anos com PAgG fizeram parte do grupo teste. O grupo controle foi formado por

33 pacientes brancos de origem européia (média de idade de 25 ± 3 anos) e 14 pacientes da América Central (média de idade de $24,5 \pm 3,3$ anos). 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-americana foram positivos para o alelo 1. A frequência 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 significativa. Não foi observada associação entre os polimorfismos estudados e a PAg.

Anusaksathien et al. (2003) determinaram a distribuição dos polimorfismos dos genes IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) em 26 pacientes tailandeses com PAg (23 pacientes com PAgG e 3 pacientes com PAgL) e em 43 indivíduos controles. O grupo dos pacientes com PAgL tinham em média $25,33 \pm 1,53$ anos (24 - 27 anos) e o grupo com PAgG tinha em média $31,83 \pm 5,21$ anos (22 - 39 anos). No grupo-controle, a média de idade foi de $34,2 \pm 12,2$ anos (21 - 66 anos). No grupo-PAg, 96,2% dos pacientes não eram fumantes e no grupo-controle 95,3 indivíduos não eram fumantes. Os resultados mostraram que a distribuição dos genótipos para IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) foi similar entre o grupo-PAg e o controle e que a maioria dos indivíduos são homozigotos para o alelo 1: 92,3% dos indivíduos com PAg e 97,7 dos controles para IL-1B (+3954) e 84,6% dos pacientes com PAg e 76,7% dos controles para IL-1A (-889). Nenhuma associação entre os polimorfismos estudados e a população tailandesa foi encontrada.

Quappe, Jara e López (2004) investigaram a associação dos polimorfismos dos genes IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) na população chilena fumante e não

fumante. Trinta e seis pacientes com PAg (idade 17-42 anos, média $35\pm4,3$ anos), 75 indivíduos sem doença periodontal (idade 35-42 anos, média $38\pm3,2$ anos) denominados de controles saudáveis e 75 indivíduos com idade entre 18 e 80 anos (média 40 ± 8) em que não se sabia a situação periodontal foram chamados de população controle. Os resultados mostraram uma positiva associação entre a presença do alelo 2 para o polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a PAg. A frequência dos genótipos foi similar para a PAgG e para a PAgL.

Li et al. (2004) investigaram a associação entre os polimorfismos para IL-1A (+4845), IL-1B(-511) e (+3954) e IL-1RN (íntron 2-VNTR) na população chinesa. O grupo com PAgG consistiu de 122 pacientes com média de idade de 28,9 anos e o grupo-controle de 95 indivíduos saudáveis com média de idade de 30,3 anos. Os resultados mostraram que não houve associação entre os polimorfismos para IL-1 e a PAgG. Entretanto, quando a população estudada foi dividida por sexo, a frequência do genótipo 2/2 e do alelo 2 para IL-1A (+4845) foi significativamente maior em pacientes do sexo masculino do grupo-PAgG do que no grupo-controle. A frequência do genótipo heterozigoto 1/2 para IL-1B(-511) foi significativamente maior em pacientes homens do grupo-PAgG do que nos controles. No grupo do sexo feminino nenhuma diferença significativamente foi encontrada entre os grupos controle e PAgG. Um possível efeito em polimorfismo do gene IL-1B(-511) e o hábito de fumar no grupo com PAgG foi observado. Os resultados mostraram que a associação entre os polimorfismos para IL-1A (+4845) e IL-1B(-511) e a PAgG é importante para os pacientes chineses do sexo masculino.

Brett et al. (2005) avaliaram a presença de dez polimorfismos, entre eles IL-1A (-889), IL-1B(-511), IL-1B(+3954) e TNFA (-308), em 51 pacientes com PAg e em 100 indivíduos-controle onde não se sabia a condição periodontal. Todos os

participantes eram caucasianos, fumantes ou não fumantes. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na distribuição dos genótipos e alelos para o gene IL-1A (-889), IL-1B(-511) e TNFA (-308) entre os grupos com PAg e controle. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos entre os pacientes com PAg e os controles com relação ao gene IL-1B(+3954). O genótipo 2/2 foi associado com um aumento da susceptibilidade à PAG.

Berdeli et al. (2006) avaliaram a distribuição dos genótipos e alelos para IL-1RN (intron 2-VNTR) em 52 pacientes turcos com PAgG e em 190 sujeitos onde não se sabia a condição periodontal. Todos os participantes do estudo não eram fumantes, os pacientes com PAgG tinham entre 16 e 39 anos (média de $28,6 \pm 6,3$ anos) e o grupo-controle tinha idade média de $44,5 \pm 6,5$ anos. Os resultados mostraram que a frequência do alelo 2 foi significativamente maior nos pacientes com PAgG do que nos indivíduos controle e que também, foi significativa a diferença de distribuição do genótipo positivo para IL-1RN (intron 2-VNTR) entre os grupos teste e controle. De acordo com os dados, o polimorfismo para o alelo 2 está associado com a doença periodontal na população turca.

Sakellari et al. (2006) investigaram a presença e a relação dos polimorfismos IL-1A (+3953), IL-1B (+4845), TNFA (-308) e IL-1RN (intron 2-VNTR) na população grega. Quarenta e seis pacientes com PAg com média de idade de $42,95 \pm 5,94$ e 90 indivíduos sem doença periodontal com média de idade de $43,86 \pm 1,2$ foram selecionados. 52,17% dos pacientes com PAg eram fumantes e 53,33% do grupo controle eram fumantes. Nenhuma diferença foi observada com relação à frequência dos genótipos estudados entre os grupos PAg e controle. Neste trabalho os autores colocam as posições dos genes polimórficos como descrito acima, mas

não existe o polimorfismo do gene IL-1A na posição +3953 e sim na posição +4845. Também, não existe o polimorfismo do gene IL-1B na posição +4845 e sim na posição +3954. Somente em uma tabela de resultados, descrita no artigo, as posições dos genes são colocadas corretamente.

Moreira et al. (2007) avaliaram a presença do polimorfismo para IL-1A (-889) em indivíduos brasileiros fumantes e não fumantes. O estudo foi realizado em 55 pacientes com PAg e em 41 sujeitos sem doença periodontal. A idade dos pacientes com PAg variou de 15 a 46 anos e dos indivíduos controles de 20 a 77 anos de idade. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na distribuição dos genótipos e alelos entre os grupos com PAg e o grupo sem doença periodontal, mesmo quando foi considerado o hábito de fumar. Os resultados mostraram que não houve associação entre o polimorfismo estudado e a PAg.

2.4 Associação entre o fator de necrose tumoral – α (TNF- α) e a PAg

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos, com papel biológico similar ao das IL-1 (ALEXANDER; DAMOULIS, 1994). Induz a secreção de collagenase, 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 (ALEXANDER; DAMOULIS, 1994; STASHENKO et al., 1991). Está presente em níveis aumentados no fluído gengival e no tecido gengival dos pacientes com gengivite e periodontite (ROBERTS et al.

1997;ROSSOMANDO; KENNEDY; HADJI-MICHAEL, 1990; STASHENKO et al., 1991). Vários estudos relatam que o polimorfismo do gene TNFA (alelo 2) está associado a doenças infecciosas e autoimunes, incluindo malária cerebral, leishmaniose, artrite reumatóide, lúpus eritematoso e diabetes (WILSON et al., 1993).

Após o seqüenciamento da região 5'(-595 a +390) do gene humano TNFA por Nedospasov et al., 1986, Wilson et al. (1992) descreveram uma mudança da base 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 frequência do alelo 1 foi de 84% e do alelo 2 foi de 16%. Os estudos de Pociot, Wilson e Duff (1993), McGuire et al. (1994), Warzocha et al. (1998) e Kroeger et al. (2000) mostraram que a maior frequência 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 do gene TNFA (-308). Foram incluídos neste estudo 77 pacientes escoceses com PJG, com idade inferior a 35 anos, sistemicamente saudáveis e com perda de inserção interproximal > 5mm em pelo menos oito dentes permanentes e 91 pacientes sem

doença periodontal. 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 PAg em pacientes israelenses. Dos 43 pacientes jovens que participaram do estudo, 16 eram portadores de PAgL e 9 de PAgG. Foram colhidos 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 com média de idade de 31,2 anos (23-35 anos) e 107 indivíduos saudáveis (média de idade de 26,2 anos – 22-35 anos) foram incluídos neste trabalho. A detecção do polimorfismo foi realizada pela técnica de PCR-SSOP. Os resultados mostraram que não houve diferença na frequência de genótipos e alelos entre os pacientes com PJG e os saudáveis e que não houve associação entre o polimorfismo e a 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), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2-VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostragem

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer nº 140/01, protocolo 142/01 (ANEXO A) 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 B).

Neste estudo caso-controle foram selecionados 50 pacientes com PAg e com idade inferior ou igual a 30 anos (grupo-PAg). Para a forma localizada da 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 ≥ 4 mm por dente afetado (TONETTI; MOMBELLI, 1999).

O grupo-controle foi composto por 100 indivíduos com idade inferior ou igual a 30 anos e sem evidência clínica de perda de inserção ≥ 3 mm em nenhum dos dentes (TONETTI; MOMBELLI, 1999). Estes sujeitos deveriam apresentar no mínimo 24 dentes.

Foi realizada uma completa investigação sobre a história médica e dental dos indivíduos, tanto do grupo-PAg como do controle e todos apresentaram boa saúde

geral. Foram excluídos do trabalho os indivíduos com aparelhos ortodônticos, com história de diabetes, 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) e o nível clínico de inserção (NCI) em 6 sítios/dente. 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.

4.2 Coleta de saliva

Foram coletadas amostras de saliva, não estimulada, em um coletor universal¹ estéril, sendo posteriormente transferidas para microtubos² de 2ml (microtubos²). As amostras foram conservadas em congelador 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 da coleta.

¹ Deskarplás, SP, Brasil

² Axygen Scientific Inc., CA, USA

4.3 Digestão enzimática

Saliva na quantidade de 500µl foi transferida para um microtubo². Este material foi centrifugado por cinco minutos a 1000rpm, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 1000µl de PBS³ 1X. Centrifugou-se novamente o microtubo² por 5 minutos a 2000rpm e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* no fundo do microtubo² foi novamente lavado com 1000µl de PBS³ 1X, centrifugado e o sobrenadante foi novamente desprezado. O *pellet* no fundo do microtubo² foi submetido à digestão enzimática com proteinase K⁴.

Foi adicionado ao corpo de fundo de 200 a 400µl de tampão de lise estéril contendo NaCl⁵ 1M; TRIS⁶ 1M, pH 8; EDTA⁷ 0,5M, pH 8; SDS⁸ 10% e proteinase K⁴ na concentração final de 500 µg/ml. Os microtubos² 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 microtubos² foram invertidos pelo menos uma vez ao dia.

Após a completa dissolução do material, ou seja, quando a solução contida no microtubo² ficou praticamente transparente, os microtubos² foram incubados a 95°C durante 10 minutos, para inativação da proteinase K⁴.

³ Sulfato de dodecil sódio, Quimex F. Maia Ind. Com. LTDA, Brasil

⁴ Proteinase K, Invitrogen Corporation, CA, USA

⁵ Cloreto de sódio, Quimex F. Maia Ind. Com. Ltda, Brasil

⁶ Tris(hidroximetil)aminometanol, Invitrogen Corporation, CA, USA

⁷ Ácido etileno diamino tetracético, Invitrogen Corporation, CA, USA

⁸ Sulfato de dodecil sódio, Sigma Chemical, MO, USA

4.4 Extração do DNA

A extração do DNA das salivas estudadas foi realizada pelo método do acetato de amônio⁹ e do isopropanol¹⁰, padronizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (NEVES et al., 2002; RIVERO et al., 2006).

Foram adicionados 200µl de acetato de amônio⁹ a 4M no microtubo² contendo o lisado, para precipitação da proteína. O microtubo² foi homogeneizado por 20 segundos em aparelho Vortex¹¹, 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 microtubo². O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro microtubo². Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600µl de isopropanol¹⁰ a 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 a 70% e centrifugado a 16.000 x g por 2 minutos. Foi removido o álcool e após a evaporação do etanol a 70% à temperatura ambiente, o corpo de fundo de DNA foi dissolvido em 30 a 50 µl de tampão TE (Tris⁶ 10mM, pH 7,4 e EDTA⁷ 1mM, pH 8) e mantido a 4°C até a quantificação em espectrofotômetro.

⁹ Acetato de amônio, LabSynth, SP, Brasil

¹⁰ Isopropanol, Sigma Chemical, MO, USA

¹¹ Vortex, Scientific Industries, NY, USA

4.5 Quantificação

Foi realizada a quantificação em espectrofotômetro¹² 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. As seqüências dos iniciadores senso e anti-senso foram as descritas por Kornman et al. (1997) (Tabela 4.1).

Todas as reações foram feitas em microtubos¹³ de 0,5 ml para PCR adicionando-se: formamida¹⁴ 1%, tampão de PCR 1X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM)¹⁵, dNTP¹⁶ 0,3 mM, MgCl₂¹⁷, iniciadores¹⁸ senso e anti-senso, Taq DNA polimerase¹⁹ 2U, 10 - 30ng de DNA genômico e água estéril para um volume final de 25µl.

¹² Espectrofotômetro Beckman DU®640, USA

¹³ Axygen Scientific Inc., CA, USA

¹⁴ Formamida, Fluka Chemie, Switzerland

¹⁵ Tampão de PCR 1X, Invitrogen Corporation, Brasil

¹⁶ dNTP (2'- deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP), Invitrogen Corporation, USA

¹⁷ Cloreto de magnésio, Invitrogen Corporation, Brasil

¹⁸ Iniciadores senso e antisenso, Invitrogen Corporation, Germany

¹⁹ Taq DNA polimerase, Invitrogen Corporation, Brasil

As concentrações de $MgCl_2$ ¹⁷ variaram para cada gene estudado e foram as seguintes: 2mM para o IL-1A (-889) e para o IL-1B (-511), 2,5 mM para o TNFA (-308) e para o IL-1B (+3954) e 4mM para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR). As concentrações de iniciadores senso e anti-senso foram de 500pM para o gene IL-1A (-889) e IL-1B (-511), 250pM para o gene TNFA (-308), 400pM para o gene IL-1B (+3954) e 750pM para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) (Tabela 4.1).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador²⁰ e 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), a 61°C por 50 segundos para o gene TNFA (-308), a 51°C por 50 segundos para o gene IL-1B (-511), a 59°C por 50 segundos para IL-1B (+3954) e a 58°C por 50 segundos para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR), extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos finalizou a reação (Tabela 4.1).

Em todas as 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.

²⁰ Termociclador, Mastercycler, Eppendorf, Germany

O resultado da reação, para os genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308), foi visualizado pela eletroforese (78 Volts por 40 minutos) do DNA amplificado em gel de agarose²¹ a 2% contendo brometo de etídio²² a 0,5g/ml e utilizando-se uma cuba horizontal²³ com tampão de corrida TAE²⁴ 1X, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA foi utilizado um transluminador de luz ultravioleta²⁵ e uma câmera fotográfica Polaroid DS4²⁶ com filme Polaroid tipo 667²⁷. Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de pares de base Low DNA Mass Ladder²⁸, que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000pb a 100 pb.

Tabela 4.1 – Relação dos iniciadores, concentração de magnésio, concentração dos iniciadores, número de ciclos e temperatura de anelamento

Iniciadores	[Mg] (mM)	[Iniciadores] (pM)	Ciclos	TM (°C)
IL-1A (-889) S- AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC As- TTACATATGAGCCTTCCATG	2	500	38	50
TNFA (-308) S- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT As- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	2,5	250	38	61
IL-1B (-511) S- TGGCATTGATCTGGTTCATC As- GTTTAGGAATCTTCCCACTT	2	500	38	51
IL-1B (+3954) S- CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA As- GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG	2,5	400	38	59
IL-1RN (íntron 2-VNTR) S- AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC As- TCCTGGTCTGCAGGTAA	4	750	38	58

²¹ Agarose, Invitrogen Corporation, CA, USA

²² Brometo de etídio, Invitrogen Corporation, CA, USA

²³ Cuba horizontal, OWL Scientific Plastics Inc, USA

²⁴ Tris-acetato, Invitrogen Corporation, Brasil

²⁵ Transluminador de luz ultravioleta, Fotodyne Inc., WI, USA

²⁶ Polaroid DSA, Fisher Biotech, USA

²⁷ Polaroid tipo 667, Polaroid Inc., MA, USA

²⁸ Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corporation, Germany

4.7 Análise dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos para os genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) foram analisados através do gel de acrilamida²⁹ a 15% pela técnica PCR-RFLP e a verificação do polimorfismo VNTR para o gene IL-1RN (íntron 2) foi feita pela amplificação do DNA genômico pela técnica da PCR e visualização em gel de agarose²¹ a 3%.

4.7.1 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 endonucleases 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, digeridos durante 5 horas, a 37°C, com 2U/µl da enzima de restrição NcoI³⁰, na presença do tampão específico 1X e água estéril para um volume de 20µl (Tabela 4.2).

²⁹ Poliacrilamida, Invitrogen Corporation, CA, USA

³⁰ NcoI, Invitrogen Corporation, CA, USA

Para a análise do gene IL-1B (-511) foram utilizados 5µl do produto de PCR, digeridos durante 5 horas, a 37°C, com 6U/µl da enzima de restrição Aval³¹, na presença do tampão específico 1X e água estéril para um volume de 20µl. Para a análise do gene IL-1B (+3954) foram utilizados 5µl do produto de PCR, digeridos durante cinco horas, a 65°C, com 2U/µl da enzima de restrição TaqI³², na presença do tampão específico 1X e água estéril para um volume de 20µl (Tabela 4.2).

Os fragmentos resultantes foram separados por tamanho, através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (2,6 ml TAE²⁴ 10X, 5,2 ml glicerol³³ 50%, 25 ml de acrilamida²⁹ 30%, 520 µl de APS³⁴ 10% e 52 µl TEMED³⁵, água milli-Q q.s.p. 50 ml). O produto da PCR foi misturado a um tampão de corrida (EDTA⁷ 10 mM, azul de bromofenol³⁶ a 0,05% e xilenocianol³⁷ a 0,05%). Para a determinação do tamanho dos fragmentos, foram utilizados dois padrões de pares de bases: Low DNA Mass Ladder²⁸ e 10pb DNA³⁸ Ladder. A corrida foi feita em tampão TAE²⁴ 1x, durante aproximadamente 7 horas em temperatura ambiente.

Após o término da corrida, o gel foi corado por nitrato prata³⁹ e revelado para a visualização das bandas do DNA.

³¹ Aval, Invitrogen Corporation, CA, USA

³² Taq I, Invitrogen Corporation, CA, USA

³³ Glicerol, Invitrogen Corporation, CA, USA

³⁴ Persulfato de amônia, Invitrogen Corporation, CA, USA

³⁵ N, N, N',N'- tetrametilnodiamino, Invitrogen Corporation, CA, USA

³⁶ Azul de Bromofenol, Invitrogen Corporation, CA, USA

³⁷ Xilenocianol, Fluka Chemie, Switerzeland

³⁸ 10 pb DNA Ladder, Invitrogen Corporation, Germany

³⁹ Nitrato de prata, Fluka Chemie, Switezerland

Inicialmente foi realizada a fixação com solução de etanol a 10% e ácido acético⁴⁰ 0,75% por 20 minutos, seguida pela impregnação pelo nitrato de prata³⁹ a 0,2% por 30 minutos, lavagem em água milli-Q por 2 minutos e revelação com solução de NaOH⁴¹ a 3% e formaldeído⁴² a 0,03% por 20 minutos. A reação foi finalizada com solução de ácido acético⁴⁰ a 10% por 12 minutos e lavagem com água milli-Q por 12 minutos. Todos os procedimentos de revelação foram realizados no escuro e sob agitação (método modificado de BASSAM; CAETANO-ANOLLES; GRESSHOFF, 1991). Todos os géis foram escaneados para posterior análise.

Tabela 4.2 – Relação das endonucleases de restrição, concentração das endonucleases de restrição, temperatura e os fragmentos esperados

Gene	Endonuclease de restrição	[Endonuclease de restrição] (U/μl)	Temperatura (°C)	Fragmentos
IL-1A (-889)	NcoI	2	37	83pb + 16pb (alelo 1) 99pb (alelo 2)
TNFA (-308)	NcoI	2	37	87pb + 20pb (alelo1) 107pb (alelo 2)
IL-1B (-511)	AvaI	6	37	190pb +114pb (alelo1) 304pb (alelo2)
IL-1B (+3954)	TaqI	2	65	108pb +86pb (alelo1) 194 pb (alelo2)
IL-1RN (íntron 2-VNTR)	--	--	--	410pb (alelo1) 240pb (alelo2) 500pb (alelo3) 325pb (alelo4) 595pb (alelo5)

⁴⁰ Ácido acético, LabSynth, SP, Brasil

⁴¹ Hidróxido de sódio, Invitrogen Corporation, CA, USA

⁴² Formaldeído, Dinâmica, Brasil

4.7.2 Análise do polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR)

O VNTR é uma metodologia que se baseia na existência de seqüências de DNA repetidas uma após a outra (*tandem*) que freqüentemente variam entre as pessoas quanto ao número de unidades repetidas. As seqüências repetidas em *tandem* constituem aproximadamente 10% do genoma e a unidade de repetição varia de 5 a 250 pares de bases, repetida até centena de vezes.

O polimorfismo de gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) é causado por repetições seguidas de duas, três, quatro, cinco ou seis vezes de uma seqüência de 86pb (TARLOW et al., 1993).

A verificação das regiões polimórficas do tipo VNTR do gene IL-1RN (íntron 2) foi realizada por eletroforese do DNA amplificado em gel de agarose²¹ a 3% contendo brometo de etídio²² a 0,5g/ml em uma cuba horizontal²³ com tampão de corrida TAE²⁴ 1X, pH 8,1 a 78V por 90 minutos. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA foi utilizado um transluminador de luz ultravioleta²⁵ e uma câmera fotográfica Polaroid DS4²⁶ com filme Polaroid tipo 667²⁷. Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de pares de base Low DNA Mass Ladder²⁸, que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000pb a 100 pb.

4.8 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita de acordo com a literatura descrita por di Giovine et al. (1992) para o polimorfismo do gene IL-1B (-511), por Wilson et al. (1992) para TNFA (-308), por Tarlow et al. (1993) para IL-1RN (íntron 2-VNTR), por McDowell et al. (1995) para IL-1A (-889) e por Kornman et al. (1997) para IL-1B (+3954).

A análise do gel de acrilamida a 15% mostrou fragmentos de aproximadamente 83pb+ 16pb (genótipo 1/1), ou de 99pb + 83pb + 16pb (genótipo 1/2) ou ainda de 99pb (genótipo 2/2) para o gene IL-1A (-889) (Figura 4.1). Para o gene TNFA (-308) observamos fragmentos de aproximadamente 87pb + 20 pb (genótipo 1/1), ou de 107pb + 87pb + 20pb (genótipo 1/2) ou ainda de 107pb (genótipo 2/2) (Figuras 4.2). Para o gene IL-1B (-511) os fragmentos foram de 190pb +114pb (genótipo 1/1), ou de 304 pb + 190pb +114pb (genótipo 1/2) ou de 304pb (genótipo 2/2) (Figura 4.3). Para o gene IL-1B (+3954) os fragmentos foram de 108pb + 86pb (genótipo 1/1), ou de 194pb + 108pb + 86pb (genótipo 1/2) ou de 194pb (genótipo 2/2) (Figura 4.4). Para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) os fragmentos foram de 410pb (genótipo 1/1), 410pb +240pb (genótipo 1/2), 410pb + 325pb (genótipo 1/4) ou de 240pb (genótipo 2/2) (Figura 4.5).

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)

Figura 4.3 – Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1B (-511)

Figura 4.4 – Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1B (+3954)

Figura 4.5 – Possibilidades de fragmentos de bandas para o gene IL-1RN (intron 2-VNTR)

A análise do polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) foi feita utilizando-se os géis de acrilamida a 15% escaneados, em formato TIFF, RGB, 300 dpis. Após a análise de todos os géis as imagens foram passadas para preto e branco e adicionados textos explicativos, no programa AdobePhotoshop 5.0. A análise do polimorfismo para o gene IL-1RN (intron 2-VNTR) foi realizada utilizando-se os géis de agarose a 3% fotografados com filme Polaroid tipo 667.

4.9 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 ($p\text{-valor} < 0,05$) 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.

Em todas as análises foi calculado o p-valor associado à Hipótese de Nulidade (H_0) 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 50 pacientes com PAg (grupo-PAg) e 100 indivíduos com periodonto saudável (grupo-controle). A descrição das características demográficas e a comparação entre os dois grupos estudados é apresentada nas Tabelas 5.1 e 5.2.

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

			Grupo		Total
			Controle	PAg	
Sexo	Feminino	n	88	39	127
		(%)	(88,00)	(78,00)	(84,66)
	Masculino	n	12	11	23
		(%)	(12,00)	(22,00)	(15,44)
Total		n	100	50	150
		(%)	(100)	(100)	(100)

p-valor = 0,109 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

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

	n	Média	Mediana	Erro padrão	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	100	26,40	27	0,58	3,16	21	30
PAg	50	25,93	25	0,6	3,27	21	30
Total	150	26,17	26	0,41	3,2	21	30

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

A média de idade do grupo-PAg (25,93 anos) foi similar a grupo-controle (26,4 anos). A porcentagem total de mulheres foi de 84,66%, sendo que no grupo-PAg foi de 78,00% e no controle de 88,00%. Com estes resultados, pode-se afirmar que os grupos controle e PAg são homogêneos com relação ao sexo e idade (p -valor $>0,05$).

Os números de dentes e de dentes afetados pela doença ($\text{NCI} \geq 4\text{mm}$) são mostrados na Tabela 5.3. Verificou-se que o grupo-controle apresentou em média 28,67 dentes e nenhum apresentou $\text{NCI} \geq 3\text{mm}$. O grupo-PAg apresentou em média 28,88 dentes, com 16,96 deles afetados pela doença.

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	100	28,67	28	0,16	1,25	28	32
	PAg	50	28,88	28,5	0,28	1,96	26	32
Dentes com Doença	Controle	100	0	0	0	0	0	0
	PAg	50	16,96	17	0,61	4,36	7	24

A análise dos polimorfismos para os genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) foi realizada por análise em gel de acrilamida a 15%. A análise do polimorfismo para o gene IL-1RN (ínton 2-VNTR) foi feita através em agarose a 3%.

A análise do gel de acrilamida a 15% mostrou fragmentos de aproximadamente 83pb+ 16pb (genótipo 1/1), ou de 99pb + 83pb + 16pb (genótipo 1/2) ou ainda de 99pb (genótipo 2/2) para o gene IL-1A (-889) (Figura 5.3). Para o gene TNFA (-308) observamos fragmentos de

aproximadamente 87pb + 20 pb (genótipo 1/1), ou de 107pb + 87pb + 20pb (genótipo 1/2) ou ainda de 107pb (genótipo 2/2) (Figura 5.4). Para o gene IL-1B (-511) os fragmentos foram de 190pb +114pb (genótipo 1/1), ou de 304 pb + 190pb +114pb (genótipo 1/2) ou de 304pb (genótipo 2/2) (Figura 5.5). Para o gene IL-1B (+3954) os fragmentos foram de 108pb + 86pb (genótipo 1/1), ou de 194pb + 108pb + 86pb (genótipo 1/2) ou de 194pb (genótipo 2/2) (Figura 5.6). Para o gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) os fragmentos foram de 410pb (genótipo 1/1), 410pb +240pb (genótipo 1/2), 410pb + 325pb (genótipo 1/4) ou de 240pb (genótipo 2/2) (Figura 5.7).

As frequências de genótipos e de alelos dos genes IL-1A (-889), TNFA (-308) IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (íntron 2-VNTR) do grupo-controle e do grupo-PAg estão representadas nas Tabelas 5.4 e 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8 e nas Figuras 5.1 e 5.2.

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

		Grupo Controle		Grupo PAg		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos	1/1	54	(54,00)	28	(56,00)	82	(54,66)
	1/2	37	(37,00)	20	(40,00)	57	(38,00)
	2/2	9	(9,00)	2	(4,00)	11	(7,34)
	Total	100	(100)	50	(100)	150	(100)
Alelos	Alelo 1	145	(72,5)	76	(76,00)	221	(73,44)
	Alelo 2	55	(27,5)	24	(24,00)	79	(26,34)
	Total	200	(100)	100	(100)	300	(100)

Genótipos: p-valor = 0,638 (teste Exato de Fisher)

Alelos : p-valor = 0,516 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Tabela 5.5 - Frequência de genótipos e alelos para TNFA (-308) nos grupos controle e PAg

		Grupo Controle		Grupo PAg		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos	1/1	69	(69,00)	40	(80,00)	109	(72,66)
	1/2	27	(27,00)	9	(18,00)	36	(24,00)
	2/2	4	(4,00)	1	(2,00)	5	(3,34)
	Total	100	(100)	50	(100)	150	(100)
Alelos	Alelo 1	165	(82,5)	89	(89,00)	254	(84,66)
	Alelo 2	35	(17,5)	11	(11,00)	46	(15,34)
	Total	200	(100)	100	(100)	300	(100)

Genótipos: p-valor = 0,408 (teste Exato de Fisher)

Alelos: p-valor = 0,140 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Tabela 5.6 - Frequência dos genótipos e alelos para IL-1B (-511) nos grupos controle e PAg

		Grupo Controle		Grupo PAg		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos	1/1	43	(43,00)	18	(36,00)	61	(40,66)
	1/2	54	(54,00)	28	(56,00)	82	(54,64)
	2/2	3	(3,00)	4	(8,00)	7	(4,7)
	Total	100	(100)	50	(100)	150	(100)
Alelos	Alelo 1	140	(70,00)	64	(64,00)	204	(68,00)
	Alelo 2	60	(30,00)	36	(36,00)	96	(32,00)
	Total	200	(100)	100	(100)	300	(100)

Genótipos: p-valor = 0,316 (teste Exato de Fisher)

Alelos : p-valor = 0,293 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Tabela 5.7- Frequência de genótipos e alelos para IL-1B (+3954) nos grupos controle e PAg

		Grupo Controle		Grupo PAg		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos	1/1	55	(55,00)	33	(66,00)	88	(58,66)
	1/2	44	(44,00)	15	(30,00)	59	(39,34)
	2/2	1	(1,00)	2	(4,00)	3	(2,00)
	Total	100	(100)	50	(100)	150	(100)
Alelos	Alelo 1	154	(77,00)	81	(81,00)	235	(78,33)
	Alelo 2	46	(23,00)	19	(19,00)	65	(21,64)
	Total	200	(100)	100	(100)	300	(100)

Genótipos: p-valor = 0,124 (teste Exato de Fisher)

Alelos: p-valor = 0,428 (teste Qui-Quadrado de Pearson)

Analisando os resultados da comparação dos grupos com relação às alterações nos genes IL-1A (-889), TNFA (-308), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), podemos afirmar que não existe associação estatisticamente significativa entre grupo e alteração, ou seja, os dois grupos não se diferem com relação às alterações nos genes pesquisados (p-valor > 0,05).

Tabela 5.8 - Frequência de genótipos e alelos para IL-1RN (íntron2-VNTR) nos grupos controle e PAg

		Grupo Controle		Grupo PAg		Total	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Genótipos	1/1	48	(48,00)	20	(40,00)	67	(44,67)
	1/2	43	(43,00)	22	(44,00)	65	(43,33)
	1/4	7	(7,00)	1	(2,00)	9	(6,00)
	2/2	2	(2,00)	7	(14,00)	9	(6,00)
	Total	100	(100)	50	(100)	150	(100)
Alelos	Alelo 1	146	(73,00)	63	(63,00)	208	(69,33)
	Alelo 2	47	(23,50)	36	(36,00)	83	(27,67)
	Alelo 4	7	(3,50)	1	(1,00)	9	(3,00)
	Total	200	(100)	100	(100)	300	(100)

Genótipos: p-valor = 0,021(teste Exato de Fisher)

Alelos: p-valor = 0,04 (teste Exato de Fisher)

Analizando os resultados da comparação dos grupos com relação à alteração no gene IL-1RN (íntron 2-VNTR), podemos afirmar que existe associação estatisticamente significativa entre grupo e alteração, ou seja, os dois grupos se diferem com relação à alteração no gene pesquisado (p-valor < 0,05).

Figura 5.1 – Frequência dos genótipos para os polimorfismos nos genes IL-1A (-889), TNFA (-308), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (intron 2-VNTR) no grupo-PAg e no grupo-controle

Figura 5.2 – Frequência dos alelos para os polimorfismos nos genes IL-1A (-889), TNFA (-308), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e IL-1RN (intron 2-VNTR) no grupo-PAg e no grupo-controle

IL-1A (-889)– gel 1 **IL-1A (-889)– 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 5.3 – Gel de acrilamida a 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1A (-889)

TNFA (-308)– gel 1

TNFA (-308)– 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 5.4 – Gel de acrilamida a 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene TNFA (- 308)

IL-1B (-511)

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: t10
 genótipo 1/2: 14, t9, t11, 15

Figura 5.5 – Gel de acrilamida a 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1 (-511)

IL-1B (+3954)

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: 40, 41, 42
 genótipo 1/2: 38, 39, 43

Figura 5.6 – Gel de acrilamida a 15%, mostrando PCR-RFLP para o gene IL-1B (+3954)

IL-1RN (íntron 2-VNTR)

LM:marcador de pares de base

pb: padrão de pares de bases

t: grupo teste

c: grupo controle

C-: controle negativo

C+: controle positivo

genótipo 1/1: t33, t35, t37, t38, t41, t42, t43, t44, t46, t47

genótipo 1/2: t32, t34, t36, t39, t45

genótipo 2/2: t40, t48

Figura 5.7 – Gel de agarose a 3% mostrando os resultados para o gene IL 1RN (íntron 2-VNTR)

6 DISCUSSÃO

Enquanto a PAg é uma doença de etiologia múltipla, a resposta do hospedeiro frente à agressão bacteriana parece ser um denominador comum na periodontite. Conforme o entendimento sobre Genética avança, fica mais claro que a resposta do hospedeiro frente à invasão bacteriana, o processo inflamatório, a destruição tecidual e reparação dos tecidos são mediadas por um complexo de interações gene-gene e gene-fator ambiental. A observação de que os polimorfismos de genes que codificam citocinas podem estar associados ou serem responsáveis por uma aparente diferença na severidade da doença periodontal entre os indivíduos aumentou o interesse na identificação de genes ligados à etiologia da doença periodontal (ABEL; DESSEIN, 1997; MALO; SKAMENE, 1994). A IL-1 tem papel importante na resposta imunológica-inflamatória. Uma forte evidência entre a associação do polimorfismo genético da IL-1A (-889) e da IL-1B (+3953) com a severidade da doença periodontal foi mostrada pelo trabalho de Kornman et al. (1997), em que pacientes europeus, não fumantes, com periodontite crônica e heterozigotos ou homozigotos para o alelo 2 destes dois genes apresentaram um risco 19 vezes maior de desenvolver a doença periodontal quando comparados aos portadores do alelo 1.

Para avaliar a utilidade desta associação, é necessário conhecer a freqüência destes polimorfismos na população. Existe pouca informação sobre a presença de polimorfismos na população brasileira. Então, o objetivo deste estudo foi verificar presença da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (+3954), IL-1B (-511), IL-1RN (ítron 2-VNTR) e TNFA (-308) em um grupo de 50

pacientes não fumantes com PAg e em um grupo-controle composto por 100 indivíduos não fumantes e com periodonto saudável.

Embora não tenha sido proposital, todos os pacientes portadores de PAg apresentaram a forma generalizada da doença, com média de 16,96 dentes afetados.

Um número expressivo de estudos foi realizado para se determinar a prevalência de doença periodontal em indivíduos jovens e, ao se analisarem esses dados, observa-se variação de 0,1 a 15% na prevalência de PAgL e PAgG (LÖE; BROWN, 1991; HART et al., 1993; MARAZITA et al., 1994). 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 PAgL 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 socio-econômicas 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 números de amostras utilizadas. No presente estudo a amostra foi semelhante ao número de pacientes avaliados por Endo et al. (2001), Brett et al. (2005), Scapoli et al. (2005), Sakellari et al. (2006) e Tai et al. (2002). Apenas o estudo de Li et al. (2004) empregou uma amostra maior, com 122 pacientes com PAgG e 95 indivíduos saudáveis. Em outros estudos, a casuística foi inferior à apresentada em nosso estudo; por exemplo, Hodge, Riggio e Kinane (2001) avaliaram a relação polimorfismo e a PIP em 56 pacientes com PAgG e em 56 controles, Walker et al.

(2000) estudaram 37 pacientes com PJL e 104 pacientes saudáveis, Gonzales et al. (2003) avaliaram o polimorfismo em 44 pacientes com PAgG e em 47 indivíduos-controle, Anusaksathien et al. (2003) avaliaram 43 sujeitos sem doença periodontal e 26 pacientes com PAg, Quappe, Jara e López (2004) selecionaram 75 controles e 36 pacientes com PAg, Trevilatto et al. (2002) estudaram 14 indivíduos com PAg da mesma família e Moreira et al. (2007) 55 pacientes com PAg e 41 indivíduos-controle. Segundo Gunsolley et al. (1995), estudos realizados em amostras pequenas podem não indicar diferenças estatisticamente significantes, que apareceriam observando-se populações maiores.

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.

Também se deve salientar que foram utilizados critérios rígidos na seleção das amostras 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 por Tonetti e Mombelli (1999). Nenhum paciente recebeu algum tipo de

tratamento periodontal previamente à realização dos exames clínico e radiográfico. Além disso, nenhum paciente poderia ser fumante.

O critério idade para classificação da doença periodontal foi questionado no *"International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions"* (ARMITAGE, 1999), pois para os participantes do evento a classificação de qualquer tipo de periodontite não deve ser baseada na idade e sim nos achados clínicos, radiográficos e laboratoriais, mas foi consenso para a classificação da PAg que esta doença, na maioria das vezes, afeta indivíduos com menos de 30 anos, embora alguns indivíduos possam ser mais velhos. A grande parte dos trabalhos apresentados no capítulo de Revisão da Literatura mostrou que os autores selecionaram pacientes portadores de PAg com idade variando de 15 a 50 anos. Por exemplo, Parkhill et al. (2000) incluíram no trabalho pacientes com idade entre 16 a 50 anos, Anusaksathien et al. (2003) de 22 a 39 anos, Quappe, Jara e López (2004) de 17 a 42 anos, Moreira et al. (2007) pacientes de 15 a 46 anos e a média de idade no estudo de Sakellari et al. (2006) foi $42,95 \pm 5,94$ anos. Hodge, Riggio e Kinane (2001) e Li et al. (2004) descrevem como critério de inclusão, pacientes com menos de 35 anos, mas a idade dos indivíduos com PAg variou de 16 a 40 anos em ambos os estudos. Quappe, Jara e López (2004) utilizaram como critério para inclusão pacientes com PAg com idade inferior ou igual a 30 anos, mas selecionaram indivíduos com idade entre 17 e 42 anos. Esta variação muito grande no critério idade pode proporcionar um erro na classificação da doença, pois muitos pacientes poderiam ser portadores de periodontite crônica que foram tratados, mas a doença não regrediu.

Em nosso trabalho, os dois grupos experimentais foram homogêneos em relação às variáveis demográficas, sexo e idade. Tanto no grupo-PAg como no

controle, havia mais mulheres do que homens. O predomínio da população feminina com PAg, também foi encontrado nos trabalhos de Parkhill et al. (2000), de Endo et al. (2001), de Hodge, Riggio e Kinane (2001), de Tai et al. (2002), de Anusaksathien et al. (2003), de Li et al. (2004), de Brett et al. (2005), de Sakellari et al. (2006) e de Moreira et al. (2007). Isto pode ser explicado por uma maior busca de terapia periodontal por mulheres acarretando um 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 hábito de fumar (PREBER ; BERGSTRÖM, 1986; 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 tabagismo 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 hábito de fumar 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). Loe e 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 americanos 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).

A prevalência de indivíduos genótipo-positivo, ou seja, a presença do alelo 2 em diferentes grupos étnicos e a sua relação com as manifestações clínicas da doença tem mostrado resultados contraditórios. Poucos estudos avaliaram esta associação em diferentes formas de periodontite em habitantes de diferentes populações do mundo (ARMITAGE et al., 2000; TAI et al., 2002; THOMSON et al., 2001; WALKER et al., 2000). Contrária às frequências 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 alta para indivíduos afro-americanos (22,5%), também portadores de periodontite crônica (WALKER et al., 2000).

Em nossa avaliação, os 100 indivíduos do grupo-controle apresentaram a frequência de 54% para o genótipo 1/1, 37% para o genótipo 1/2 e 9% para o genótipo 2/2 do gene IL-1A (-889). A frequência dos mesmos genótipos no grupo-PAg não foi estatisticamente diferente: 56% para o genótipo 1/1, 40% para o

genótipo 1/2 e 4% para o genótipo 2/2. A homozigose para o alelo 1, ou seja, o genótipo 1/1 do gene IL-1A (-889) foi a mais encontrada em ambos os grupos estudados e a frequência deste genótipo está de acordo com a encontrada por Hodge et al. (2001), Gonzales et al. (2003), Quappe, Jara e López (2004), Brett et al. (2005), Sakellari et al. (2006) e Moreira et al. (2007). Porém, foi mais baixa do que a encontrada por Tai et al. (2002), Anusaksathien et al. (2003) e Li et al. (2004). O único trabalho na literatura, por nós consultada, que não encontrou o genótipo 1/1 foi o de Trevilatto et al. (2002).

A distribuição do alelo 1 no grupo-controle foi de 72,5% e no grupo-PAG foi de 76%. O alelo 2 ocorreu com frequência de 27,5% no grupo-controle e 24% no grupo-PAG. As frequências dos alelos 1 e 2 para os dois grupos foram estatisticamente semelhantes. Estes achados foram similares aos encontrados por Hodge, Riggio e Kinane (2001), Tai et al. (2002), Gonzales et al. (2003), Quappe, Jara e López (2004), Sakellari et al. (2006), Brett et al. (2005) e Moreira et al. (2007) e foi inferior às frequências encontradas por Li et al. (2004) que observaram a presença do alelo 1 em 92,6% e 94,2% para o grupo-controle e para o grupo-PAGG, respectivamente, e para o alelo 2 em 97,4% do grupo-controle e em 5,8% do grupo-PAGG.

A transmissão do alelo 1 do gene IL-1A (-889) em indivíduos afro-americanos e caucasianos com PIP foi mais frequente do que a do alelo 2 (DIEHL et al., 1999). Hodge, Riggio e Kinane (2001) também não conseguiram mostrar a associação entre o polimorfismo genético IL-1A (-889) com PJG em europeus brancos. A frequência do alelo 2 foi de 33,9% no grupo com doença periodontal e de 34,8% no controle. Os resultados de Gonzalez et al. (2003) também não conseguiram associar a presença do polimorfismo para IL-1A (-889) com PAGG em

pacientes europeus e da América Central. Todos 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 hábito de fumar não alterou os resultados e pareceu não ser significativo quando se comparou pacientes com PJG e controles. Entretanto, McGuire e Nunn (1999) relataram que um genótipo positivo para polimorfismo IL-1 aumenta em 2,7 o risco de perda dental, enquanto o hábito de fumar aumenta em 2,9 vezes. Quando ambos estão combinados o risco é de 7,7 vezes.

Diehl et al. (1999) relataram que o polimorfismo para IL-1B (+3953) é mais importante na susceptibilidade à PAg do que o polimorfismo do gene IL-1A (-889). No nosso estudo, a frequência dos genótipos para o polimorfismo da IL-1B (+3954) foi de 55% para 1/1, 44 % para 1/2 e 1% para o genótipo 2/2 na população com periodonto saudável. Na população com PAg foi de 36% para 1/1, 56% para 1/2 e 8% para 2/2. No grupo-controle, a frequência do alelo 1 foi de 77% e do alelo 2 foi de 23%. No grupo-PAg, o alelo 1 ocorreu com frequência de 81% e o alelo 2 com 19%. A diferença na distribuição dos genótipos e dos alelos, entre os dois grupos, não foi estatisticamente significativa.

Parkhill et al. (2000) associaram a presença do genótipo 1/1 e do alelo 1 para IL-1B (+3953) e a PIP em caucasianos fumantes, mas não encontraram diferenças na distribuição dos genótipos e alelos entre os grupos controle e com PIP não fumantes. O genótipo 1/1 ocorreu em 58,6% dos pacientes do grupo-PIP e em 38,9% dos indivíduos-controle.

Os resultados deste estudo são semelhantes aos achados de Gonzales et al. (2003) para IL-1B (+3954), que relataram a frequência, na população caucasiana européia, de 51,5% para o genótipo 1/1 no grupo controle e 53,57% no grupo-PAg e frequência de 12,12% no grupo-controle e 10,7% no grupo-PAg para o genótipo 2/2.

Na população da América Central 64,28% do grupo-controle e 62,5% do grupo-PAg apresentaram o genótipo 1/1 e 14,28% do grupo-controle e 12,5% do grupo-PAg o genótipo 2/2. Houve semelhança na distribuição dos genótipos nas duas populações em ambos os grupos.

No trabalho de Walker et al. (2000), o genótipo 1/1 foi o mais encontrado na população afro-americana sendo identificado em 73% dos indivíduos periodontalmente saudáveis e 84% dos pacientes com PIP. A frequência do genótipo 1/1 para IL-1B (+3954) também foi alta em pacientes japoneses com PAgG (95,7%) e nos indivíduos saudáveis (90,7%) (TAI et al., 2002) e não foi encontrado nenhum indivíduo de ambos os grupos com genótipo 2/2. O mesmo ocorreu no trabalho de Anusaksathien et al. (2003), onde a frequência do genótipo 1/1 foi alta em ambos os grupos (97,7% para o grupo-controle e 92,3% para o grupo-PAg) e também não ocorreu nenhum genótipo 2/2. Li et al. (2004) também encontraram distribuição alta do genótipo 1/1 (97,9% no grupo-controle e 93,4% no grupo-PAgG) e nenhum indivíduo foi homozigoto 2/2 no grupo-controle e no grupo-PAgG 0,8% dos pacientes foram homozigotos para o alelo 2.

Embora Hodge et al. (2001) tenham encontrado valores superiores ao do nosso estudo na distribuição do genótipo 2/2 (12,5%) e do alelo 2 (31,2%), tanto no grupo-controle como no PIPG, não foi possível associar a PIPG com o polimorfismo para IL-1B (+3953) na população européia caucasiana fumante e não fumante. Shakelarri et al. (2006) também não encontraram associação entre polimorfismo e a PAg em pacientes gregos fumantes e na fumantes.

Quappe, Jara e López (2004) associaram o polimorfismo para IL-1B (+3954) com a PAg em chilenos fumantes e não fumantes. A frequência da homozigose para o alelo 1 foi mais alta nos indivíduos sem doença periodontal do que no grupo com

doença. O genótipo 1/2 mostrou associação positiva com a PAg. Brett et al. (2006) também associaram a presença do genótipo 2/2 com a PAg em pacientes caucasianos fumantes e não fumantes.

No presente estudo, a frequência de homozigose para o alelo 2 (genótipo 2/2) para IL-1B (+3954) foi de 4% , semelhante à observada por Hodge et al. (2001) e Parkhill et al. (2000) (5,63% e 12,5%, respectivamente) e foi superior à encontrada por Quappe, Jara e López (2005) e Trevilatto et al. (2006). A grande discrepância nas frequências de homozigose para o alelo 2 para IL-1B (+3954) provavelmente reflete diferenças étnicas e raciais na análise dos polimorfismos. Por exemplo, na população afro-americana (WALKER et al., 2000), a frequência de homozigose para o alelo 2 de IL-1B foi de 0% nos indivíduos doentes e 1% nos saudáveis, em chineses foi de 0,7% (ARMITAGE et al., 2000) e foi ausente na população japonesa (TAI et al., 2002).

Quando se avaliou a distribuição dos genótipos para IL-1B (-511), os resultados mostraram que no grupo-controle, 43% dos indivíduos apresentaram o genótipo 1/1, 44% o genótipo 1/2 e 1% o genótipo 2/2. No grupo-PAg, o genótipo 1/1 ocorreu em 66% dos pacientes, o genótipo 1/2 em 30% e o 2/2 em 4%. A distribuição do alelo 1 foi de 77% no grupo-controle e de 81 % no grupo-PAg. O alelo 2 ocorreu em 23% dos indivíduos do grupo-controle e 19% do grupo-PAg. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos e alelos em ambos os grupos.

A distribuição do genótipo 2/2 para IL-1B (-511) em nosso estudo foi menor que a encontrada por Tai et al. (2002) na população japonesa. Esses autores encontraram 15,5% da população-controle com o genótipo 2/2 e 19,1% dos pacientes com PAg com este genótipo. Mesmo com uma frequência alta do genótipo

2/2 e do alelo 2, esses autores não associaram o polimorfismo do gene IL-1B (-511) e a PAg. O trabalho de Li et al. (2004) também mostrou alta frequência do genótipo 2/2 na população chinesa. Cerca de 24,2% do grupo-controle e 27,9% do grupo-PAgG apresentaram este genótipo. A frequência do genótipo 1/2 também foi alta, ocorrendo em 46,3% no grupo-controle e 45,1% no grupo PAgG. Não houve associação significativa entre a distribuição dos genótipos e alelos quando se analisou a população masculina e feminina juntas, mas quando foi realizada a análise da população masculina com PAgG isoladamente a frequência do genótipo 1/2 estava aumentada significativamente. Foi encontrada uma possível associação entre o polimorfismo para IL-1B (-511) e a PAgG em chineses fumantes. No trabalho de Brett et al. (2005), a frequência do genótipo 2/2 (10% grupo-controle e 12% grupo-PAg) também foi maior do que a observada no presente estudo.

Em relação ao gene IL-1RN (ínteron 2-VNTR) este estudo mostrou uma frequência de 48% para o genótipo 1/1, 43% para o genótipo 1/2, 7% para o genótipo 1/4 e 2% para o genótipo 2/2 no grupo onde os indivíduos não apresentavam doença periodontal. No grupo-PAg, o genótipo 1/1 ocorreu em 40%, o genótipo 1/2 em 44%, o genótipo 1/4 em 2% e o genótipo 2/2 em 14% dos participantes. Com estes resultados sobre a distribuição dos genótipos, podemos afirmar que existe associação estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados (p-valor= 0,021). O alelo 1 ocorreu com frequência de 73% no grupo-controle e com 63% no grupo-PAg. O alelo 2 foi observado em 23,5% do grupo-controle e em 36% do grupo-PAg. O alelo 4 ocorreu em 3,5% do grupo-controle e em 1% do grupo-PAg. Estes dados mostram que a diferença na distribuição dos alelos entre os dois grupos foi estatisticamente significativa (p-valor= 0,04).

Assim como em nosso estudo, Tai et al. (2002) encontraram associação entre a presença do alelo 2 para o polimorfismo do gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) e a PAgG em japoneses. A ocorrência do alelo 2 foi de 25,5% nos com PAgG, enquanto somente 8,2% do grupo-controle apresentou este alelo. A frequência deste alelo no grupo-PAgG foi superior a encontrada em nosso estudo. Embora a presença do alelo 2 esteja associada a PAgG na população estudada, esses autores não encontraram nenhum participante homozigoto para o alelo 2, somente ocorreram indivíduos com genótipo 1/1 e 1/2.

Os resultados do trabalho de Berdeli et al. (2006) indicaram que uma positividade para o alelo 2 do gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) está associada com a PAgG em pacientes turcos. Os dados mostraram que a distribuição do genótipo 2/2 e do alelo 2 no grupo com PAgG foi maior que a encontrada na população de referência onde não se sabia a condição periodontal dos indivíduos. O alelo 2 ocorreu em 34,6% dos pacientes com PAgG, distribuição semelhante a encontrada em nosso estudo.

Ao contrário do que o presente estudo mostrou, Parkhill et al. (2000), Li et al. (2004) e Sakellari et al. (2006) não mostraram evidência de associação entre o polimorfismo para IL-1RN (íntron 2-VNTR) e a PAg. No trabalho de Parkhill et al. (2000) a frequência do alelo 2, no grupo de pacientes caucasianos fumantes ou não fumantes com PJI, foi similar (31,4%) a encontrada nos indivíduos saudáveis (48,6%). No estudo de Li et al. (2004) a distribuição do alelo 2 nos pacientes chineses com PAgG, também foi similar (14,8%) a encontrada no grupo sem doença periodontal (17,9%). O mesmo ocorreu no trabalho de Sakellari et al. (2006) onde os resultados mostraram a frequência do genótipo 2/2 foi semelhante (11%)

entre o grupo de pacientes gregos fumantes ou não fumantes com PAg e o grupo de indivíduos sem doença periodontal (10%).

Com o mesmo objetivo de avaliar a susceptibilidade à doença periodontal, os polimorfismos genéticos de outras citocinas foram estudados; entre eles o do TNF- α . 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 os de pacientes sem doença periodontal. Este resultado sugeriu que uma produção aumentada deste mediador químico pode influenciar a patogênese da PAg. Entretanto, Shapira et al. (2001) não conseguiram demonstrar nenhuma associação entre o polimorfismo genético e a PAgL.

Em relação ao gene TNFA (-308), este estudo mostrou uma frequência de 69,9% para o genótipo 1/1, 27% para o genótipo 2/1 e 4% para o genótipo 2/2 no grupo-controle e de 80% para o genótipo 1/1, 18% para o genótipo 2/1 e 2% para o genótipo 2/2 no grupo-PAg. O alelo 1 ocorreu com frequência de 82,5% para o grupo-controle e de 89% para o grupo-PAg. O alelo 2 foi observado com frequência de 17,5% para o grupo-controle e de 11% para o grupo-PAg. Comparando-se a frequência dos genótipos e alelos entre os dois grupos, não se observou diferença estatisticamente significativa.

Estes resultados estão de acordo com os de Kinane et al. (1999) que também não encontraram nenhuma associação entre o polimorfismo do gene TNFA (-308) e a PAgG. 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 o mais frequente (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 significativo, na prevalência do genótipo 1/1 em pacientes com PAg.

Comparações entre os resultados de diversos estudos da associação de polimorfismos e doença periodontal são difíceis devido aos diferentes critérios de diagnóstico e de seleção de pacientes, ao baixo número de indivíduos estudados e aos critérios empregados para definir os grupos controles. Alguns estudos avaliaram a presença de polimorfismos em indivíduos onde não se conhecia a condição periodontal, o que envolve a possibilidade de haver indivíduos com doença periodontal semelhante à apresentada pelo grupo com doença.

Estudos recentes têm aumentado o nosso conhecimento em relação à existência de associações entre os polimorfismos genéticos das citocinas e a doença periodontal. Atenção maior foi dada ao polimorfismo do gene IL-1 desde que o primeiro estudo feito por Kornman et al. (1997) encontrou associação entre o polimorfismo do gene IL-1A (-889) e o IL-1B (+3953) e o aumento da severidade da doença periodontal. Após este estudo pioneiro, resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores em diferentes populações (PARKHILL et al., 2000; CULLINAN et al., 2001; Mc DEVITT et al., 2000). Entretanto, outros trabalhos mostraram dados contraditórios, indicando que o polimorfismo para os genes IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) não está associado ao aumento na severidade da doença periodontal nas populações caucasiana, afro-americana, hispânica, japonesa, tailandesa e grega (DIEHLI et al., 1999, PARKHILL et al., 2000, WALKER et al.,

2000, HODGE et al., 2001, TAI et al., 2002, GONZALEZ et al., 2003, ANUSAKSATHIEN et al., 2003 e SAKELLARI et al., 2006).

No presente estudo, nós investigamos a frequência de cinco polimorfismos: IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2-VNTR) e TNFA (-308) em indivíduos brasileiros e a sua relação com a PAg. Nenhuma diferença foi observada entre os sujeitos saudáveis e os pacientes com PAg com relação aos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308), mas foi encontrada a associação entre o polimorfismo do gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) e a PAg. Embora os polimorfismos para IL-1A e IL-1B sejam muito estudados, existe um número limitado de trabalhos relacionando o polimorfismo para IL-1RN (íntron 2-VNTR) e as diferentes formas de doença periodontal em diferentes populações. Não foi encontrado nenhum outro estudo sobre a investigação dos genótipos e alelos para este polimorfismo na população brasileira. Então, nossos dados podem ser úteis e servirem de referência para estudos futuros na nossa população.

Para Nevins, M e 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 o 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 de desenvolver problemas periodontais mais severos. O conhecimento do perfil genético de indivíduos susceptíveis à periodontite identificaria aqueles cuja exposição ambiental deve ser modificada para prevenir a doença. Por outro lado, segundo 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. 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 a associação de múltiplos polimorfismos para que 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.

As PAg são consideradas doenças multifatoriais, desenvolvidas como resultado de complexas interações entre o hospedeiro, a microbiota e o ambiente e embora tenhamos encontrado associação entre o polimorfismo do gene IL-1RN (intron 2-VNTR) e a PAg, deve-se considerar a possibilidade de realização de avaliações microbiológicas nos pacientes do nosso estudo. A detecção de microrganismos periodontopatogênicos poderia complementar uma avaliação dos fatores etiológicos presentes 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 não apresentarão a doença periodontal. Além disso, é necessário pesquisar o polimorfismo de outros genes. Sendo assim, poderemos avaliar de maneira mais precisa a influência dessas variáveis sobre a doença periodontal.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1- não houve a associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva e
- 2- houve associação entre o polimorfismo do gene IL-1RN (íntron 2-VNTR) e a periodontite agressiva na população estudada.

REFERÊNCIAS¹

Abel L, Dessein AJ. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 1997;9:509-16.

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.

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.

Anusaksathien O, Lukboon A, Sitthiphong P, Teanpaisan R. Distribution of interleukin-1 β (+3954) and IL-1 α genetic variations in a Thai population group. *J Periodontol* 2003;74:1796-802.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998;16:27-55

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.

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

Armitage GC. Development of a Classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.

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

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.

Berdeli A, Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Köse T. Association of the IL-1RN2 allele with periodontal disease. *Clin Biochem* 2006;39:357-62.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines 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 autosomal 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.

Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, DiAuto F, et al. Functional gene polymorphism in aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005;84:1149-53.

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.

Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Feddy MJ, LANf NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin gene polymorphism and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* 2001;28(12):1137-44.

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.

Di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human interleukin 1- β gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:450.

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

Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J* 1988;2:108-15.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112:321-9.

Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor- α gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001;72(11):1554-9.

Engelbrechtson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AGA. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin- β and tumor necrosis factor - α in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999;70:567-73.

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. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000 1997;14:112-43.

Gjeramo 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. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk 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. Assessment 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.

Kashiwagi H, Suzuki H. Specific cytokine and their therapeutic potentials – an overview. *Internal Med* 1992;31:1245-9.

Kaslick RS, West TL, Chasens AI, Terascki PI, Lazzara R, Weinberg S. Association 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 tumor 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 cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998;3(1):327-38.

Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects on stimulus and cell type on the expression on the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 2000;12:110-19.

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.

Li QY, Zhao HS, Meng HX, Zhang L, Xu L, Chen ZB, et al. Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *J Periodontol* 2004;75:1627-35.

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 periodontitis: 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.

Malo D, Skamene E. Genetic control on host resistance to infection. *Trend Gene* 1994;10:365-71

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.

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

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

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingival by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* 1992;76:42-7.

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 1 α polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995;38(2):221-8.

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

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

Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO, The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilians individuals. J Periodontol Res 2007;42:23-30.

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.

Nicklin MJH, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. Genomics 2002;79:718-25.

Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human 18 gene IL18 maps to 11q22.2q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. Genomics 1998;52:161-3.

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, Zambon JJ. Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996;1:926-32.

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):389-96.

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.

Pociot F, Wilson AG, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:3050-3.

Preber H, Bergström J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scand J Dent Res* 1986;94(2):102-8.

Quappe L, Jara L, López NJ. Association of interleukin polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:1509-15.

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

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontology* 2000 2003;32:50-8.

Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embeded tissue. *Pathol Res Pract* 2006;202:523-9.

Roberts FA, Hockett RD Jr, Bucy RP, Michalek SM. Quantitative assessment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:336-44.

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

Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arksenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006;33:765-70.

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. Autosomal 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 Dyke T. 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-1 β , IL-6 and TNF α by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65(2):139-46.

Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphism in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1 α protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* 2000;79:1864-9.

Sims JE, Nicklin MJH, Bazan JF, Barton JL, Busfield SJ, Ford JE, et al. A new nomenclature for IL-1 family genes. *Trend Immunol* 2001;22:536-37.

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, Tetchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. J Biol Chem 2000;275:1169-75.

Sofer 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 cytokines in periodontal disease. J Periodontol 1991;62:504-9.

Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1beta loci. Genomics 1992;13:654-7.

Strachan T, Read AP. Genética molecular humana. 2ª ed. Trad. de Henrique B. Ferreira, João H. C. Kanan, Luciane M. P. Passaglia, Rivo R. Fischer e Thais L. Resende. Porto Alegre: Artmed® Editora Ltda.;2002.

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

Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. Hum Genet 1993;91:403-4.

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.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-Onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4:39-53.

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MAN, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SRP. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:233-9.

van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1994;236:19-27.

Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, Di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphism of the IL-1 α and IL-1 β 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 polymorphism in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *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 Giovine FS, Blakemore AL, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF α) 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.

Wilton JM, Bampton JL, Griffiths GS, Curtis MA, Life JS, Johnson NW, et al. Interleukin 1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol* 1992;19:53-7.

Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Differential characterization of women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am L Obstet Gynecol* 2002;187:589-94.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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 TNF α -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

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, para avaliar a relação entre uma pequena mudança no DNA e doenças periodontais que ocorrem em pessoas jovens e que têm como resultado a rápida destruição dos tecidos ao redor dos dentes.

Os estudos mostram que algumas pessoas podem ser mais sensíveis, pois há uma tendência na família.

Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a cirurgiã-dentista Nívea Maria de Freitas, que pode ser encontrada na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, telefone 3091-7833.

É garantida a sua liberdade de retirar-se do estudo a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas neste estudo em hipótese alguma serão divulgadas com a sua identificação (nome ou dados pessoais).

Não há despesas pessoais para o paciente em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

O(a) senhor(a) será avaliado(a) por um dentista especializado em gengiva e serão feitos exames clínicos e radiográficos. Também será coletada amostra da sua saliva. O(a) senhor(a) deverá cuspir a saliva em um coletor estéril e para isto será instruído(a) para não comer ou escovar os dentes 30 minutos antes do exame.

Será realizado um exame clínico da sua gengiva e este exame apresenta os mesmos riscos e desconfortos de um exame odontológico de rotina.

O examinador (dentista) realizará 14 radiografias periapicais. As radiografias, em odontologia, são usadas como rotina e juntamente com os sinais e sintomas clínicos será feito o diagnóstico de cada caso. A exposição do(a) sr(a) à radiação será mínima, porque será utilizado avental de chumbo para proteção, filmes radiográfico ultra-rápido e o aparelho de raio X será regulado de modo que a dose de radiação seja mínima.

Durante o exame radiográfico o(a) sr(a) poderá sentir algum desconforto como ânsia, pois serão utilizados suportes especiais para o filme radiográfico. Este desconforto será passageiro e passará assim que o dentista remover o suporte e o filme radiográfico da sua boca.

Talvez esta pesquisa não beneficie o(a) sr(a) diretamente, mas vocês estarão ajudando os dentistas a realizarem um diagnóstico mais rápido e a realizarem um tratamento mais adequado em outros pacientes que possuam sinal da doença.

Diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa o(a) sr(a) deverá entrar em contato com o Departamento de Estomatologia – Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pelo telefone 3091-7833.

Estou suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Discuti com a dentista Nívea Maria de Freitas sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanentes. Ficou claro também que minha

participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente / representante legal

data / /

RG nº

Assinatura da testemunha

data / /

RG nº

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dra. Nívea Maria de Freitas

Investigadora principal