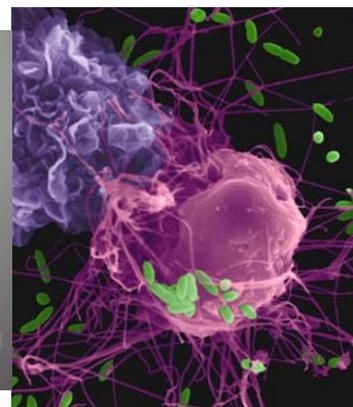


*Alessandra Rosa de Sá*

**Estudo da associação entre polimorfismos funcionais nos genes *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA* e o abscesso periapical agudo**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG - 2006



# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# **Estudo da associação entre polimorfismos funcionais nos genes *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA* e o abscesso periapical agudo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientador: **Prof. Ricardo Santiago Gomez**

Co-Orientadora: **Prof<sup>a</sup> Walderez Ornelas Dutra**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte – MG

2006

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser nossa força maior rumo ao aprendizado da vida.

À minha querida mãe, pelo imenso carinho, pela presença constante e pelo exemplo profissional.

Ao meu pai, sempre em minha lembrança.

Ao meu irmão, pela boa vontade de sempre.

Ao meu querido César, pelo amor e cumplicidade incondicionais.

Aos amigos do laboratório, pela ótima convivência e ajuda dispensadas:  
Jeane, André, Flávio, Eliza, Luciano e Guilherme.

À Profa. Juliana Vilela Bastos, pela viabilização da coleta de amostras na clínica do Projeto de Extensão “Traumatismos Dentários”.

Às minhas amigas Sô e Karen por serem tão presentes na minha vida profissional.

À Júnia Victória e Paula Rocha, por fazerem parte da elaboração e conclusão deste trabalho, com grande carinho e disponibilidade.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Prof. Ricardo Santiago Gomez, pela oportunidade que me foi dada de fazer parte do seu Programa de Pós Graduação e pela constante atenção dispensada durante esses anos de convivência.

À Profa Walderez Ornelas Dutra, pelo cuidado e carinho depositados neste trabalho.

Ao Prof Evanguedes Kalapothakis por ter me ensinado os primeiros passos da Biologia Molecular.e pela grande ajuda no processo de padronização dos protocolos deste trabalho.

Ao Prof Ivan Sampaio pela disponibilidade e atenção com as quais me ensinou e realizou a análise estatística Multivariada em Componentes Principais.

“O conhecimento real não é construção de alguns dias. É obra do tempo”.

*André Luiz*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica	18
2.2 Receptor CD14	20
2.3 Citocinas	21
2.3.1 Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	22
2.3.2 Interleucina-6 (IL-6)	23
2.3.3 Interleucina-10 (IL-10)	25
2.3.4 Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	26
2.4 Imunopatologia das lesões periapicais inflamatórias	28
2.5 Polimorfismos genéticos nas respostas imunes	32
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivo Específico	39
4 METODOLOGIA	
4.1 Seleção de pacientes e coleta das amostras	40
4.2 Extração do DNA	41
4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	42

4.4 Eletroforese em gel de agarose	45
4.5 Digestão dos produtos de PCR e análises dos polimorfismos genéticos	45
4.6 Determinação dos genótipos	47
4.7 Análise estatística	48
<b>5 RESULTADOS</b>	
5.1 Avaliação dos produtos de PCR dos polimorfismos estudados	50
5.2 Avaliação da digestão dos produtos de PCR referentes aos polimorfismos estudados	51
5.3 Distribuição dos polimorfismos estudados nos grupos experimental e controle	
5.3.1 Polimorfismo C/T (-260) <i>CD14</i>	56
5.3.2 Polimorfismo C/T (+3954) <i>IL1B</i>	58
5.3.3 Polimorfismo G/C (-174) <i>IL6</i>	60
5.3.4 Polimorfismo G/A (-1082) <i>IL10</i>	62
5.3.5 Polimorfismo G/A (-308) <i>TNFA</i>	64
5.4 Resultados obtidos da distribuição dos genótipos estudados, utilizando-se a Análise Multivariada em Componentes Principais	66
<b>6 DISCUSSÃO</b>	71
<b>7 CONCLUSÕES</b>	79
<b>8 SUMMARY</b>	81
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	82
<b>10 ANEXOS</b>	
Anexo A – Ficha Clínica	98

Anexo B – Dados clínicos coletados dos pacientes dos grupos experimental e controle	100
Anexo C - Soluções utilizadas na extração do DNA	102
Anexo D – Soluções utilizadas na PCR	104
Anexo E – Soluções utilizadas na eletroforese em géis de agarose e de poliacrilamida	105
Anexo F – Seqüências parciais dos genes	109

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1-</b> Sequências dos <i>primers</i> , número de ciclos, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> e tamanho dos produtos de PCR para cada gene	44
<b>TABELA 2-</b> Composição padronizada para a reação de PCR referente aos genes <i>CD14</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>IL10</i> e <i>TNFA</i>	44
<b>TABELA 3-</b> Enzimas utilizadas e produtos da digestão para cada polimorfismo avaliado	46
<b>TABELA 4-</b> Composição padronizada para as reações de digestão referentes aos genes <i>CD14</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>IL10</i> e <i>TNFA</i>	47
<b>TABELA 5-</b> Quantidade de produtos de digestão aplicada, voltagem e tempo de eletroforese para cada gene	48
<b>TABELA 6-</b> Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo C/T (-260), no gene <i>CD14</i> , em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle)	
<b>TABELA 7-</b> Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo C/T (+3954), no gene <i>IL1B</i> , em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle)	59
<b>TABELA 8-</b> Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/C (-174), no gene <i>IL6</i> , em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle)	

**TABELA 9-** Freqüências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/A (-1082), no gene *IL10*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle)

**TABELA 10-** Freqüências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/A (-308), no gene *TNFA*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle)

65

**TABELA 11-** Valores atribuídos às respostas, segundo à variável considerada, e aos respectivos genótipos relacionados às taxas de transcrição de cada proteína

67

**TABELA 12-** Coeficientes de correlação das variáveis estudadas (GRUPOS, *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*) com as três primeiras componentes principais (F1, F2 e F3) e inércias acumuladas

68

## LISTA DE FIGURAS

Página

**FIGURA 1-** Gel de agarose a 1,5% referente aos produtos de PCR para o gene *CD14* (418pb). Canaleta 1 (controle negativo), canaleta 2 (padrão em 100pb) e canaletas 3 a 9 (produtos de PCR das amostras de pacientes)

50

**FIGURA 2-** Gel de agarose a 1,5% referente à padronização dos produtos de PCR para os genes *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*, variando as quantidades de  $MgCl_2$  do tampão. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (controle positivo), canaletas 3, 4, e 5 (produtos de PCR para o gene *IL1B* de 194pb), canaletas 6, 7 e 8 (produtos de PCR para o gene *IL6* de 431pb), canaletas 9, 10 e 11 (produtos de PCR para o gene *IL10* de 377pb) e canaletas 12, 13 e 14 (produtos de PCR para o gene *TNFA* de 107pb)

51

**FIGURA 3-** Gel de agarose a 2% referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* -260, no gene *CD14*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaletas 4 e 5 (pacientes com o genótipo CC), canaletas 3 e 6 (pacientes com o genótipo CT) e canaletas 7 e 8 (pacientes com o genótipo TT)

52

**FIGURA 4-** Gel de poliacrilamida a 10% referente à digestão dos produtos de PCR para a detecção do polimorfismo (C/T), *locus* +3954, no gene *IL1B*. Canaleta 1 (padrão em 25pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo CT), canaleta 4 (pacientes com o genótipo CT) e canaleta 5 (paciente com o genótipo TT)

53

**FIGURA 5-** Gel de agarose de alta resolução a 2% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/C), *locus* -174, no gene *IL6*. Canaleta 1 padrão em 100pb), canaletas 2 e 3 (pacientes com o genótipo CC), canaletas 4 e 5 (pacientes com o genótipo GC) e canaletas 6 e 7 (pacientes com o genótipo GG)

54

**FIGURA 6-** Gel de agarose a 2% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -1082, no gene *IL10*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo GA), canaleta 4 (paciente com o genótipo GG)

e canaleta 5 (paciente com o genótipo AA)

54

**FIGURA 7-** Gel de poliacrilamida a 10% referente à digestão dos produtos de PCR para a detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -308, no gene *TNFA*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo AA), canaleta 4 (paciente com o genótipo GA) e canaleta 5 (paciente com o genótipo GG)

55

**FIGURA 8-** Posição das variáveis segundo os eixos 2 e 3 e suas respectivas coordenadas no eixo 1. Setas: (↑ se positiva e ↓ se negativa)

69

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A-** adenina

**APCs-** células apresentadoras de antígenos

**AP-1-** *activation protein -1*

**APS-** persulfato de amônio

**°C-** grau centígrado

**C-** citosina

**CCAAT/enhancer-binding protein-** proteína ligante do acentuador CCAAT

**CD-** *cluster of differentiation*

**CD4-** *cluster of differentiation 4*

**CD8-** *cluster of differentiation 8*

**CD14-** *cluster of differentiation 14*

**cm-** centímetro

**(C/T)-** troca de uma citosina por uma timina

**CRBP-** *cellular retinol-binding protein*

**DNA-** ácido desoxirribonucléico

**dNTPs-** desoxinucleotídeos trifosfato

**EDTA-** ácido etilendiaminotetracético

**FO-** Faculdade de Odontologia

**G-** guanina

**g-** grama

**(G/A)-** troca de uma guanina por uma adenina

**(G/C)-** troca de uma guanina por uma citosina

**GLB-** *gel loading buffer*

**GM-CSF-** fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

**GuHCL-** hidrocloreto de guanidina

***HaellI-*** enzima de restrição (*Haemophilus aegyptius*)

**HCl-** ácido clorídrico

**HIV-** vírus da imunodeficiência humana

***Hsp92 II-*** enzima de restrição (*Haemophilus influenzae 92*)

**H<sub>2</sub>O-** água

**ICAM-1-** *intercellular adhesion molecule-1*

**IL-** interleucina

**IL1A-** gene que codifica para a proteína IL1- $\alpha$

**IL1B-** gene que codifica para a proteína IL-1 $\beta$

**IL-1ra-** receptor antagonista de interleucina 1

**IL1RN-** gene que codifica para a proteína IL-1ra

**IFN- $\gamma$ -** interferon-gama

**JAKs-** *Janus-kinases*

**Kb-** Kilo-base

**kD-** kilo-dalton

**LB-** linfócito B

**LBP-** *Lipid-binding protein*

**LT-** linfócito T

**LTc-** linfócito T citotóxico

**LPS-** lipopolissacarídeo

**MAP-** *mitogen-activated protein*

**mCD14-** receptor CD14 expresso na membrana celular

**mg-** miligrama

**MHC-** complexo de histocompatibilidade principal

**ml-** mililitro

**mm-** milímetro

**mM-** milimolar

**M-** molar

**MMPs-** metaloproteinases

**$\mu$ l-** microlitro

**Nco I-** enzima de restrição (*Nocardia corallina*)

**NFIL-6-** fator nuclear IL-6

**NF $\kappa$ B-** fator nuclear  $\kappa$ B

**NK-** células *natural killers*

**NlaIII-** enzima de restrição (*Neisseria lactamica*)

**pb-** pares de bases.

**PCR- *Polymerase Chain Reaction*-** reação em cadeia da polimerase

**PGs**- prostaglandinas  
**PGE2**- prostaglandina E2  
**pH**- potencial de hidrogênio  
**q.s.p.**- quantidade suficiente para  
**RNA**- ácido ribonucléico  
**RNAm**- ácido ribonucléico mensageiro  
**RFLP**- polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição  
**sCD14**- receptor CD14 na forma solúvel  
**SCR**- sistema de canais radiculares  
**SNP**- *single nucleotide polymorphism*  
**STAT**- *signal transducer and activator of transcription*  
**T**- timina  
**Taq DNA polimerase** - *thermus aquatius* DNA polimerase  
**TaqI**- enzima de restrição (*Thermus aquatius* YTI)  
**TAE**- tris acetato EDTA  
**TBE**- tris borato EDTA  
**TE**- tris EDTA  
**TEMED**- N,N,N',N',- tetrametiletilenodiamino  
**Th1**- linfócito T *helper* sub-tipo 1  
**Th2**- linfócito T *helper* sub-tipo 2  
**TIMPs-1**- inibidor tecidual das metaloproteinases 1  
**TNF**- fator de necrose tumoral  
**TNF- $\alpha$** - fator de necrose tumoral alfa  
**Tris**- tris-hidroximetilaminometano  
**TrisHCl**- tris-hidroclorídrico  
**UFMG**- Universidade Federal de Minas Gerais  
**V**- voltz  
**VNTR**- polimorfismo de número variável de repetições em *tandem*  
**XagI**- enzima de restrição (*Xanthobacter agilis*)

## RESUMO

Agressões persistentes à polpa dental são capazes de causar danos irreversíveis a esse tecido, levando-o à necrose com posterior formação de lesões periapicais inflamatórias agudas ou crônicas. Mesmo sabendo-se que múltiplos mecanismos imunológicos estão envolvidos na patogenia associada à formação dessas lesões, ainda permanece obscura a natureza precisa dos fatores que levam à cronificação, à evolução imediata para quadros agudos ou ainda à agudização de processos crônicos já existentes. Vários estudos têm mostrado evidências substanciais que sugerem o envolvimento de fatores genéticos na patogênese de várias desordens inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de polimorfismos funcionais em cinco genes envolvidos na resposta imunológica, em pacientes com abscesso periapical agudo. Os polimorfismos funcionais estudados foram os referentes aos genes *CD14* (C/T, locus -260), *IL1B* (C/T, locus +3954), *IL6* (G/C, locus -174), *IL10* (G/A, locus -1082) e *TNFA* (G/A, locus -308). DNA genômico foi obtido de raspados de mucosa jugal de pacientes com abscesso periapical agudo e com lesões periapicais inflamatórias crônicas de origem endodôntica, sem história prévia de agudização. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os polimorfismos estudados nos genes *CD14*, *IL1B*, *IL10* e *TNFA*, em pacientes de ambos os grupos, mesmo quando estes foram estratificados de acordo com o sexo e a idade. Foram encontradas associações entre o genótipo GG e alelo G do polimorfismo no gene *IL6* (G/C, -174), nas mulheres e nos pacientes com idade  $\leq 35$  anos, e manifestação de abscesso periapical agudo. A Análise Multivariada em Componentes Principais sugeriu um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando: genótipo relacionado à alta taxa de transcrição da proteína interleucina (IL)-6; genótipos relacionados às taxas intermediária e alta da proteína IL-1 $\beta$  e genótipo relacionado à baixa taxa de transcrição da proteína fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). O mesmo teste sugeriu que pacientes com genótipos relacionados à alta taxa de transcrição da proteína *CD14* expressaram genótipos relacionados à baixa taxa de transcrição das proteínas IL-6 e IL-10, e vice-versa. A avaliação da ocorrência de polimorfismos funcionais pode auxiliar na identificação de pacientes susceptíveis a desenvolverem a forma aguda da doença, estabelecendo grupos de risco.

## 1 – INTRODUÇÃO

Torabinejad (1994) definiu que agressões persistentes à polpa dental de natureza mecânica, química e, principalmente bacteriana, são capazes de causar danos irreversíveis a esse tecido, levando-o à necrose.

Enquanto a polpa encontrar-se com vitalidade, não é possível a instalação de infecção nesse tecido. Todavia, se necrosado, o tecido pulpar é invadido e colonizado por uma grande variedade de microrganismos, com prevalência de bactérias anaeróbias estritas (Lopes & Siqueira Jr, 2004).

A intensidade da agressão tecidual causada diretamente por bactérias patogênicas é dependente do número e do grau de virulência das mesmas. Os fatores de virulência incluem enzimas (colagenase, hialuronidase, condroitinase, fosfatase ácida, hemolisina), toxinas e produtos metabólicos (butirato, propionato, amônia, indol, compostos sulfurados) (Lopes & Siqueira Jr, 2004).

Além disso, a interação entre bactérias e seus produtos e células de defesa do hospedeiro resulta na liberação de numerosos mediadores que, via sistema de canais radiculares, são capazes de iniciar reações imunológicas nos tecidos periapicais. Tais reações incluem a resposta imune inata, que se dá através de mediadores inflamatórios inatos e a resposta imune adaptativa, mediada por linfócitos T (LT) e citocinas (resposta imune celular), ou mediada por anticorpos (resposta imune humoral). Ambas as reações contribuem para a destruição óssea, que acontece concomitante à formação de lesões periapicais inflamatórias de natureza aguda ou crônica, com o intuito de conter o avanço da infecção endodôntica (Torabinejad *et al.*, 1985; Torabinejad, 1994; Takahashi, 1998).

A progressão dessas lesões acontece e é regulada à medida em que o tecido ósseo ao seu redor é destruído. Vários mediadores inflamatórios têm sido apontados como potentes indutores dessa osteólise. Eles incluem

componentes bacterianos como os lipopolissacárides (LPS), prostaglandinas (PGs), bradicininas, complexos antígeno-anticorpo e citocinas inflamatórias, tais como interleucina (IL)1- $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, produzidas por células do hospedeiro em resposta à infecção (Artese *et al.*, 1991; Stashenko *et al.*, 1992 e 1994; Lim *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997).

Recentemente, estudos têm mostrado evidências substanciais que sugerem o envolvimento de fatores genéticos na patogênese de várias desordens inflamatórias, entre elas artrite reumatóide (Field *et al.*, 1997; Eskdale *et al.*, 1998), lúpus eritematoso sistêmico (D'Alfonso *et al.*, 1996; Eskdale *et al.*, 1997), malária cerebral (McGuire *et al.*, 1994) e doenças periodontais (Kornman *et al.*, 1997; Kinane *et al.*, 1999; Parkhill *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2005), assim como a existência de uma associação entre polimorfismos em genes de citocinas e receptores celulares e variações interindividuais na resposta inflamatória do hospedeiro frente a um estímulo padrão.

Embasados em tais variações, poder-se-ia explicar o porquê de alguns pacientes portadores de lesões periapicais inflamatórias crônicas de origem endodôntica não apresentarem evolução para manifestações agudas, enquanto que outros evoluem rapidamente para quadros clínicos agudos.

A escassez de informações sobre a influência de polimorfismos funcionais em genes envolvidos nas respostas inflamatória e imune, relacionadas às lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica, e o crescente número de estudos relevantes de polimorfismos funcionais em genes de citocinas e receptores em doença periodontal, levou-nos ao interesse de investigar alguns pontos ainda obscuros no que diz respeito à patogênese daquelas lesões.

Considerando a hipótese de que polimorfismos de citocinas e receptores podem estar relacionados a tais eventos pretendemos avaliar, neste estudo, a relação entre polimorfismos funcionais nos genes *CD14*, que codifica para o receptor CD14 e *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*, que codificam para as citocinas IL-1 $\beta$ ,

IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , respectivamente, em pacientes com abscesso periapical agudo. Pretendemos também avaliar a relação desses polimorfismos em grupos de pacientes portadores de dentes com necrose pulpar associados a imagens radiográficas radiolúcidas periapicais, sugestivas de lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica, sem história prévia de agudização, comparados aos pacientes que apresentaram abscesso periapical agudo.

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – Lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica

A classificação clínica mais simples que se conhece das alterações periapicais inflamatórias refere-se apenas a lesões periapicais agudas com ou sem áreas visíveis de tumefação (pericementite apical aguda e abscesso periapical agudo) e lesões periapicais crônicas (granuloma apical, cisto apical e abscesso periapical crônico) (De Deus, 1992).

De acordo com De Deus (1992), a pericementite apical aguda designa uma inflamação do pericemento e, por extensão, do osso de suporte adjacente e representa, na maioria das vezes, formas fugazes, precedendo as outras alterações apicais de evolução aguda ou crônica.

O mesmo autor define o abscesso periapical agudo como um processo inflamatório supurativo, caracterizado pela formação de pus, que afeta os tecidos que envolvem a porção apical do dente, evoluindo rapidamente e causando dor espontânea, pulsátil e lancinante. É também associado a áreas de tumefação, elevação e mobilidade do dente no alvéolo e sensibilidade extrema à percussão e à palpação. O grau de tumefação varia de uma fase ainda não observada pela inspeção até uma celulite (flegmão), ocasionando assimetria bem pronunciada da face. Segundo Nevile *et al.* (1995) e Lopes & Siqueira Jr. (2004) alterações sistêmicas como dor de cabeça, mal-estar, febre, calafrios e linfadenite regional podem estar ou não presentes. Quanto ao aspecto radiográfico da área periapical, este pode se apresentar normal ou mostrar espessamento do pericemento apical ou ao longo deste e, ainda, áreas radiolúcidas maiores, representadas pelas lesões periapicais crônicas que se tornaram agudas (De Deus, 1992).

A lesão periapical crônica é caracterizada pelas entidades patológicas periapicais com estímulos de baixa intensidade, tendendo a ser assintomática e diagnosticada pela presença de uma radioluscência apical vista em exames radiográficos de rotina. Pode haver uma leve sensibilidade à palpação e à percussão e uma fístula pode estar ou não presente. Microscopicamente, pode ser diagnosticada como granuloma apical, cisto apical e abscesso periapical crônico. O abscesso fênix é designado nessa classificação como uma exacerbação aguda que evoluiu de um processo crônico (Cohen & Burns, 1998).

Mesmo se sabendo que múltiplos mecanismos e elementos imunológicos estão envolvidos nas alterações patológicas associadas à formação de lesões periapicais agudas e crônicas, ainda permanece obscura a natureza precisa dos fatores que levam ou à cronificação, ou à evolução para quadros agudos ou ainda à agudização de processos crônicos já existentes.

## 2.2 - Receptor CD14

A molécula CD14 é uma glicoproteína de 55 kilo-daltons (kD), descrita como o principal receptor de endotoxina. É um dos receptores que atuam no reconhecimento de LPS, componente estrutural e principal fator de virulência de bactérias gram-negativas; e de componentes da parede celular de micobactérias ou bactérias gram-positivas. Esse receptor, portanto, pode iniciar a resposta imune inata à invasão bacteriana (Wright *et al.*, 1990; Kitchens *et al.*, 1998; Antaal-Szalmas, 2000).

O receptor CD14 é constitutivamente expresso na superfície celular (mCD14) de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Sugawara *et al.*, 1998). A sua forma solúvel (sCD14) é abundante no soro e aparentemente derivada da secreção e clivagem enzimática da âncora de glicosilfosfatidilinositol do mCD14 (Baldini *et al.*, 1999).

Dentre suas funções biológicas estão sua participação na fagocitose de bactérias gram-negativas (Grunwald *et al.*, 1996), indução da reabsorção óssea por liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta a estímulo por LPS (Amano *et al.*, 1997) e interações monócito-célula endotelial (Hayashi *et al.*, 1999). Além disso, mudanças na expressão de CD14 e, conseqüentemente, nos níveis de CD14 no soro parecem estar associados a um número de estados patológicos (Holla *et al.*, 2002).

### 2.3 - Citocinas

Citocinas são proteínas (geralmente glicoproteínas) de peso molecular relativamente baixo (8 a 25kD) e, frequentemente, consistem de uma única cadeia polipeptídica. Elas regulam processos biológicos importantes, tais como: crescimento e ativação celulares, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e morfogênese (Roitt *et al.*, 1998).

Algumas citocinas promovem inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias, ao passo que outras, por suprimirem tal atividade, são chamadas de antiinflamatórias. IL-4, IL-10 e IL-13 são potentes ativadoras de linfócitos B (LB). Elas também são importantes agentes antiinflamatórios por possuírem a habilidade de suprimir genes das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, fator de necrose tumoral (TNF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e quimiocinas (Dinarello, 2000).

A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado, não existindo como moléculas pré-formadas, e sim necessitando de ativação transcricional. Uma vez sintetizadas, elas são rapidamente secretadas (Arai *et al.*, 1992).

As ações das citocinas são, muitas vezes, pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas e antagônicas e se realizam através de ligações de alta afinidade a receptores específicos, localizados nas membranas das células-alvo (Van Deuren *et al.*, 1992; Abbas *et al.*, 2000).

Após a interação das citocinas com seus receptores, uma cascata bioquímica de eventos intracelulares é ativada, culminando com a resposta induzida por elas. Um mecanismo importante pelo qual as citocinas levam as respostas biológicas é através da ativação do sistema de sinalização *Janus Kinases* (JAK)/*Sinal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). A porção citoplasmática de muitos receptores de citocinas está associada aos

membros dos receptores de tirosina-quinase da família das JAKs. Após a ligação, as JAKs tornam-se ativados por fosforilação. Uma vez ativados, eles fosforilam resíduos específicos de tirosina nos receptores de citocinas. Esses resíduos servem como porta para a entrada dos fatores de transcrição conhecidos como STATs. Proteínas STATs específicas e, até então, inativas são recrutadas aos receptores das citocinas e, então, fosforiladas. Ao mesmo tempo que são liberadas do receptor, as STATs dimerizam-se e são translocadas para o núcleo. Nesse local, dímeros de STATs se ligam a seqüências específicas próximas aos promotores dos genes induzidos por citocinas, resultando na indução de sua produção (Leonard & O'Shea, 1998).

Citocinas possuem efeitos locais e sistêmicos, apresentando padrões de secreção autócrinos (efeitos sobre a célula de origem), parácrinos (efeitos sobre as células do microambiente) e endócrinos (efeitos sobre células distantes) (Van Deuren *et al.*, 1992).

### 2.3.1 – Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Os primeiros estudos sobre a citocina IL-1 $\beta$  foram realizados por Beeson (1948) que focalizou as propriedades produtoras de febre de células do exsudato peritoneal de coelhos. Os eventos históricos foram revisados por Atkins (1960) e, mais recentemente por Dinarello (1999). O fato permanece que o mais potente pirógeno endógeno e indutor da resposta de fase aguda e a mais potente citocina pró-inflamatória que pode influenciar a resposta do hospedeiro em inúmeras doenças é a IL-1 $\beta$  (Merriman *et al.*, 1977).

A IL-1 $\beta$  madura é uma molécula de 17,5kD. A sua atividade biológica está no efeito sinérgico de duas proteínas pró-inflamatórias agonistas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , codificadas pelos respectivos genes *IL1A* e *ILB* que se encontram arrançados em *cluster*, juntamente com o gene *IL1RN*, no braço longo do

cromossomo 2 humano em uma região de 430 kilobases (Kb) (Nicklin *et al.*, 1994; Di Giovine *et al.*, 2000).

As fontes primárias de IL-1 $\beta$  são os monócitos, macrófagos e células dendríticas. LB, células *natural killer* (NK) e queratinócitos também produzem essa citocina (Dinarello, 1989).

A IL-1 $\beta$  está envolvida na ativação de células endoteliais e conseqüente aumento da expressão de *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e selectina-E, proporcionando a migração e recrutamento celulares (Figueredo *et al.*, 1999). Além disso, a IL-1 $\beta$  apresenta também as funções de ativadora de membros da família *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, de potente indutora de prostaglandina E2 (PGE2) e de metaloproteinases (MMPs), assim como da reabsorção óssea osteoclástica (Dinarello, 1989; Lang *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2002). IL-1 $\beta$  é a mais potente das citocinas em estimular reabsorção óssea *in vitro*; sendo quinze vezes mais potente do que a IL-1 $\alpha$  e mil vezes mais potente do que linfotóxina e TNF- $\alpha$  (Bertolini *et al.*, 1986). Outros estudos ainda sugerem que essa citocina pode estimular a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, como a IL-8 e TNF- $\alpha$  (Figueredo *et al.*, 1999).

### 2.3.2 – Interleucina-6 (IL-6)

A citocina IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular variando de 20 a 30 kD, dependendo do tipo celular de origem (Sehgal *et al.*, 1987). É uma citocina pleiotrópica que funciona em ambas as imunidades inata e adaptativa (Abbas *et al.*, 2000).

Essa citocina não é espontaneamente produzida por células normais intactas (Kupper, 1990), sendo que sua síntese e liberação requerem estímulo inflamatório seguido, por exemplo, de ativação celular por LPS

bacteriano ou por citocinas de reabsorção óssea, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Kishimoto, 1989; Littlewood *et al.*, 1991).

A IL-6 é produzida por muitos tipos celulares, tais como células T e B, células NK, monócitos e macrófagos, adipócitos, mastócitos, células endoteliais, células da medula óssea, células endometriais, leiomiócitos, queratinócitos, células mesangiais, condrócitos, osteoblastos, astrócitos, células da micróglia e células da pituitária (Bauer & Hermann, 1991).

Segundo Crowl *et al.* (1991), a IL-6 possui várias ações na imunidade inata, onde estimula a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação: Resposta de Fase Aguda. Também ela inibe a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 em células sanguíneas mononucleares, através da indução de seus receptores antagonistas (Schindler *et al.*, 1990; Tilg *et al.*, 1994).

Na imunidade adaptativa, a IL-6 induz ativação, proliferação e diferenciação de LT, com produção de linfócitos T citotóxicos (LTc) e estimula o crescimento de LB que se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de anticorpos (Schindler *et al.*, 1990).

A IL-6 é produzida localmente no osso, após estimulação por IL-1 e TNF (Lowik *et al.*, 1989) e promove reabsorção óssea tanto sozinha quanto em sinergismo com esses fatores de reabsorção (Ishimi *et al.*, 1990; Feyen *et al.*, 1989). Ela estimula a formação de osteoclastos a partir de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Kurihara *et al.*, 1990) e aumenta o número desses tipos celulares, levando a doenças sistêmicas (Jordan *et al.*, 1995). A IL-6 tem-se mostrado potente indutora de fosfolipase A2, intermediária na via final da produção de leucotrienos, PGs, e fator ativador de plaquetas (Crowl *et al.*, 1991).

Entretanto, dados na literatura vêm também sugerindo um papel anti-inflamatório para a IL-6 (Schindler *et al.*, 1990; Akira *et al.*, 1993; Ramsay *et al.*, 1994; Balto *et al.*, 2001). Ela não estimula diretamente a produção de

colagenase, MMPs ou estromielisina, embora potencialize a produção de PGE2 e colagenase, por condrócitos estimulados por IL-1 e TNF (Akira *et al.*, 1993; Van De Loo *et al.*, 1997). Essa citocina regula, positivamente, o inibidor tecidual das metaloproteinases-1 (TIMPs-1) (Sato *et al.*, 1990; Kopf *et al.*, 1994). A IL-6 é deficiente em induzir expressão de moléculas de adesão sobre células endoteliais e suprime o exsudato agudo de neutrófilos (Fattori *et al.*, 1994). Ela induz produção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) *in vivo* e *in vitro* (Tilg *et al.*, 1994). Existem evidências de que proteínas de fase aguda, reguladas por IL-6, também possuem propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras e atuam como antiproteinases e captadoras de oxigênio (Baumann & Gauldie, 1994; Jordan *et al.*, 1995; Tilg *et al.*, 1997). Tanto IL-1 quanto TNF- $\alpha$ , mas não IL-6 têm sido encontradas como estimuladoras de níveis constantes de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) osteoprotegerina, fator crítico para indução de osteoclastogênese por várias linhagens osteoblásticas humanas (Hofbauer *et al.*, 1999; Sakata *et al.*, 1999).

### 2.3.3 – Interleucina-10 (IL-10)

IL-10 é uma citocina com peso molecular estimado em aproximadamente 18 kD (Vieira *et al.*, 1991) que se encontra profundamente envolvida na regulação das reações inflamatórias e respostas imunes. Ela afeta não somente o sistema imune, mas através da sua ação modulatória sobre fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores, influencia muitos processos fisiológicos incluindo angiogênese, tumorigênese e infecção. É uma molécula-chave no que diz respeito à diminuição do potencial patológico dos processos auto-imunes, através da inibição de muitos eventos da resposta inflamatória (De Waal Malefyt, 2002).

A IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas proinflamatórias (IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) por monócitos e

neutrófilos e IFN- $\gamma$  por LT, e regula negativamente a expressão de moléculas ativadoras e co-estimulatórias sobre monócitos e células dendríticas (Moore *et al.*, 1993; D'Andrea *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1993). A IL-10 também bloqueia a ação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  por aumentar a liberação de IL-1ra solúvel (Marie *et al.*, 1996; Cassatela *et al.*, 1994). A IL-10 possui atividades de fator de crescimento sobre LB e mastócitos, e inibe ou aumenta as atividades de LT, dependendo das condições de ativação e das subclasses, se CD4 ou CD8 (Moore *et al.*, 1993).

IL-10 é produzida por LTc de memória e *naïve*, clones pertencentes aos sub-tipos T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), células NK, LB, linhagens de células B transformadas pelo vírus *Epstein-Barr*, linfoma de Burkitt, monócitos, trofoblastos, células epiteliais bronquiais, e certas células tumorais incluindo melanomas e carcinomas de várias origens (De Waal Malefyt & Moore, 1998).

#### **2.3.4 – Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  é uma citocina de 17kD e é o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microrganismos. Ela é responsável por muitas das complicações sistêmicas de várias infecções, tais como septicemia, choque séptico e falência múltipla dos órgãos. Essas reações do hospedeiro estão associadas a níveis séricos aumentados dessa citocina (Stuber *et al.*, 1996; Abbas *et al.*, 2000).

A principal função fisiológica e local do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos aos sítios de infecção e ativar essas células a erradicar microrganismos. Essa citocina também induz a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, estimula a secreção de quimiocinas por células endoteliais e macrófagos e produção de IL-1 por fagócitos mononucleares. Seus efeitos sistêmicos, quando se apresenta em quantidades moderadas, incluem indução de febre (pirógeno endógeno),

síntese de proteínas plasmáticas pelos hepatócitos (resposta de fase aguda) e caquexia. Já a produção dessa citocina em grandes quantidades pode resultar em insuficiência cardíaca, trombose intravascular e choque séptico (Abbas *et al.*, 2000).

Os tipos celulares que a produzem incluem, além de monócitos e macrófagos, LT, LB, astrócitos, fibroblastos, basófilos, mastócitos, células NK, células de kupfer, leiomíócitos, células epidérmicas e alguns tipos de células tumorais (Aggarwal & Vilcek, 1992).

## 2.4 - Imunopatologia das lesões periapicais inflamatórias

Microrganismos estão localizados em posição privilegiada e estratégica no interior do sistema de canais radiculares (SCR) contendo tecido necrosado. Assim, nesta localização, as células fagocíticas não têm como eliminá-los. Por outro lado, os microrganismos que se deslocam para fora do SCR, inicialmente em direção ao ligamento periodontal, são imediatamente combatidos pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Lopes & Siqueira Jr, 2004).

Como a doença endodôntica apresenta natureza bacteriana, o hospedeiro responde a esse processo infeccioso com uma alteração inflamatória (Cohen & Burns, 1998), que se apresenta com os mesmos eventos, comuns a outras partes do organismo.

Primeiramente, observam-se as características inerentes à resposta imune inata, também chamada inespecífica ou inflamatória aguda: vasoconstrição inicial seguida por vasodilatação mediada por aminas vasoativas, hiperemia, aumento de permeabilidade vascular e formação de edema. Leucócitos, sob estímulos quimiotáticos, deixam os vasos e direcionam-se para o sítio de infecção, com o objetivo de eliminar os microrganismos através da fagocitose. Ainda nessa fase, mediadores de reabsorção óssea, como LPS bacteriano, PGEs, bradicininas e algumas citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) atuam promovendo destruição do tecido ósseo periapical (Stashenko, 1990; Stashenko *et al.*, 1994; Torabinejad, 1994; Takahashi, 1998). Outros importantes mediadores químicos da resposta imune inata, tais como neuropeptídeos, peptídeos fibrinolíticos, fragmentos do sistema complemento, aminas vasoativas, enzimas lisossomais, derivados do ácido aracdônico e radicais livres podem iniciar, amplificar e perpetuar uma alteração patológica dos tecidos periapicais (Torabinejad, 1994; Takahashi, 1998; Lopes & Siqueira Jr, 2004).

O LPS, principal fator de virulência de bactérias gram-negativas, estimula a destruição óssea associada às doenças periapical e periodontal (Stashenko, 1990) e já foi detectado em canais radiculares infectados (Schein & Schilder, 1975) e lesões periapicais inflamatórias (Schonfeld *et al.*, 1982). Esta endotoxina é um potente estimulador de macrófagos, induzindo-os a produzir vários mediadores de reabsorção óssea, como IL-1 e TNF (Burchett *et al.*, 1988). O LPS liga-se à proteína LBP (*lipid-binding protein*) e este complexo é reconhecido pelo receptor CD14 expresso na superfície de monócitos/macrófagos (Page *et al.*, 1997). A ligação a esse receptor inicia uma sinalização transmembrana que ativa a célula e esta começa a secretar PGs, citocinas e MMPs. A secreção desses mediadores causa o aumento da expressão de integrinas e aumento da liberação de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , ativando o processo inflamatório (Roitt *et al.*, 1998; Madianos *et al.*, 2005). Dessa forma, alterações na produção desse receptor podem exercer influências importantes na patogênese das lesões periapicais inflamatórias.

Pelo fato de a IL-1 $\beta$  ser produzida por macrófagos ativados ou células inflamatórias e ter sido identificada na polpa dental humana (D'Souza *et al.*, 1989), ela foi associada ao processo de reabsorção óssea de várias doenças inflamatórias crônicas, tais como a doença periodontal e lesões periapicais (Masada *et al.*, 1990; Barkhordar *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 1994). Níveis aumentados de IL-1 $\beta$  foram detectados no fluido crevicular gengival de pacientes com doença periodontal (Figueredo *et al.*, 1999) e foi estabelecida uma associação entre a gravidade da doença e a produção aumentada de IL-1 $\beta$  (Kornman *et al.*, 1997).

Juntamente com as citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  é o mediador inflamatório há mais tempo estudado em lesões periapicais inflamatórias humanas e murinas, sempre se destacando como importante fator na reabsorção óssea osteoclástica, mesmo sendo considerada mil vezes menos potente do que a IL-1 $\beta$  nessa função (Bertolini *et al.*, 1986; Artese *et al.*, 1991;

Stashenko *et al.*, 1994; Tani-Ishii *et al.*, 1995; Fouad, 1997; Wang *et al.*, 1997; Kawashima & Stashenko, 1999).

Vários estudos já demonstraram a presença de IL-6 em lesões periapicais inflamatórias, bem como sua importância durante a fase de destruição óssea periapical (Kawashima & Stashenko, 1999; Walker *et al.*, 2000; De Sá *et al.*, 2003) e quantidades de IL-6 foram correlacionadas com a extensão do dano tecidual e destruição óssea na periodontite (Prabhu *et al.*, 1996).

Quando da persistência da agressão bacteriana, oriunda do SCR, a qual não é eliminada pela resposta imune inata, dá-se início a uma fase na qual células apresentadoras de antígenos (APCs) e LTs elaboram a resposta imune específica (Lopes & Siqueira Jr, 2004).

Mosmann *et al.* (1986) identificaram, em camundongos, e Del Prete *et al.* (1991), em humanos, subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> funcionalmente distintas, denominadas Th1 e Th2, que produzem padrões diferentes de citocinas. Células Th1, produtoras de IL-2, IFN- $\gamma$  e LT- $\alpha$ , estão envolvidas em reações inflamatórias mediadas por células (resposta imune celular), enquanto que células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e estão envolvidas na produção de anticorpos (resposta imune humoral). Em razão de suas principais citocinas, IFN- $\gamma$  e IL-4, agirem antagonicamente, há uma mútua regulação entre as respostas Th1 e Th2 (Mosmann & Sad, 1996; Mosmann & Coffman, 1989). Ressalta-se que, em seres humanos, IL-10 pode ser produzida por células Th1 e Th2, podendo regular negativamente respostas de um padrão independente do subtipo Th (De Waal Malefyt *et al.*, 1992; Del Prete *et al.*, 1993). A presença de IL-10 em lesões periapicais inflamatórias já foi demonstrada tanto em estudos em humanos, quanto em modelos murinos, ressaltando a sua importância enquanto mecanismo antiinflamatório e modulador (Kawashima & Stashenko, 1999; Walker *et al.*, 2000; Balto *et al.*, 2001).

Atividades mediadas por LTh CD4<sup>+</sup> foram importantes na fase ativa de reabsorção óssea da lesão periapical inflamatória de murinos, ao passo que

LTc CD8<sup>+</sup> foram relacionados à fase crônica (Stashenko & Yu, 1989; Kawashima *et al.*, 1996; Stashenko *et al.*, 1994). Ainda, Stashenko *et al.* (1994) comentaram que IFN- $\gamma$  faz com que o processo de reabsorção óssea seja maior por induzir macrófagos a liberarem mais mediadores de osteólise, tais como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e linfotóxina. Kawashima & Stashenko (1999) encontraram o predomínio de citocinas tipo Th1 durante a fase de destruição óssea periapical, em lesões periapicais murinas. Walker *et al.* (2000) e De Sá *et al.* (2003) encontraram, através de técnicas imuno-histoquímicas, maior número de células positivas para citocinas tipo Th2, em lesões periapicais inflamatórias crônicas humanas.

## 2.5 - Polimorfismos genéticos nas respostas imunes

Polimorfismos são alterações no material genético dos indivíduos, ocorrendo em uma frequência de, no mínimo 1%, que resultam em variações dentro de um padrão ainda considerado biologicamente normal, o que poderá resultar ou não em alterações na função da proteína e fenótipo (Kornman *et al.*, 1997; Miller III *et al.*, 2001).

Em um conceito mais atual, define-se polimorfismo como variações seqüenciais, tais como simples trocas de bases, deleções ou inserções de nucleotídeos, presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado fragmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) (repetições em *tandem*) e duplicações ou deleções gênicas (Miller III *et al.*, 2001).

Alguns polimorfismos têm efeitos significativamente funcionais sobre o produto gênico e são os tipos mais úteis nos estudos associados a doenças, ao passo que outros, localizados fora dos limites do gene, funcionam simplesmente como marcadores úteis para estudos genéticos.

Se um polimorfismo está dentro de uma região codificadora de um gene, poderá ocorrer substituição de um aminoácido naquela posição, resultando em mudanças na atividade da proteína (Wormhoudt *et al.*, 1999).

Um polimorfismo na região promotora poderá alterar a proporção da transcrição. Um polimorfismo localizado nos limites intron/exon pode produzir proteínas incompletas ou inativas como resultado de um *splicing* incorreto do RNAm. Polimorfismos caracterizados por completas deleções gênicas eliminam qualquer atividade funcional da enzima, enquanto polimorfismos que são duplicações do gene inteiro podem resultar em elevados níveis de atividade (Miller III *et al.*, 2001).

As técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos genéticos envolvem os polimorfismos de comprimento de fragmentos de

restrição (RFLPs), descritos primeiramente por Botstein *et al.* (1980) e os polimorfismos de número variável de repetições em *tandem* (VNTRs).

Os RFLPs são polimorfismos de ponto que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Como as enzimas de restrição têm seqüências de reconhecimento específicas no DNA, as alterações da seqüência do DNA genômico acarretam na criação ou destruição de sítios de clivagem alterando, desse modo, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA oriundos da ação da enzima de restrição (Thompson *et al.*, 1993; Jorde *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1998).

Os VNTRs são polimorfismos por inserção/deleção que consistem numa série de comprimentos de fragmentos alélicos, relacionados entre si por um número variável de seqüências de DNA repetidas em *tandem* no intervalo entre dois sítios de restrição (Thompson *et al.*, 1993; Jorde *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1998).

Os VNTRs e os RFLPs são detectados de forma similar, através da amplificação da região de interesse pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior tratamento com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos e originam fragmentos de DNA com comprimentos variados. Enquanto os RFLPs revelam polimorfismos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição, os VNTRs revelam polimorfismos devido a números diferentes de repetições situadas entre dois sítios de restrição (Thompson *et al.*, 1993; Jorde *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1998).

Polimorfismos funcionais em genes de citocinas e outros mediadores inflamatórios, que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção dessas proteínas, têm sido associados a doenças que apresentam uma patogênese inflamatória (Parkhill *et al.*, 2000). A grande maioria desses estudos concentra-se em genes que codificam para citocinas e receptores importantes no processo inflamatório. McDowell *et al.* (1995) constataram que o alelo polimórfico no *locus* -889, no gene *IL1A*, foi encontrado mais freqüentemente em pacientes com artrite reumatóide juvenil quando

comparado ao grupo controle. Da mesma forma, polimorfismos em genes que codificam receptores têm sido investigados. Estudos têm sugerido que o alelo T, *locus* -260, no gene *CD14*, está associado ao aumento do risco de infarto do miocárdio (Hubacek *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2000). Portanto, a investigação e a caracterização dos elementos específicos alterados podem proporcionar biomarcadores aplicáveis em diagnóstico e prognóstico, estimando o risco em indivíduos (Kornman *et al.*, 1997).

O gene *CD14* está localizado no braço longo do cromossomo 5 humano e consiste de 3900 pares de bases (pb) organizados em dois exons e codifica uma proteína de 375 aminoácidos (Ferrero *et al.*, 1988). O sequenciamento da região promotora desse gene permitiu verificar uma região relacionada ao fator de transcrição SV40 *promoter* (Sp) e identificá-la como crítica para a expressão de *CD14* (Hubacek *et al.*, 1999). Alguns polimorfismos funcionais foram identificados na região promotora desse gene, nas posições -1619, -1359, -1145, -809 e -260 (Holla *et al.*, 2002). O primeiro polimorfismo relatado na literatura e o mais estudado, o polimorfismo no *locus* -260, apresenta a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) (C/T) e está localizado próximo ao sítio de ligação dos fatores de transcrição da família Sp, que representam principal influência sobre a expressão de *CD14* em monócitos, e de membros da família da proteína ligante dos acentuadores/CCAAT (*CCAAT/enhancer-binding protein*), que podem desempenhar um importante papel na ativação do promotor durante o desenvolvimento de monócitos (Zhang *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 2000).

O polimorfismo no gene *CD14* (C/T, *locus* -260), acarreta na diminuição da afinidade de ligação ao promotor do fator de transcrição regulador SV40 *promoter*-3 (Sp3), da família Sp, aumentando assim a atividade transcricional (Le Van *et al.*, 2001). Por outro lado, a presença do alelo T favorece a interação da região promotora com outros fatores de transcrição da família Sp, como SV40 *promoter*-1 (Sp1), caracterizados por apresentarem uma atividade estimulatória da transcrição (Vercelli, 2002). Esse polimorfismo destrói o sítio de restrição para a enzima *HaeIII* (Daisuke *et al.*, 2000).

O papel funcional do polimorfismo no gene *CD14* (C/T, *locus* -260), foi indicado por evidências de que indivíduos homocigotos CC apresentam níveis reduzidos de sCD14 e reduzida intensidade de mCD14 quando comparados a indivíduos homocigotos TT. Este fato sugeriu então, que esse polimorfismo pode influenciar a taxa de transcrição desse gene (Baldini *et al.*, 1999; Hubacek *et al.*, 1999). Entretanto, até o presente momento não foram observados dados conclusivos a respeito do modelo genético envolvendo esse polimorfismo. Existem evidências que sugerem um modelo recessivo e outras que sugerem um modelo de co-dominância entre os alelos C e T (Koppelman, comunicação pessoal).

A partir das evidências da alteração funcional gerada pelo polimorfismo no gene *CD14* (C/T, *locus* -260), diversos estudos foram realizados com o objetivo de se estabelecer uma associação entre a ocorrência do mesmo e algumas doenças. Além da associação já citada anteriormente neste trabalho, observada por Hubacek *et al.* (1999) e Shimada *et al.* (2000), em relação ao alelo polimórfico e risco de infarto do miocárdio, Jarvelainen *et al.* (2001) sugeriram que indivíduos homocigotos para esse alelo apresentavam alto risco de desenvolverem cirrose quando comparados aos indivíduos CT e CC. Koppelman *et al.* (2001) concluíram que o polimorfismo nesse gene pode resultar na expressão de um fenótipo alérgico mais grave e, mais recentemente, Holla *et al.* (2002) detectaram uma tendência a uma frequência aumentada de homocigotos TT em indivíduos com doença periodontal crônica grave comparada à forma crônica moderada.

Existem três genes arranjados em *cluster* que regulam a produção de IL-1: *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, localizados no braço longo do cromossomo 2 humano (Nicklin *et al.*, 1994). Recentemente, polimorfismos dentro dos genes desse *cluster* foram descritos e algumas dessas variações genéticas foram associadas a diferenças nos níveis produzidos de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Molvig *et al.*, 1988; Endres *et al.*, 1989), levando alguns indivíduos a apresentarem uma resposta inflamatória mais exacerbada que outros, frente ao mesmo estímulo. Polimorfismos funcionais no *locus* -511 e +3954 do gene *IL-1B* já foram

descritos (Di Giovine *et al.*, 2000). Kornman *et al.* (1999) associaram o polimorfismo de IL-1 ao aumento do risco de doenças cardiovasculares devido à formação de placa aterosclerótica, verificando-se a presença do alelo polimórfico no *locus* +2018 do gene *IL1RN* e no *locus* -511 do gene *IL1B*.

O polimorfismo funcional mais estudado é o *single nucleotide polymorphism* (SNP) que resulta na troca de uma citosina por uma timina (C/T) na posição +3954, no exon 5 do gene, e destrói um sítio de restrição para a enzima de restrição *TaqI* (Pociot *et al.*, 1992). Nesse tipo de polimorfismo, células de indivíduos homozigotos para o alelo T produzem quatro vezes mais IL-1 $\beta$  e células heterozigotas duas vezes mais do que células de indivíduos homozigotos para o alelo C (Pociot *et al.*, 1992; Di Giovine *et al.*, 1996).

A resposta inflamatória que é direcionada em grande parte pela IL-1 é, portanto, geneticamente determinada, com alguns indivíduos tendo uma resposta mais exacerbada do que outros quando submetidos a um mesmo estímulo (Lang *et al.*, 2000). Nos diversos estudos avaliando a presença do alelo polimórfico, o mesmo tem sido relacionado com inúmeras entidades patológicas, tais como artrite reumatóide, psoríase, doença periodontal, fibrose pulmonar e lupus eritematoso (Di Giovine *et al.*, 1995; Kornmam *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 1999; Whyte *et al.*, 2000).

O gene *IL6* humano se localiza no cromossomo 7 e polimorfismos em sua região promotora podem resultar em variações interindividuais no que diz respeito à sua transcrição e expressão. Dentre esses polimorfismos, encontramos os SNPs -597 [G(guanina)/A(adenina)], -572 (G/C) e -174 (G/C) e o polimorfismo da região microssatélite -373 A(n)T(n).

A transcrição do gene dessa citocina é regulada pelos fatores de transcrição fator nuclear IL-6 (NFIL-6), NF $\kappa$ B, Fos/Jun, CRBP (*cellular retinol-binding protein*) e receptor de glicocorticóide (Terry *et al.*, 2000).

Já foi demonstrado que o polimorfismo no gene *IL6* (G/C), *locus* -174, parece reduzir a transcrição de IL-6 pelo fato de se localizar próximo ao sítio de

ligação do receptor para glicocorticóide, um domínio de regulação negativa do promotor capaz de suprimir a transcrição do gene (Ray *et al.*, 1990). Em relação ao mesmo polimorfismo, Fishman *et al.* (1998) encontraram associação do alelo G a maiores níveis de expressão de IL-6, quando comparado ao alelo C. O alelo C contém o sítio de restrição para as enzimas de restrição *Hsp92II* e *NlaIII*, não presente no alelo G (Fishman *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2001).

A presença do alelo G, *locus* -174, no gene *IL6*, pode estar associada à artrite crônica juvenil precoce sistêmica (Fishman *et al.*, 1998), artrite reumatóide (Hirano *et al.*, 1988), osteoporose (Jilka *et al.*, 1992; Poli *et al.*, 1994) e psoríase (Grossman *et al.*, 1989). O alelo C mostra associação com riscos reduzidos de para a doença de Alzheimer (Papassotiropoulos *et al.*, 1999).

O gene *IL10* humano está localizado no braço longo do cromossomo 1 e consiste de cinco exons separados por quatro introns. Vários polimorfismos têm sido observados nesse gene, na região flanqueadora 5'. Eles incluem duas áreas 6-11 (CA)<sub>n</sub> em regiões microssatélites, nas posições -1109 e -3942, assim como três SNP, nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) (Eskdale *et al.*, 1997; Hurme *et al.*, 1998).

Os níveis da atividade e proporção transcricionais do gene *IL10* dependem da ligação dos fatores de transcrição, incluindo AP-1 (*activation protein-1*), PEA-1 e um elemento tipo ETS (E26) (Kube *et al.*, 1995). O polimorfismo (G/A), *locus* -1082, está situado dentro de um sítio de reconhecimento tipo ETS (Kube *et al.*, 1995), podendo, portanto, afetar a ligação desse fator de transcrição, que foi recentemente mostrado atuar como um regulador negativo da produção de IL-2 (Romano-Spica *et al.*, 1995).

Em relação à funcionalidade do polimorfismo G/A (-1082), no gene *IL10*, o alelo G foi associado à maior produção de IL-10 quando comparado ao alelo A (Turner *et al.*, 1997). O alelo A destrói o sítio de restrição para a enzima de restrição *XagI* (Koch *et al.*, 2001).

O gene *TNFA* está localizado na região de classe III do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), no braço curto do cromossomo 6 humano (Wilson *et al.*, 1992 e 1993). Nove polimorfismos já foram descritos dentro de sua região promotora, nas posições -1301, -863, -857, -575, -376, -308, -244 e -238, em relação ao sítio de transcrição (Bayley *et al.*, 2001).

O polimorfismo na posição -308 (G/A) foi associado à produção alterada de TNF- $\alpha$ , estando o alelo A associado de seis a sete vezes à maior atividade transcricional no gene do que a variante G (Wilson *et al.*, 1997). McGuire *et al.* (1994) verificaram a presença de polimorfismo na região promotora de *TNFA* associada aos pacientes com malária cerebral. Os pacientes que apresentaram no genótipo o alelo A, no *locus* -308, demonstraram um aumento de quatro vezes no risco de desenvolver a malária cerebral e de sete vezes de desenvolver seqüelas neurológicas. O alelo A destrói o sítio de restrição para a enzima de restrição *NcoI*. (Wilson *et al.*, 1992). Skoog *et al.* (1999) também demonstraram um outro polimorfismo funcional na posição -863 (C/A), associado a níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  circulante.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo geral**

- Considerando que polimorfismos funcionais em genes de citocinas e receptores celulares influenciam a resposta do hospedeiro frente a um estímulo padrão, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a relação entre alguns polimorfismos funcionais em genes de citocinas e do receptor CD14, em pacientes com abscesso periapical agudo.

#### **3.2 – Objetivo específico**

- Comparar as frequências dos polimorfismos funcionais nos genes *CD14* (C/T, locus -260), *IL1B* (C/T, locus +3954), *IL6* (G/C, locus -174), *IL10* (G/A, locus -1082) e *TNFA* (G/A, locus -308), em pacientes com dentes necrosados associados a imagens radiográficas radiolúcidas periapicais, sugestivas de lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica, sem história de agudização, e pacientes com abscesso periapical agudo.

## **4– METODOLOGIA**

### **4.1 – Seleção de pacientes e coleta das amostras**

Pacientes portadores de dentes com necrose pulpar associados a imagens radiográficas radiolúcidas periapicais, sugestivas de lesões periapicais crônicas de origem endodôntica, e pacientes com abscessos periapicais agudos, atendidos respectivamente nas clínicas de endodontia e cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), foram selecionados para este estudo. Todos os pacientes não relataram alterações sistêmicas, tais como diabetes mellitus, doenças auto-imunes, história de hepatite e infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV). Cada paciente foi submetido à avaliação clínica, conforme ficha clínica (Anexo A). Os pacientes ou representantes legais (daqueles menores de idade) forneceram o consentimento livre e esclarecido para a participação no projeto, de acordo com o estabelecido pela Resolução nº196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG sob o parecer nº ETIC 235/04.

De acordo com os critérios pré-estabelecidos para diagnósticos clínico e radiográfico das lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica, os pacientes foram divididos em:

**GRUPO CONTROLE:** Pacientes portadores de dentes com necrose pulpar associados a imagens radiográficas radiolúcidas periapicais, sugestivas de lesões periapicais inflamatórias crônicas. Os pacientes também deveriam apresentar-se assintomáticos e sem história prévia de agudização. Presença de fístula em região intra ou extra-oral era considerado fator de exclusão.

GRUPO EXPERIMENTAL: Pacientes portadores de abscesso periapical agudo como resultado da evolução de infecção odontogênica de origem endodôntica, com áreas visíveis de tumefação, apresentando-se ou não com alterações sistêmicas, tais como febre, mal-estar, dor de cabeça e linfadenite regional.

Foi tentado, em ambos os grupos, o pareamento das amostras de acordo com sexo, idade e condição sócio-econômica. Após o término da coleta das amostras, a média de idade dos pacientes do grupo experimental foi de  $31,89 \pm 13,94$ , enquanto que no grupo controle esta média foi de  $34,55 \pm 14,12$ . A proporção de homens/mulheres foi de 0,9/1 no grupo experimental e de 1/1 no grupo controle.

Raspados de mucosa jugal foram realizados com espátulas de plástico estéreis. As amostras foram então imediatamente colocadas em um tubo de 1500 microlitros ( $\mu$ l) contendo solução tampão, centrifugadas a 17900 g, em microcentrífuga (Eppendorf – centrifuge 541 R), por 5 minutos e o precipitado armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA.

#### **4.2 – Extração do DNA**

O DNA foi extraído das amostras biológicas dos pacientes pelo método de BOOM *et al.* (1990). O precipitado descrito anteriormente foi misturado a 900  $\mu$ l de solução de tampão de lise (L6) e 40  $\mu$ l de suspensão de sílica. A mistura foi submetida à agitação no vortex e, em seguida, mantida em banho seco, a  $56^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 17900g, em microcentrífuga (Eppendorf – centrifuge 541 R), por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e a sílica lavada por duas vezes com 900 $\mu$ l de tampão de lavagem (L2), repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem.

Foram realizadas mais duas lavagens sucessivas, desta vez com etanol 70% e, finalmente, uma com acetona. O sobrenadante foi então descartado e a sílica seca em banho de areia, a 56°C, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100µl de tampão TRIS-EDTA (TE) – pH 8,0, agitou-se em vortex e incubou-se o material em banho seco, a 56°C, por 12 horas. Após agitação no vortex, o material foi centrifugado e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido e armazenado a -20°C. O DNA extraído foi então utilizado para amplificação das regiões escolhidas, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo C.

#### 4.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR simula o processo natural de duplicação do DNA. Essa técnica foi descrita por SAIKI *et al.* (1988) e aprimorada pelos mesmos em 1988, utilizando a enzima termoestável *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase. As reações foram realizadas no PTC – 100 *Programable Thermal Controller* (MJ Research).

Ela consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA pela enzima acima citada e representa um modo de sintetizar milhões de cópias de uma única sequência de DNA em poucas horas.

O protocolo padrão utilizado na maioria das amplificações de uma sequência de DNA utiliza, para cada gene estudado, pares de oligonucleotídeos denominados *primers* (iniciadores) que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado, também funcionando como iniciadores da reação. Utilizou-se também uma solução Pré-mix (Phoneutria) contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima *Taq* DNA polimerase e tampão de incubação específico IB; a qual foi adicionado o DNA genômico a ser amplificado de cada paciente.

A reação ocorreu em termocicladores (PTC 100, MJ Research) e foi constituída por ciclos de desnaturação (94<sup>0</sup>C por minuto), anelamento (temperatura específica para cada *primer* por 1 minuto), extensão (72<sup>0</sup>C por 1 minuto) e um ciclo de extensão final (72<sup>0</sup>C por 5 minutos). Na desnaturação, ocorre o rompimento das pontes de hidrogênio entre as cadeias de DNA. No anelamento, os *primers* ligam-se às suas seqüências complementares no DNA genômico e flanqueam a região de interesse. Na extensão, a *Taq* polimerase atua sintetizando novas cadeias a partir da região flanqueada pelos *primers*. A repetição desses ciclos permite a síntese de uma seqüência específica de DNA em escala exponencial.

As seqüências de bases dos *primers* utilizados, o número de ciclos, assim como as temperaturas de anelamento dos *primers* e o tamanho dos produtos de PCR para cada gene estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos *primers*, número de ciclos, temperatura de anelamento dos *primers* e tamanho dos produtos de PCR para cada gene.

Genes	Seqüências de bases dos <i>primers</i>	Nº de Ciclos	T(°C) anelamento	Produto de PCR
<i>CD14</i>	5' CTA AGG CAC TGA GGA TCA TCC 3' 5' CAT GGT CGA TAA GTC TTC CG 3' (DAISUKE <i>et al.</i> , 2000)	40	54	418pb
<i>IL1B</i>	5' CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A 3' 5' GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG 3' (KORNMAN <i>et al.</i> , 1997)	35	54	194pb
<i>IL6</i>	5' CAG AAG AAC TCA GAT GAC CTG 3' 5'GTG GGG CTG ATT GGA AAC C 3' (KLEIN <i>et al.</i> , 2001)	35	54	431pb
<i>IL10</i>	5'CCA AGA CAA CAC TAC TAA GGC TCC TTT 3' 5'GCT TCT TAT ATG CTA GTC AGG TA 3' (KOCH <i>et al.</i> , 2001)	35	54	377pb
<i>TNFA</i>	5'AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' 5'TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3' (DI GIOVINE <i>et al.</i> , 2000)	40	54	107pb

As PCR(s) foram realizadas para um volume final de 50µl e a composição que foi padronizada para cada reação está listada na tabela 2.

Tabela 2 – Composição padronizada para a reação de PCR referente aos genes *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*.

Reagentes	<i>CD14</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL10</i>	<i>TNFA</i>
H <sub>2</sub> O	11,0µl	13,0µl	17,0µl	11,0µl	13,0µl
Pré-mix	25,0µl	25,0µl	25,0µl	25,0µl	25,0µl
Primer 1	1,0µl	1,0µl	1,0µl	1,0µl	1,0µl
Primer 2	1,0µl	1,0µl	1,0µl	1,0µl	1,0µl
DNA	12,0µl	10,0µl	6,0µl	12,0µl	10,0µl

Para cada reação foi realizado um controle negativo contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA. O resultado obtido pela análise dos controles negativos indica a confiabilidade da reação e do material obtido, no sentido do material amplificado ser proveniente da amostra de DNA utilizada, e não de DNA contaminante, proveniente do ambiente externo. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo D.

#### **4.4 - Eletroforese em gel de agarose**

A verificação do material amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% de acordo com Maniatis *et al.* (1982). O método consiste na migração do fragmento de DNA através de uma matriz inerte, sob ação de um campo elétrico. Foram avaliados 10µl de cada produto de PCR misturados a 1µl do tampão de corrida *gel loading buffer* (GLB) para cada canaleta do gel. A corrida foi realizada em tampão tris acetato EDTA (TAE) 1x, a 160V, durante 40 minutos. Após o término da corrida, o gel foi revelado com brometo de etídeo 0,1% e as imagens foram digitalizadas para armazenamento dos dados em computador acoplado ao sistema de imagem. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo E.

#### **4.5 – Digestão dos produtos de PCR e análises dos polimorfismos genéticos**

Após verificada a qualidade dos produtos de PCR, através do gel de agarose a 1,5%, os mesmos foram digeridos por enzimas de restrição específicas que são capazes de reconhecer e clivar o DNA em seqüências alvo. A partir dos fragmentos gerados após a digestão, pôde-se estabelecer o genótipo do paciente. Cada reação de digestão foi realizada para um volume final de 30µl, como sugerido na literatura. Durante a etapa de padronização,

foram testados volumes de produto de PCR a serem digeridos (10 e 15µl), volumes dos tampões específicos (2 e 3µl), volumes de enzima de restrição (5, 7 e 10 unidades) e tempos das digestões (2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas).

A relação das enzimas utilizadas para detecção de cada polimorfismo estudado, os tempos e as temperaturas de digestão dos produtos de PCR, assim como as possibilidades de tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão estão listados na tabela 3.

Tabela 3 – Enzimas utilizadas e produtos da digestão para cada polimorfismo avaliado.

Genes	Locus	Produtos da digestão em relação aos genótipos, em pares de bases (pb)	Enzimas de restrição, tempo e temperatura de digestão
CD14	-260 (C/T)	TT=418	<i>HaellI</i>
		CT=418+263+155	(DAISUKE <i>et al.</i> , 2000)
		CC=263+155	37°C por 3 horas
IL1B	+3954 (C/T)	TT=182+12	<i>TaqI</i>
		CT=182+97+85+12	(POCIOT <i>et al.</i> , 1992)
		CC=97+85+12	65°C por 4 horas
IL6	-174 (G/C)	CC=229 + 122 + 51 + 29	<i>HSP92II</i> (*)
		GC=229 + 173 + 122 + 51 + 29	(KLEIN <i>et al.</i> , 2001)
		GG=229 + 173 + 29	37°C por 8 horas
IL10	-1082 (G/A)	AA=280 + 97	<i>XagI</i>
		GA=280 + 253 + 97 + 27	(KOCH <i>et al.</i> , 2001)
		GG=253 + 97 + 27	37°C por 4 horas
TNFA	-308 (G/A)	AA=107	<i>NcoI</i>
		GA=107 + 87 + 20	(WILSON <i>et al.</i> , 1992)
		GG=87 + 20	37°C por 12 horas

(\*) A enzima *HSP92II* foi utilizada no lugar da enzima *NlaIII* (Klein *et al.*, 2001) por não encontrarmos esta disponível para compra.

A composição padronizada para cada reação está listada na tabela 4. As enzimas *HaeIII*, *TaqI*, *HSP9II* e *NcoI* (Promega) e *XagI* (Fermentas) foram utilizadas com seus tampões específicos C, E, K, D e R+, respectivamente, garantindo a atividade ótima das mesmas.

Tabela 4 – Composição padronizada para as reações de digestão referentes aos genes *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*.

Reagentes	<b><i>CD14</i></b>	<b><i>IL1B</i></b>	<b><i>IL6</i></b>	<b><i>IL10</i></b>	<b><i>TNFA</i></b>
Produto de PCR	15µl	15µl	15µl	15µl	15µl
Tampão	3µl	2µl	3µl	3µl	3µl
Enzima	5 unidades	5 unidades	7 unidades	5 unidades	5 unidades
H <sub>2</sub> O	11,0µl	12,0µl	10,8µl	11,0µl	11,0µl
BSA	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl

#### 4.6 - Determinação dos genótipos

Os genótipos foram determinados pela análise molecular do tamanho dos produtos da digestão pela técnica da eletroforese. A visualização dos fragmentos obtidos após a digestão foi realizada em géis de agarose ou poliacrilamida, sendo escolhido o material que forneceu melhores resultados. Dessa forma, foram realizados géis de agarose a 2% (*CD14*, *IL6* e *IL10*), revelados pelo brometo de etídeo 0,1%, gel de poliacrilamida a 10% (18x16cm)

(*IL1B*), revelado pelo brometo de etídeo 0,1% e gel de poliacrilamida a 10% (10x7cm) (*TNFA*), revelado por solução de prata. As quantidades dos produtos de digestão aplicadas, as voltagens e tempos de eletroforese para cada gene estão representadas na tabela 5. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no anexo E.

Tabela 5 - Quantidade de produtos de digestão aplicada, voltagem e tempo de eletroforese para cada gene.

Genes	Quantidade de produto de digestão aplicado	Voltagem	Tempo de eletroforese
<i>CD14</i>	20µl	160V	50 minutos
<i>IL1B</i>	30µl	300V	1 hora
<i>IL6</i>	25µl	160V	1 hora
<i>IL10</i>	25µl	160V	1 hora
<i>TNFA</i>	2µl	170V	1 hora

#### 4.7 - Análise estatística

Os dados resultantes de cada um dos polimorfismos foram analisados usando o teste do Qui-quadrado disponível no *software* BIO-ESTAT 3.0 (Belém: Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq). Quando o n dos pacientes em cada grupo de análise é incompatível com o teste do Qui-quadrado, o programa utilizado oferece o recurso de fornecer, automaticamente, o resultado pelo teste exato de Fisher. Para os cálculos estatísticos, foram consideradas significantes as comparações em que  $p \leq 0,05$ .

Tal teste foi usado considerando-se o universo total de pacientes, assim como sua estratificação em relação ao sexo e à idade dos mesmos. Para definir o intervalo das idades, foram calculadas as médias das idades dos pacientes do grupo experimental (31,89 anos) e do grupo controle (34,55 anos). Sendo assim, os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo um grupo o de pacientes com idade  $\leq 35$  anos e o outro grupo o de pacientes com idade  $>$  que 35 anos.

Neste trabalho utilizamos também a Análise Multivariada em Componentes Principais, disponível no *software* INFOSTAT (Infostat Group, Córdoba, Argentina).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Avaliação dos produtos de PCR dos polimorfismos estudados.

As eletroforeses dos produtos da amplificação pela técnica de PCR estão representadas nas figuras 1 e 2.

A figura 1 mostra um gel de agarose a 1,5%, contendo os produtos de PCR para o gene *CD14* das amostras dos pacientes.

A figura 2 mostra um gel de agarose a 1,5% com a padronização dos produtos de PCR para os genes *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*, variando as quantidades de  $MgCl_2$  do tampão.

Nas eletroforeses realizadas podemos observar bandas com intensidades variadas que indicam quantidades diferenciadas de DNA em cada amostra amplificada.

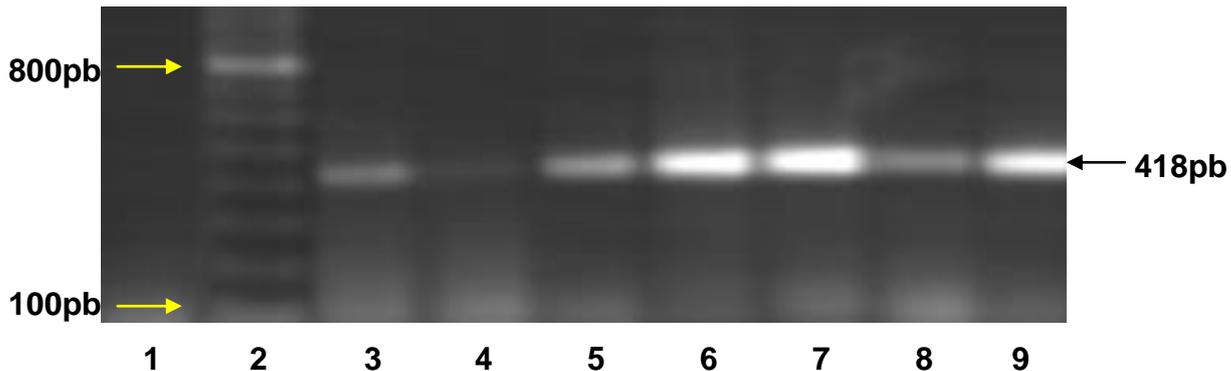


Figura 1 - Gel de agarose a 1,5% referente aos produtos de PCR para o gene *CD14* (418pb). Canaleta 1 (controle negativo), canaleta 2 (padrão em 100pb) e canaletas 3 a 9 (produtos de PCR das amostras de pacientes).

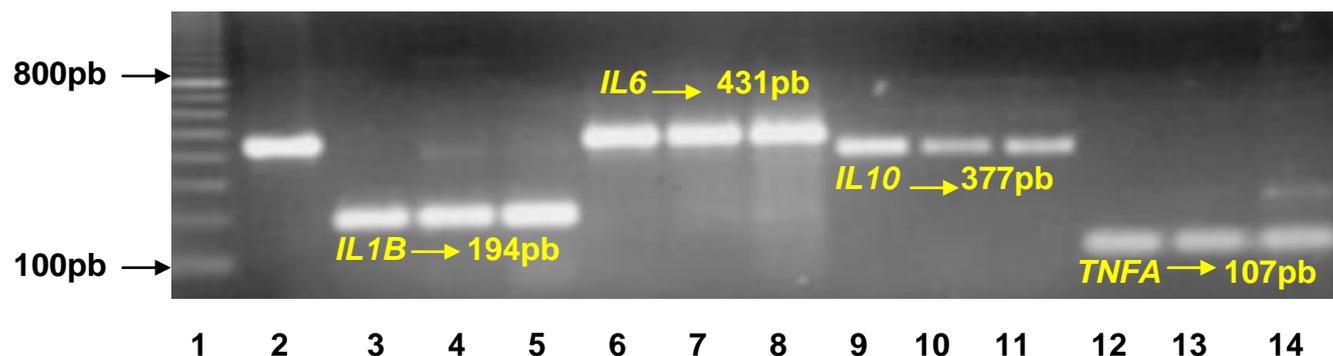


Figura 2 - Gel de agarose a 1,5% referente à padronização dos produtos de PCR para os genes *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*, variando as quantidades de  $MgCl_2$  do tampão. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (controle positivo), canaletas 3, 4, e 5 (produtos de PCR para o gene *IL1B* de 194pb), canaletas 6, 7 e 8 (produtos de PCR para o gene *IL6* de 431pb), canaletas 9, 10 e 11 (produtos de PCR para o gene *IL10* de 377pb) e canaletas 12, 13 e 14 (produtos de PCR para o gene *TNFA* de 107pb).

## 5.2 - Avaliação da digestão dos produtos de PCR referentes aos polimorfismos estudados.

As digestões dos produtos de PCR estão representadas nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

A figura 3 mostra um gel de agarose a 2%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* - 260, no gene *CD14*. Observam-se as bandas de 263pb + 155pb, referentes aos pacientes com genótipo CC (canaletas 4 e 5); as bandas de 418pb + 263pb + 155pb, referentes aos pacientes com genótipo CT (canaletas 3 e 6); e uma banda de 418pb referente aos pacientes com genótipo TT (canaletas 7 e 8).

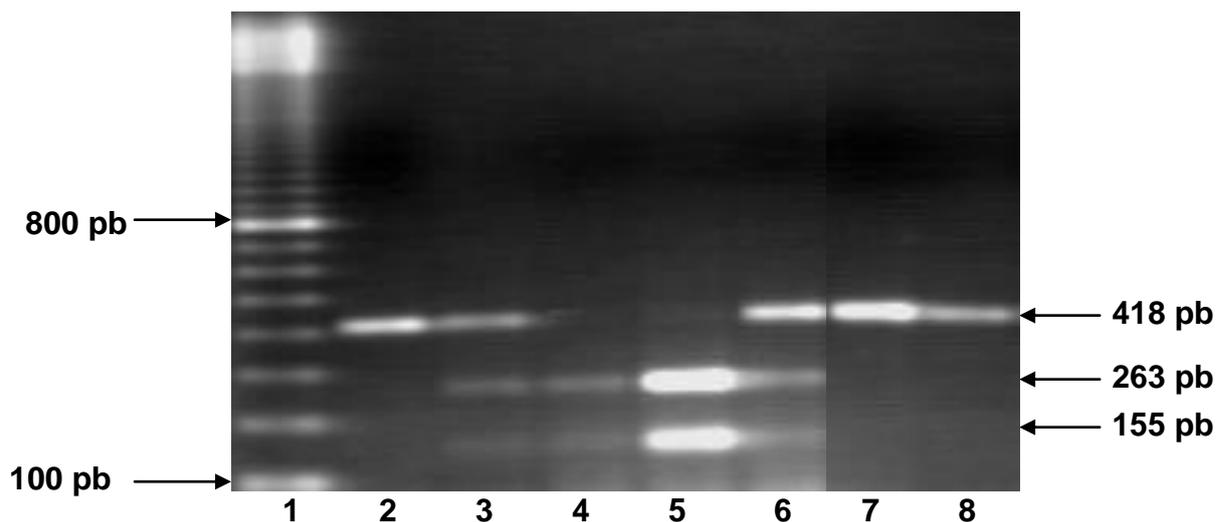


Figura 3 - Gel de agarose a 2% referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* -260, no gene *CD14*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaletas 4 e 5 (pacientes com o genótipo CC), canaletas 3 e 6 (pacientes com o genótipo CT) e canaletas 7 e 8 (pacientes com o genótipo TT).

A figura 4 mostra um gel de poliacrilamida a 10%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* +3954, no gene *IL1B*. Observam-se as bandas de 182pb + 97pb + 85pb, referentes ao paciente com genótipo CT (canaleta 3); as bandas de 97pb + 85pb, referentes ao paciente com genótipo CC (canaleta 4); e a banda de 182pb referente ao paciente com genótipo TT (canaleta 5). Devido à dificuldade de visualização da banda de 12pb, mesmo se utilizando géis de dimensões maiores (18x16cm), a mesma não pôde ser observada. Entretanto, tal fato não impossibilitou a determinação segura dos genótipos, uma vez que a banda de 12pb teria que estar presente em todos os possíveis genótipos, funcionando como um controle interno de corte.

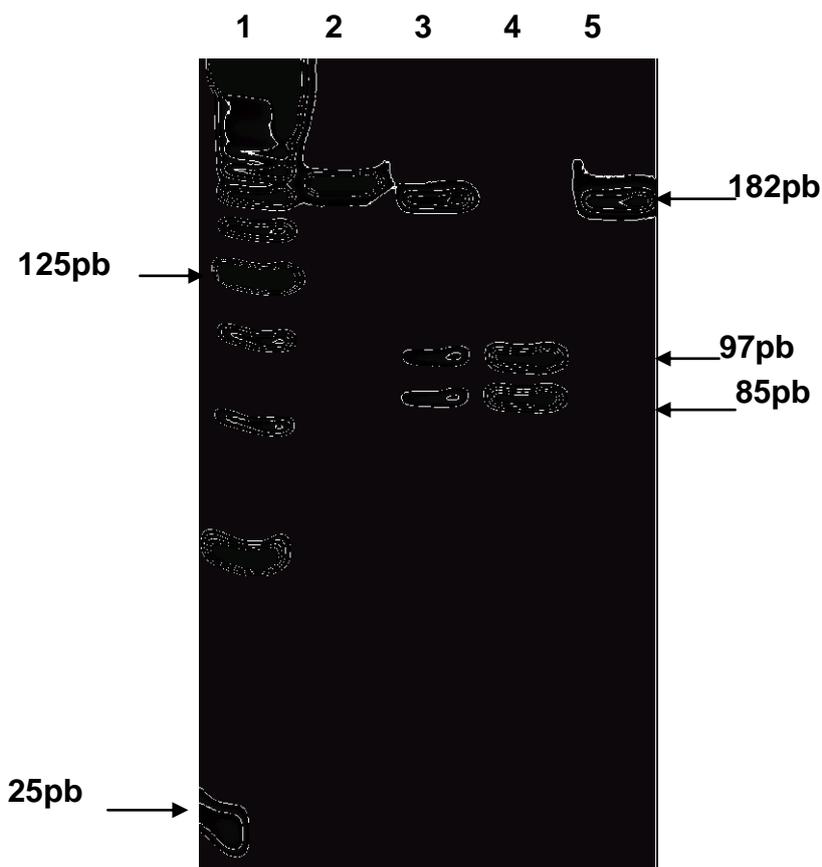


Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 10% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (C/T), *locus* +3954, no gene *IL1B*. Canaleta 1 (padrão em 25pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo CT) canaleta 4 (paciente com o genótipo CC) e canaleta 5 (paciente com o genótipo TT).

A figura 5 mostra um gel de agarose de alta resolução a 2%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/C), *locus* -174, no gene *IL6*. Observam-se as bandas de 229pb + 122pb, referentes aos pacientes com genótipo CC (canaletas 2 e 3); as bandas de 229pb + 173pb + 122pb, referentes aos pacientes com genótipo GC (canaletas 4 e 5); e as bandas de 229pb + 173pb, referentes aos pacientes com genótipo GG (canaletas 7 e 8). Não foi possível a visualização das bandas de 51pb e 29 pb. Entretanto, tal fato não impossibilitou a determinação segura dos genótipos, não deixando dúvidas quanto à efetividade de corte da enzima de restrição.

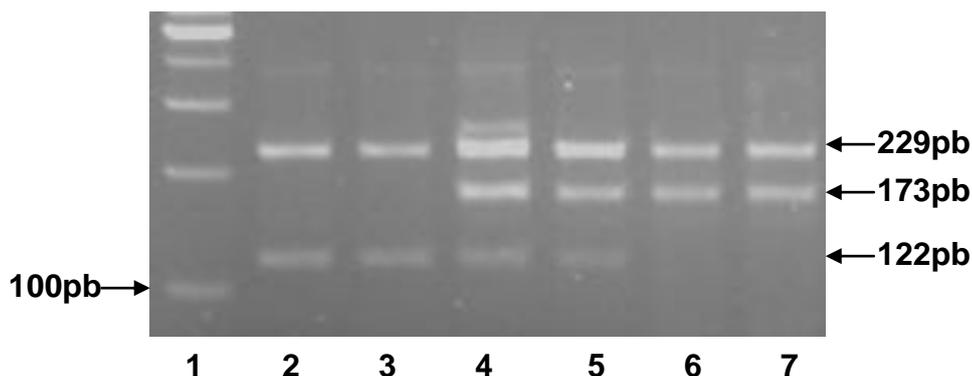


Figura 5 - Gel de agarose de alta resolução a 2% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/C), *locus* -174, no gene *IL6*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaletas 2 e 3 (pacientes com o genótipo CC), canaletas 4 e 5 (pacientes com o genótipo GC) e canaletas 6 e 7 (pacientes com o genótipo GG).

A figura 6 mostra um gel de agarose a 2%, referente às reações de digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -1082, no gene *IL10*. Observam-se as bandas de 280pb + 253pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo GA (canaleta 3); as bandas de 253pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo GG (canaleta 4); e as bandas de 280pb + 97pb, referentes ao paciente com genótipo AA (canaleta 5). Não foi possível a visualização da banda de 27pb. Entretanto, tal fato não impossibilitou a determinação segura dos genótipos, não deixando dúvidas quanto à efetividade de corte da enzima de restrição.

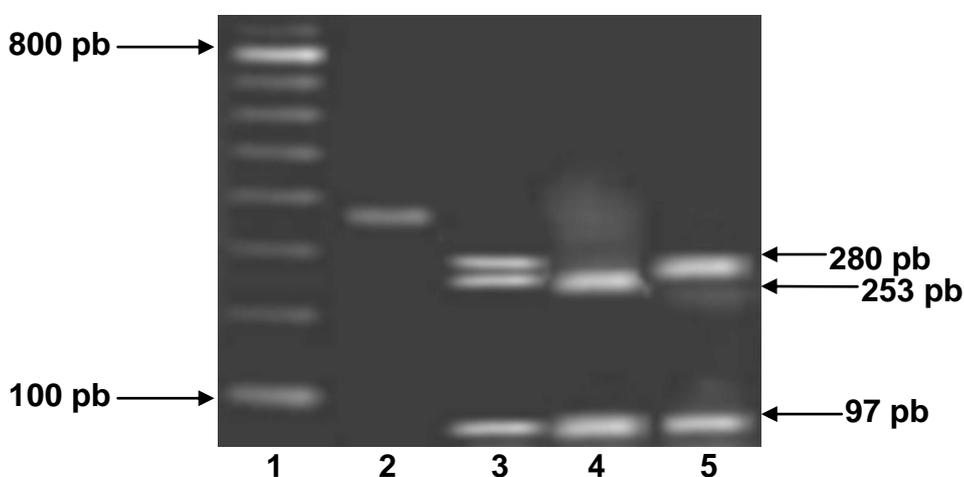


Figura 6 - Gel de agarose a 2% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -1082, no gene *IL10*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo GA), canaleta 4 (paciente com o genótipo GG) e canaleta 5 (paciente com o genótipo AA).

A figura 7 mostra um gel de poliacrilamida a 10%, referentes às digestões dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -308, no gene *TNFA*. Podemos observar a banda de 107pb referente ao paciente com genótipo AA (canaleta 3); as bandas de 107 pb + 87pb, referentes ao paciente com genótipo GA (canaleta 4); e a banda de 87pb, referente ao paciente com genótipo GG (canaleta 5). Não foi possível a visualização da banda de 20 pb. Entretanto, tal fato não impossibilitou a determinação segura dos genótipos, não deixando dúvidas quanto à efetividade de corte da enzima de restrição.

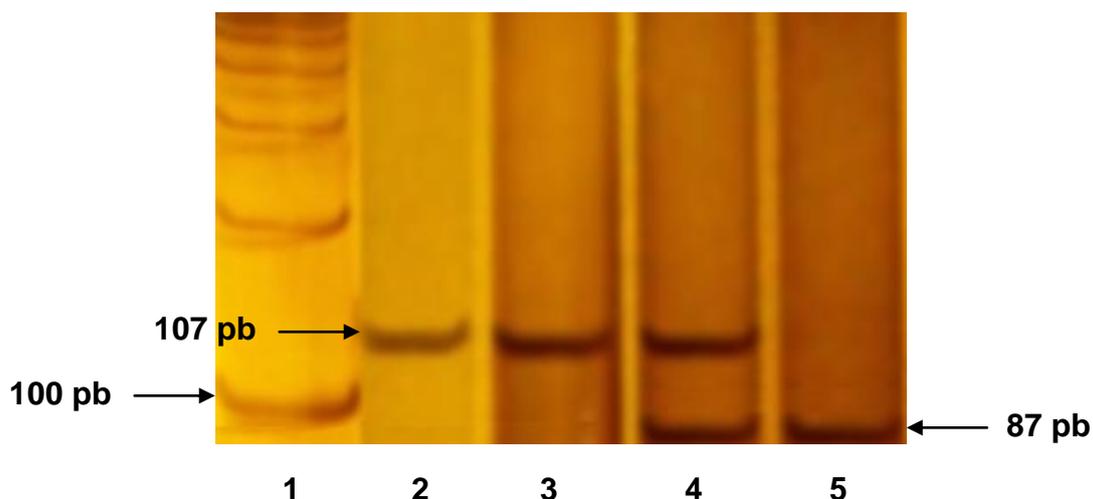


Figura 7 - Gel de poliacrilamida a 10% referente à digestão dos produtos de PCR para detecção do polimorfismo (G/A), *locus* -308, no gene *TNFA*. Canaleta 1 (padrão em 100pb), canaleta 2 (produto de PCR sem o tratamento com a enzima de restrição), canaleta 3 (paciente com o genótipo AA), canaleta 4 (paciente com o genótipo GA) e canaleta 5 (paciente com o genótipo GG).

### **5.3 – Distribuição dos polimorfismos estudados nos grupos experimental e controle**

#### **5.3.1 – Polimorfismo C/T (-260) *CD14***

Em relação ao polimorfismo C/T (-260), no gene *CD14*, foram realizadas as análises estatísticas, considerando-se o número total de pacientes, assim como após a sua estratificação em relação ao sexo e à idade.

Os resultados das freqüências dos genótipos e dos alelos referentes a esse polimorfismo, em ambos os grupos, estão listados na tabela 6.

Na tabela 6 observamos, em ambos os grupos, um maior percentual de pacientes expressando o genótipo CT. De um modo geral, observamos que a freqüência do alelo T polimórfico foi superior à do alelo C. As freqüências dos genótipos e dos alelos, em relação ao polimorfismo C/T (-260), no gene *CD14*, em ambos os grupos, não foram estatisticamente diferentes. Tais resultados continuaram sendo observados após a estratificação dos grupos em relação ao sexo e à idade dos pacientes. Em ambos os grupos, observamos as distribuições genóticas de acordo com as proporções esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Uma outra análise foi realizada, comparando-se os pacientes homocigotos CC (genótipo T<sup>-</sup>) com os pacientes de genótipos associados CT/TT (genótipo T<sup>+</sup>), de ambos os grupos (dados não mostrados). Os resultados não foram estatisticamente diferentes, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

Tabela 6 - Freqüências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo C/T (-260), no gene *CD14*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle).

	GENÓTIPOS			ALELOS	
	CC	CT	TT	C(%)	T(%)
<b>GRUPOS</b>					
Experimental (n=55)	13 (23,6%)	26 (47,3%)	16 (29,1%)	47,3%	52,7%
Controle (n=54)	11 (20,4%)	28 (51,8%)	15 (27,8%)	46,3%	53,7%
			p=0,87		p=0,99
<b>SEXO MASCULINO</b>					
Experimental (n=26)	7 (26,9%)	12 (46,2%)	7 (26,9%)	50%	50%
Controle (n=27)	4 (14,8%)	14 (51,8%)	9 (33,4%)	40,7%	59,3%
			p=0,54		p=0,44
<b>SEXO FEMININO</b>					
Experimental (n=29)	6 (20,7%)	14 (48,3%)	9 (31%)	44,8%	55,2%
Controle (n=27)	7 (25,9%)	14 (51,8%)	6 (22,2%)	51,8%	48,2%
			p=0,73		p=0,57
<b>IDADE ≤ 35 anos</b>					
Experimental (n=32)	7 (21,9%)	17 (53,1%)	8 (25%)	48,4%	51,6%
Controle (n=28)	4 (14,3%)	16 (57,1%)	8 (28,6%)	42,8%	57,2%
			p=0,74		p=0,66
<b>IDADE &gt; 35 anos</b>					
Experimental (n=23)	6 (26,1%)	9 (39,1%)	8 (34,8%)	45,7%	54,3%
Controle (n=26)	7 (26,9%)	12 (46,2%)	7 (26,9%)	50%	50%
			p=0,82		p=0,82

### 5.3.2 – Polimorfismo C/T (+3954) *IL1B*

Em relação ao polimorfismo C/T (+3954), no gene *IL1B*, foram realizadas as análises estatísticas, considerando-se o número total de pacientes, assim como após a sua estratificação em relação ao sexo e à idade.

Os resultados das freqüências dos genótipos e dos alelos referentes a esse polimorfismo, em ambos os grupos, estão listados na tabela 7.

Na tabela 7, observamos que, em ambos os grupos, houve um maior percentual de pacientes expressando o genótipo CC. Não encontramos nenhum paciente com o genótipo TT, no grupo experimental. Observamos também que a freqüência do alelo C foi maior que a do alelo T, em pacientes de ambos os grupos. As freqüências dos genótipos e dos alelos, em relação ao polimorfismo C/T (+3954), no gene *IL1B*, em ambos os grupos, não foram estatisticamente diferentes. Tais resultados continuaram sendo observados após a estratificação dos grupos em relação ao sexo e à idade dos pacientes. Apenas as distribuições genotípicas do grupo controle estiveram de acordo com as proporções esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Para esse gene, não fizemos a análise entre os genótipos associados CT/TT (genótipo T<sup>+</sup>) e CC (genótipo T<sup>-</sup>), uma vez que encontramos apenas um paciente com o genótipo TT.

Tabela 7 - Freqüências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo C/T (+3954), no gene *IL1B*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle).

	GENÓTIPOS			ALELOS	
	CC	CT	TT	C(%)	T(%)
<b>GRUPOS</b>					
Experimental (n=57)	30 (52,6%)	27 (47,4%)	0 (0%)	76,3%	23,7%
Controle (n=54)	33 (61,1%)	20 (37%)	1 (1,9%)	79,6%	20,4%
			p=0,34		p=0,66
<b>SEXO MASCULINO</b>					
Experimental (n=27)	13 (51,9%)	14 (48,1%)	0 (0%)	74,1%	25,9%
Controle (n=27)	15 (55,6%)	11 (40,7%)	1 (3,7%)	75,9%	24,1%
			p=0,47		p=1
<b>SEXO FEMININO</b>					
Experimental (n=30)	17 (56,7%)	13 (43,3%)	0 (0%)	78,3%	21,7%
Controle (n=27)	18 (66,7%)	9 (33,3%)	0 (0%)	83,3%	16,7%
			p=0,61		p=0,66
<b>IDADE ≤ 35 anos</b>					
Experimental (n=34)	18 (52,9%)	16 (47,1%)	0 (0%)	76,5%	23,5%
Controle (n=28)	16 (57,1%)	11 (39,3%)	1 (3,6%)	76,8%	23,2%
			p=0,47		p=0,86
<b>IDADE &gt; 35 anos</b>					
Experimental (n=23)	12 (52,2%)	11 (47,8%)	0 (0%)	76,1%	23,9%
Controle (n=26)	17 (65,4%)	9 (34,6%)	0 (0%)	82,7%	17,3%
			p=0,51		p=0,57

### 5.3.3 – Polimorfismo G/C (-174) *IL6*

Em relação ao polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*, foram realizadas as análises estatísticas, considerando-se o número total de pacientes, assim como após a sua estratificação em relação ao sexo e à idade.

Os resultados das frequências dos genótipos e dos alelos referentes a esse polimorfismo, em ambos os grupos, estão listados na tabela 8.

Na tabela 8, observamos que não houve diferença com relação à frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*, entre os grupos experimental e controle. Entretanto, após a estratificação dos grupos em relação ao sexo e à idade dos pacientes, observamos maior frequência do genótipo GG e do alelo G, nas pacientes do sexo feminino e nos pacientes com idade  $\leq 35$  anos, no grupo experimental comparado ao grupo controle.

Tais resultados nos mostram uma possível relação entre o genótipo GG e o alelo G e a manifestação de abscesso periapical agudo, assim como uma relação entre os genótipos GC e CC e o alelo C e riscos reduzidos de exacerbação aguda, em mulheres e em pacientes com idade até 35 anos, para o polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*. Em ambos os grupos, observamos as distribuições genotípicas de acordo com as proporções esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Outra análise foi realizada, comparando-se os pacientes portadores dos genótipos associados GG/GC (genótipo  $G^+$ ), com pacientes de genótipo homocigoto CC (genótipo  $G^-$ ), de ambos os grupos (dados não mostrados). Os resultados não foram estatisticamente diferentes, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

Tabela 8 - Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle).

	GENÓTIPOS			ALELOS	
	GG	GC	CC	G(%)	C(%)
<b>GRUPOS</b>					
Experimental (n=48)	30 (62,5%)	15 (31,3%)	3 (6,3%)	78,1%	21,9%
Controle (n=53)	24 (45,3%)	25 (47,2%)	4 (7,6%)	68,9%	31,1%
			p=0,21		p=0,18
<b>SEXO MASCULINO</b>					
Experimental (n=23)	10 (43,5%)	10 (43,5%)	3 (13%)	65,2%	34,8%
Controle (n=27)	15 (55,6%)	10 (37%)	2 (7,4%)	74,1%	25,9%
			p=0,64		p=0,45
<b>SEXO FEMININO</b>					
Experimental (n=25)	20 (80%)	5 (20%)	0 (0%)	90%	10%
Controle (n=26)	9 (34,6%)	15 (57,7%)	2 (7,7%)	63,5%	36,5%
			<b>*p=0,003</b>		<b>*p=0,003</b>
<b>IDADE ≤ 35 anos</b>					
Experimental (n=28)	20 (71,4%)	7 (25%)	1 (3,6%)	83,9%	16,1%
Controle (n=28)	11 (39,3%)	15 (53,6%)	2 (7,1%)	66,1%	33,9%
			<b>*p=0,05</b>		<b>*p=0,04</b>
<b>IDADE &gt; 35 anos</b>					
Experimental (n=20)	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)	70%	30%
Controle (n=25)	13 (52%)	10 (40%)	2 (8%)	72%	28%
			p=0,97		p=0,98

\*estatisticamente significante, considerando  $p \leq 0,05$ .

#### **5.3.4 – Polimorfismo G/A (-1082) *IL10***

Em relação ao polimorfismo G/A (-1082), no gene *IL10*, foram realizadas as análises estatísticas, considerando-se o número total de pacientes, assim como após a sua estratificação em relação ao sexo e à idade.

Os resultados das freqüências dos genótipos e dos alelos referentes a esse polimorfismo, em ambos os grupos, estão listados na tabela 9.

Na tabela 9, observamos maior freqüência do genótipo AA e do alelo A, tanto no grupo experimental quanto no grupo controle. As freqüências dos genótipos e dos alelos do polimorfismo G/A (-1082), no gene *IL10*, no grupo experimental, não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, mesmo após a estratificação por sexo e idade dos pacientes. Em ambos os grupos, observamos as distribuições genóticas de acordo com as proporções esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Uma outra análise foi realizada, comparando-se os pacientes homozigotos GG (genótipo A<sup>-</sup>) com os pacientes de genótipos associados GA/AA (genótipo A<sup>+</sup>), de ambos os grupos (dados não mostrados). Os resultados também não foram estatisticamente diferentes, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

Tabela 9 - Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/A (-1082), no gene *IL10*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle).

	GENÓTIPOS			ALELOS	
	GG	GA	AA	G(%)	A(%)
<b>GRUPOS</b>					
Experimental (n=54)	5 (9,3%)	20 (37%)	29 (53,7%)	27,8%	72,2%
Controle (n=54)	5 (9,3%)	21 (38,9%)	28 (51,8%)	28,7%	71,3%
			p=0,97		p=1
<b>SEXO MASCULINO</b>					
Experimental (n=26)	2 (7,7%)	11 (42,3%)	13 (50%)	28,8%	71,2%
Controle (n=27)	3 (11,1%)	9 (33,3%)	15 (55,6%)	27,8%	72,2%
			p=0,76		p=0,92
<b>SEXO FEMININO</b>					
Experimental (n=28)	3 (10,7%)	9 (32,1%)	16 (57,2%)	26,8%	73,2%
Controle (n=27)	2 (7,4%)	12 (44,4%)	13 (48,2%)	29,6%	70,4%
			p=0,63		p=0,90
<b>IDADE ≤ 35 anos</b>					
Experimental (n=33)	3 (9,1%)	11 (33,3%)	19 (57,6%)	25,8%	74,2%
Controle (n=28)	3 (10,7%)	9 (32,1%)	16 (57,2%)	26,8%	73,2%
			p=0,97		p=0,93
<b>IDADE &gt; 35 anos</b>					
Experimental (n=21)	2 (9,5%)	9 (42,9%)	10 (47,6%)	31%	69%
Controle (n=26)	2 (7,7%)	12 (46,15%)	12 (46,15%)	30,8%	69,2%
			p=0,96		p=0,83

### 5.3.5 – Polimorfismo G/A (-308) *TNFA*

Em relação ao polimorfismo G/A (-308), no gene *TNFA*, foram realizadas as análises estatísticas, considerando-se o número total de pacientes, assim como após a sua estratificação em relação ao sexo e à idade.

Os resultados das freqüências dos genótipos e dos alelos referentes a esse polimorfismo, em ambos os grupos, estão listados na tabela 10.

Na tabela 10 observamos, em ambos os grupos, maior freqüência do genótipo GG e do alelo G. Não foram encontrados pacientes expressando o genótipo AA, no grupo experimental. As freqüências dos genótipos e dos alelos do polimorfismo G/A (-308), no gene *TNFA*, no grupo experimental, não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, mesmo após a estratificação por sexo e idade dos pacientes. Em ambos os grupos, observamos as distribuições genotípicas de acordo com as proporções esperadas pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Uma outra análise foi realizada, comparando-se os pacientes homozigotos GG (genótipo A<sup>-</sup>) com os pacientes de genótipos GA/AA associados (genótipo A<sup>+</sup>), de ambos os grupos (dados não mostrados). Os resultados também não foram estatisticamente diferentes, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

Tabela 10 - Frequências dos genótipos e dos alelos referentes ao polimorfismo G/A (-308), no gene *TNFA*, em pacientes com abscesso periapical agudo (grupo experimental) e pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica (grupo controle).

	GENÓTIPOS			ALELOS	
	GG	GA	AA	G(%)	A(%)
<b>GRUPOS</b>					
Experimental (n=45)	29 (64,4%)	16 (35,6%)	0 (0%)	82,2%	17,8%
Controle (n=53)	40 (75,5 %)	12 (22,6%)	1 (1,9%)	86,8%	13,2%
			p=0,26		p=0,49
<b>SEXO MASCULINO</b>					
Experimental (n=21)	12 (57,1%)	9 (42,9%)	0 (0%)	78,6%	21,4%
Controle (n=27)	21 (77,8%)	5 (18,5%)	1 (3,7%)	87%	13%
			p=0,14		p=0,40
<b>SEXO FEMININO</b>					
Experimental (n=24)	17 (70,8%)	7 (29,2%)	0 (0%)	85,4%	14,6%
Controle (n=26)	19 (73,1%)	7 (26,9%)	0 (0%)	86,5%	13,5%
			p=0,88		p=0,89
<b>IDADE ≤ 35 anos</b>					
Experimental (n=26)	17 (65,4%)	9 (34,6%)	0 (0%)	82,7%	17,3%
Controle (n=28)	24 (85,7%)	4 (14,3%)	0 (0%)	92,9%	7,1%
			p=0,15		p=0,18
<b>IDADE &gt; 35 anos</b>					
Experimental (n=19)	12 (63,2%)	7 (36,8%)	0 (0%)	81,6%	18,4%
Controle (n=25)	16 (64%)	8 (32%)	1 (4%)	80%	20%
			p=0,65		p=0,93

#### **5.4 – Resultados obtidos da distribuição dos genótipos estudados, utilizando-se a Análise Multivariada em Componentes Principais.**

A Análise Multivariada em Componentes Principais foi originalmente descrita por Person, em 1901, e desenvolvida por Hotelling, em 1933. Esta análise permite que um certo número de variáveis seja analisado concomitantemente. Isto torna possível verificar as relações existentes entre elas por meio de uma abordagem descritiva onde, através de um modelo gráfico, podemos observar o comportamento de cada variável em relação às demais.

A inércia define a regularidade ou constância do sistema proposto, ou seja, um valor alto de inércia mostra que a associação encontrada é constante e regular. A resolução algébrica alcança inércia total (100%) se considerarmos todos os eixos possíveis; havendo  $n$  variáveis haverá um espaço de  $n$  dimensões com até  $n$  eixos principais, cada um deles correspondendo a uma componente principal. Entretanto, só podemos localizar a associação entre as variáveis em terceira dimensão, daí considerarmos apenas os três eixos iniciais. Normalmente a análise é feita com as três primeiras componentes principais: a primeira contendo um maior valor de inércia e as demais definidas seqüencialmente no sentido decrescente. Juntas, devem somar mais de 70% da inércia, segundo critério citado por Sampaio (1993).

O resultado da análise pode ser observado através de um gráfico de três dimensões, correspondentes às três primeiras componentes principais.

Pela distância euclidiana (distância entre dois pontos) e a posição nos quadrantes do gráfico podemos visualizar as relações entre as variáveis. Variáveis situadas em um mesmo quadrante e próximas entre si são fortemente associadas; variáveis situadas em quadrantes opostos são inversamente associadas. Variáveis distantes uma da outra situadas no mesmo lado, porém em quadrantes diferentes, apresentam associação fraca (Sampaio, 1993).

Em nosso trabalho, a fim de realizarmos a Análise Multivariada em Componentes Principais, primeiramente atribuímos valores às variáveis. Se o paciente pertencesse ao grupo controle (grupo de pacientes com lesão

periapical inflamatória crônica, sem história prévia de agudização), recebia o valor 0 e se pertencesse ao grupo experimental (grupo de pacientes com abscesso periapical agudo), recebia o valor 1. Logo, a variável *GRUPOS* engloba os dois grupos de pacientes e assume valores de 0 a 1. Em relação à taxa de transcrição de cada proteína (CD14, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) e os genótipos envolvidos em cada situação, o paciente com genótipo relacionado à baixa taxa de transcrição recebia valor 1; o paciente com genótipo relacionado à taxa de transcrição intermediária recebia valor 2 e o paciente com genótipo relacionado à alta taxa de transcrição recebia valor 3. (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores atribuídos às respostas, segundo à variável considerada, e aos respectivos genótipos relacionados às taxas de transcrição de cada proteína.

<i>GRUPOS</i>	<i>GENES</i>				
	<i>CD14</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL10</i>	<i>TNFA</i>
Pacientes com abscesso periapical agudo=1					
Pacientes com lesão periapical crônica, sem história prévia de agudização=0	*CC=1 CT=2 TT=3	*CC=1 CT=2 TT=3	*CC=1 GC=2 GG=3	*AA=1 GA=2 GG=3	*GG=1 GA=2 AA=3

\* Genótipos relacionados à taxa de transcrição de cada proteína.

Cada variável apresenta um coeficiente de correlação com cada um dos eixos estudados (Tabela 12). Essas correlações correspondem às coordenadas das mesmas em cada eixo, permitindo então localizá-las em um sistema tri-dimensional. Esta representação gráfica é mostrada na figura 10, onde a posição das variáveis na primeira componente principal (F1) está demonstrada juntamente com os pontos (o símbolo  $\uparrow$  significa valores positivos e o símbolo  $\downarrow$  significa valores abaixo de zero). A leitura e interpretação do gráfico são feitas pela localização das variáveis no mesmo, verificando suas posições relativas nos quadrantes e as distâncias euclidianas entre as mesmas.

Tabela 12 – Coeficientes de correlação das variáveis estudadas (*GRUPOS*, *CD14*, *IL1B*, *IL6*, *IL10* e *TNFA*) com as três primeiras componentes principais (F1, F2 e F3) e inércias acumuladas.

VARIÁVEIS	COMPONENTES PRINCIPAIS		
	F1	F2	F3
<i>GRUPOS</i>	0,72	0,16	0,01
<i>CD14</i>	-0,004	0,72	-0,32
<i>IL1B</i>	0,09	0,60	0,61
<i>IL6</i>	0,68	-0,09	0,18
<i>IL10</i>	0,02	-0,33	0,62
<i>TNFA</i>	0,48	-0,20	-0,41
*Inércia Acumulada %	20	38	56

\* Nós obtivemos uma inércia total de 56% para a Análise Multivariada em Componentes Principais que, apesar de estar abaixo do proposto por Sampaio (1993), pode ser usada para considerar a proposta de associação entre os dois grupos de pacientes e as demais variáveis.

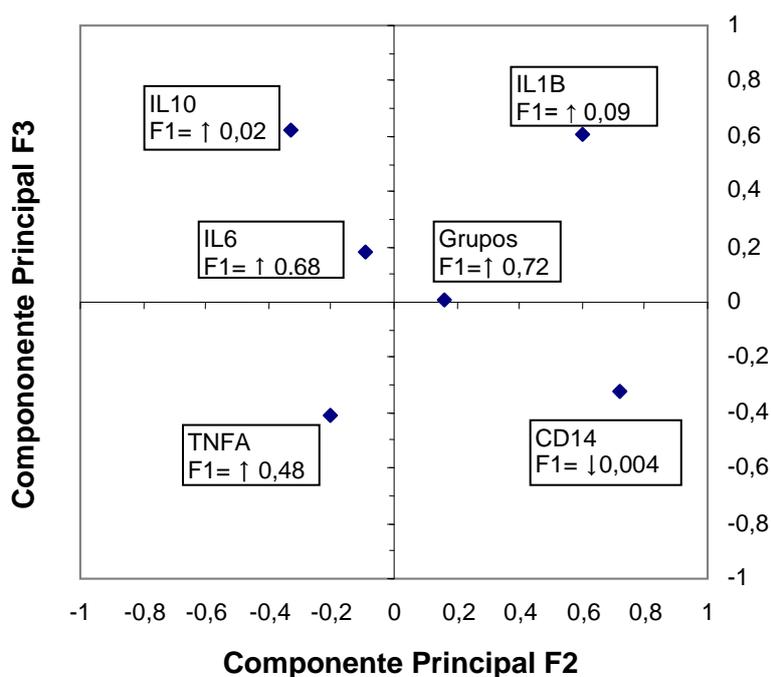


Figura 8 - Posição das variáveis segundo os eixos 2 e 3 e suas respectivas coordenadas no eixo 1. Setas: (↑ se positiva e ↓ se negativa).

Através da interpretação gráfica da figura podemos observar:

1) A existência de uma forte correlação positiva entre as variáveis *GRUPOS* e *IL6*, pois estão situadas do mesmo lado do eixo F2 e com uma pequena distância entre elas. Tal fato sugere um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo (valor=1) apresentando valores altos de *IL6* (genótipo GG, valor=3).

2) Uma correlação também positiva, porém em menor intensidade, entre as variáveis *GRUPOS* e *IL1B*. Essas variáveis estão localizadas no mesmo quadrante, porém com uma maior distância entre elas. Isso sugere que pode haver um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo (valor=1) apresentando valores intermediários (genótipo CT, valor=2) e altos de *IL1B* (genótipo TT, valor=3).

3) A existência de uma correlação inversa entre as variáveis *GRUPOS* e *TNFA*, pois além de estarem situadas em lados diferentes, considerando-se os eixos F2 e F3, estão em quadrantes opostos. Portanto, existe um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo (valor=1) apresentando valores baixos de *TNFA* (genótipo GG, valor=1), ao passo que existe um predomínio de pacientes com lesão periapical crônica, sem história prévia de agudização (valor=0), apresentando valores altos de *TNFA* (genótipo AA, valor=3).

4) Uma associação inversa ainda mais notável entre a variável *CD14* e ambas as variáveis *IL10* e *IL6*, pelos mesmos motivos citados no item anterior em relação às posições das mesmas na figura 8. Tal fato sugere que pacientes com genótipos relacionados à alta taxa de transcrição da proteína CD14, apresentaram genótipos relacionados à baixa taxa de transcrição das proteínas IL-6 e IL-10, e vice versa.

5) As variáveis *IL6* e *IL10* apresentam correlação positiva, porém baixa, pelo fato de se localizarem no mesmo quadrante, porém com uma maior distância entre elas. Da mesma forma, as variáveis *IL6* e *IL1B*; *IL10* e *IL1B*; e *TNFA* e *CD14* apresentam correlação positiva, porém baixa, pelo fato de se localizarem do mesmo lado do eixo F2, mas em quadrantes diferentes e com uma maior distância entre elas. Estes dados mostram, portanto, associação fraca entre essas variáveis.

## 6 – DISCUSSÃO

A etiologia bacteriana para a formação das lesões periapicais inflamatórias foi bem estabelecida por Kakehashi *et al.* (1965), usando um modelo experimental em ratos. Esses autores observaram que polpas dentárias de animais *germ-free* expostas ao meio bucal apresentaram formação de largas pontes de dentina, indicando assim um potencial para regeneração de tecido duro na ausência de infecção. Por outro lado, os animais selvagens desenvolveram necrose pulpar e formação de lesão periapical radiograficamente visível.

Takahashi *et al.* (1996) sugerem, em seu conceito de “infecção multibacteriana inespecífica”, que a caracterização bacteriana dos canais radiculares infectados pode não ser útil para se fazer um diagnóstico do risco de formação e exacerbação das lesões periapicais inflamatórias. Os mesmos autores, em 1998, comentam que a variabilidade das formas clínicas dessas lesões é determinada por diferenças na virulência dos patógenos infectantes e na efetividade da resposta do hospedeiro contra eles.

Recentemente, estudos têm mostrado evidências substanciais que sugerem o envolvimento de polimorfismos funcionais em genes de citocinas e receptores celulares na patogênese de várias desordens inflamatórias, determinando variações interindividuais na resposta inflamatória do hospedeiro.

Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre a possível influência de tais polimorfismos na formação de abscesso periapical agudo. A inexistência de trabalhos cria uma lacuna no conhecimento sobre a resposta do hospedeiro envolvida na patogênese dessas lesões.

Baseado nessa abordagem, este trabalho buscou investigar algumas possíveis variáveis genéticas que pudessem interferir na patogênese das lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica, em grupos de pacientes brasileiros. O recente trabalho de Parra *et al.* (2003) não recomenda

agrupar os indivíduos brasileiros em grupos étnicos baseados em cor, raça, e origem geográfica. Este estudo mostrou que indivíduos brasileiros classificados como “brancos” ou “negros” têm sobreposição de genótipos, provavelmente devido à miscigenação. Todos os pacientes envolvidos em nosso estudo são provenientes de Minas Gerais e são tão representativos da população brasileira quanto possível.

A ocorrência de polimorfismos funcionais foi avaliada, neste trabalho, em genes que codificam citocinas e um receptor celular; mediadores esses importantes na patogênese das lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica e resultados relevantes foram encontrados.

É importante ressaltar as diferenças encontradas para mesmos polimorfismos em populações geográfica e etnicamente distintas, fato esse explicado pelo *background* genético diferenciado entre elas.

Em relação à ocorrência do polimorfismo funcional (C/T), *locus* -260, no gene *CD14*, na população estudada, verificamos que a distribuição genotípica encontrada foi semelhante à de outras populações. No presente trabalho, observamos uma frequência do genótipo TT de 27,8% para indivíduos do grupo controle, enquanto que para o mesmo genótipo foram relatadas frequências de 30,8% no Brasil (Moreira, 2003: dissertação de mestrado), 19,3% na República Tcheca (Holla *et al.*, 2002), 22,5% na Alemanha (Koenig *et al.*, 2002) e 23% no Japão (Shimada *et al.*, 2000). Observamos também em nosso trabalho, que a incidência da variante polimórfica foi similar à da não polimórfica, dado semelhante ao encontrado nas populações já citadas acima. Em relação à ocorrência do polimorfismo funcional (C/T), *locus* +3954, no gene *IL1B*, na população estudada, verificamos que as distribuições genotípica e alélica encontradas foram parecidas com as de outras populações. Podemos observar, em trabalhos comparados ao nosso (Walker *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2005; Guimarães *et al.* no prelo), com exceção do estudo de Parkhill *et al.* (2000), que encontraram o predomínio do genótipo CT, o predomínio do genótipo CC, nas populações estudadas. Já em relação à frequência alélica, o nosso trabalho se encontra de acordo com todos os trabalhos citados acima,

no que diz respeito ao predomínio do alelo C sobre o alelo T. Em relação à ocorrência do polimorfismo funcional (G/C), *locus* -174, no gene *IL6*, na população estudada, observamos que a frequência do alelo C, no grupo controle, foi de 31,1%. A literatura nos mostra frequências desse mesmo alelo de 28,6% em Brasileiros (Moreira *et al.*, 2005), 33-55% em Caucasianos, 9% em Afro-Americanos, 5% em Afro-Caribenhos e menos de 1% em Asiáticos Orientais (Lim *et al.*, 2002). Em relação à ocorrência do polimorfismo funcional (G/A), *locus* -1082, no gene *IL10*, foram encontradas diferenças na frequência da variante polimórfica em diferentes populações. Em nossos grupos de estudo, observamos uma frequência do alelo A de 72,2% para indivíduos do grupo experimental e de 71,3% para indivíduos do grupo controle. Observamos na literatura, variação de 70 a 60% para esse alelo em indivíduos com e sem doença periodontal, em estudos na população brasileira (Scarel-Caminaga *et al.*, 2004; Moreira, 2005: dados não publicados) e em Caucasianos (Berglundh *et al.*, 2003). Entretanto, em Japoneses, a frequência observada foi de 100% (Yamazaki *et al.*, 2001). Na análise da frequência de indivíduos homocigotos para o alelo A, foi observado, em nosso estudo, frequência de 53,7% para indivíduos do grupo experimental e de 51,9% para indivíduos do grupo controle. Observamos na literatura, uma variação de 47 a 37% desse genótipo, em indivíduos Brasileiros com e sem doença periodontal (Moreira 2005: dados não publicados). Moraes *et al.* (2003) encontraram o mesmo genótipo em 27,7% dos Holandeses e Wang (2001) em 33,8% dos Finlandeses avaliados. Em relação à ocorrência do polimorfismo funcional (G/A), *locus* -308, no gene *TNFA*, diferenças na frequência da variante polimórfica A entre Caucasianos e outras populações étnicas têm sido aparentes (Loos *et al.*, 2005). Em nosso estudo, observamos uma frequência do alelo A de 13,2% para indivíduos do grupo controle e de 17,8% para indivíduos do grupo experimental. Moreira (2005: dados não publicados) encontrou frequências variando de 17,6% a 16,3% para indivíduos Brasileiros com e sem doença periodontal. Já em Caucasianos a frequência desse alelo varia de 3 a 20% (Galbraith *et al.*, 1998; Craandijk *et al.*, 2002; Fassmann *et al.*, 2003) e em Japoneses de 2 a 3% (Endo *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003).

Em relação aos polimorfismos funcionais nos genes *CD14* (C/T, *locus* -260), *IL1B* (C/T, *locus* +3954), *IL10* (G/A, *locus* -1082) e *TNFA* (G/A, *locus* -308) investigados neste trabalho, avaliamos as frequências dos genótipos e alelos existentes nos grupos de pacientes estudados. Através do teste de Qui-quadrado, não observamos resultados estatisticamente significantes que determinassem a prevalência de um determinado genótipo ou alelo em um determinado grupo, fato esse que continuou sendo observado mesmo quando os grupos foram estratificados de acordo com o sexo e a idade dos pacientes. Esses dados não puderam ser comparados aos de outras populações, uma vez que não existem trabalhos em lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica fazendo esta avaliação.

Tais resultados obtidos por tal análise univariada nos mostraram ausência de relação entre os polimorfismos citados acima e susceptibilidade à formação de abscesso periapical agudo, em uma amostra da população brasileira. Mesmo sabendo que estamos frente a uma desordem inflamatória de caráter multifatorial, tínhamos a expectativa de encontrar, nos pacientes com abscesso periapical agudo, frequências elevadas tanto das variantes polimórficas associadas à alta produção de CD14, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (mediadores pró-inflamatórios), quanto da variante polimórfica associada à baixa produção de IL-10 (citocina imunoreguladora). No entanto, sabemos que a análise univariada limita a interpretação dos dados, uma vez que não permite a avaliação da ocorrência conjunta de polimorfismos.

É discutido na literatura que as variantes genéticas, por si só, não causam a doença; mas é possível que combinações específicas de polimorfismos funcionais, no mesmo gene, em genes diferentes no mesmo cromossomo, e também em cromossomos distintos, possam significativamente alterar o risco individual ao desenvolvimento de certo fenótipo de uma doença (Walker *et al.*, 2000). Estudos na doença periodontal têm avaliado de forma conjunta a ocorrência de alguns polimorfismos. Kornman *et al.* (1997) estabeleceram uma associação de um genótipo positivo com a gravidade da periodontite crônica, que consiste da ocorrência de pelo menos um alelo

polimórfico nos genes da IL-1 $\beta$  (*locus* +3954) e da IL-1 $\alpha$  (*locus* -889). Turner *et al.* (1997), Berglundh *et al.* (2003) e Scarel-Caminaga *et al.* (2004) mostraram associações de haplótipos específicos referentes aos polimorfismos -819, -592 e -1082, no gene *IL10*, com síntese alterada de IL-10 em resposta a estímulos inflamatórios. Quando os autores avaliavam esses polimorfismos de forma separada, não eram constatadas associações tão evidentes com a gravidade da doença, ao passo que quando era feita a avaliação da ocorrência conjunta (desequilíbrio de ligação), a associação era fortemente estabelecida.

Dessa forma, é importante ressaltar que a análise da ocorrência conjunta dos polimorfismos avaliados no presente estudo, assim como de haplótipos ainda não avaliados, faz-se necessária e pode estabelecer importantes associações no que diz respeito à formação do abscesso periapical agudo.

Em relação ao polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*, investigado neste trabalho, também avaliamos as frequências dos genótipos e alelos existentes nos grupos de pacientes estudados. Encontramos um maior percentual de pacientes do sexo feminino e pacientes com idade  $\leq 35$  anos, do grupo experimental, expressando o genótipo GG e o alelo G. Tais dados nos mostraram uma importante associação entre tal genótipo e alelo e a manifestação de abscesso periapical agudo, assim como relação entre os genótipos GC e CC e alelo C e riscos reduzidos de exacerbação aguda, em mulheres e pacientes com idade  $\leq 35$  anos. É importante lembrar que o alelo G está associado a altos níveis de produção de IL-6, quando comparado com o alelo C (Fishman *et al.*, 1998) e, sendo a IL-6 uma importante citocina de ambas as respostas imunes inata e adaptativa (Feyen *et al.*, 1989; Lowik *et al.*, 1989; Ishimi *et al.*, 1990; Kurihara *et al.*, 1990), o aumento de sua produção pode acarretar em: grande destruição óssea osteoclástica; estímulo da síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação (Crowl *et al.*, 1991); ativação, proliferação e diferenciação de LT e LB (Schindler *et al.*, 1990); características estas importantes no quadro clínico do abscesso periapical agudo. Esses dados

não puderam ser comparados aos de outras populações, uma vez que não existem trabalhos em lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica fazendo esta avaliação.

Ainda em relação ao polimorfismo G/C (-174), no gene *IL6*, a análise Multivariada em Componentes Principais nos mostrou a existência de uma forte correlação positiva entre as variáveis *IL6* e *GRUPOS*, o que sugeriu haver um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando genótipo relacionado à alta taxa de transcrição da proteína IL-6. Mesmo sabendo-se que a análise multivariada, utilizada no presente trabalho, nos fornece dados subjetivos, com os quais não podemos fazer inferências acerca da dinâmica funcional do processo inflamatório em questão, podemos sugerir uma associação entre o genótipo GG, no gene *IL6*, e susceptibilidade à manifestação de abscesso periapical agudo, em uma amostra da população brasileira. Também pode-se especular sobre uma possível associação de outros importantes genes ligados à resposta inflamatória, que estejam em desequilíbrio de ligação com o gene *IL6*, e susceptibilidade à manifestação de abscesso periapical agudo.

Em relação ao polimorfismo C/T (+3954), no gene *IL1B*, investigado neste trabalho, a Análise Multivariada em Componentes Principais nos mostrou uma correlação positiva, porém em menor intensidade, entre as variáveis *IL1B* e *GRUPOS*. Tal resultado sugeriu haver um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando tanto o genótipo CT quanto o genótipo TT, o que se relacionaria à susceptibilidade à manifestação de abscesso periapical agudo. A variante polimórfica T desse polimorfismo apresenta como alteração funcional um aumento na produção de IL-1 $\beta$ , onde o genótipo CT é responsável por um aumento em duas vezes e o genótipo TT responsável por um aumento em quatro vezes na atividade transcricional dessa proteína (Pociot *et al.*, 1992). É possível que, em se aumentando o número de pacientes, esses dados sejam confirmados na análise univariada.

Em relação ao polimorfismo G/A (-308), no gene *TNFA*, investigado neste trabalho, a análise Multivariada em Componentes Principais nos mostrou

a existência de uma correlação inversa entre as variáveis *TNFA* e *GRUPOS*, sugerindo haver um predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando genótipo associado à baixa taxa de transcrição da proteína TNF- $\alpha$ , e um predomínio de pacientes com lesão periapical inflamatória crônica, sem história de agudização, expressando genótipo associado à alta taxa de transcrição da mesma proteína. Através desse resultado, podemos especular sobre a susceptibilidade de pacientes portadores do genótipo AA a apresentarem um fenótipo protetor da doença. Tais dados sugerem também que, ao mesmo tempo que o TNF- $\alpha$  pode não ser relevante para a patogênese do abscesso periapical agudo, ele pode ter um papel importante durante a inflamação crônica tecidual, ou ainda estar em desequilíbrio de ligação com algum gene envolvido em mecanismos imunomodulatórios que pudessem explicar a evolução limitada do processo inflamatório existente nas lesões periapicais inflamatórias crônicas.

A Análise Multivariada em Componentes Principais nos mostrou associação inversa em relação à variável *CD14* e as variáveis *IL6* e *IL10*. Tal fato sugere que pacientes expressando genótipos relacionados à alta taxa de transcrição da proteína *CD14* expressaram genótipos relacionados à baixa taxa de transcrição das proteínas *IL-6* e *IL-10*, e vice versa. Estudos envolvendo a investigação de desequilíbrio de ligação, entre esses genes, poderão confirmar tais achados.

Dentre os polimorfismos funcionais estudados neste trabalho, encontramos na literatura, relação de desequilíbrio de ligação apenas entre os polimorfismos C/T (-260), no gene *CD14*, e G/A (-308), no gene *TNFA* (Heesen *et al.*, 2002). Em nosso trabalho, tal fato não se mostrou relevante, visto que encontramos apenas uma associação bastante fraca entre as variáveis *CD14* e *TNFA*. Dessa forma, é importante ressaltar que a análise de relação de desequilíbrio de ligação entre polimorfismos pode estabelecer alguma nova associação com o risco de desenvolvimento de certas desordens inflamatórias, dados estes não analisados por nós em nosso trabalho.

É importante ressaltar que através da análise multivariada conseguimos analisar, simultaneamente, os dois grupos de pacientes com todos os marcadores genéticos, o que seria impossível utilizando o método de Qui-quadrado, que somente realiza uma análise de comparação entre dois grupos onde a resposta de interesse é dicotômica.

Por fim, através do presente trabalho descrevemos, pela primeira vez, fatores genéticos que podem identificar grupos de risco e que influenciam a exacerbação aguda das lesões periapicais inflamatórias de origem endodôntica.

## 7 – CONCLUSÕES

- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os polimorfismos funcionais nos genes *CD14* (C/T, *locus* -260), *IL1B* (C/T, *locus* +3954), *IL10* (G/A, *locus* -1082) e *TNFA* (G/A, *locus* -308), em pacientes com abscesso periapical agudo e lesões periapicais inflamatórias crônicas de origem endodôntica, sem história prévia de agudização, mesmo quando estes foram estratificados de acordo com o sexo e a idade.
- Foram encontradas associações entre o genótipo GG e o alelo G do polimorfismo funcional no gene *IL6* (G/C, *locus* -174), nas mulheres e nos pacientes com idade  $\leq 35$  anos e manifestação de abscesso periapical agudo.
- A Análise Multivariada em Componentes Principais sugeriu:
  - predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando genótipo relacionado à alta taxa de transcrição da proteína IL-6;
  - predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando genótipos relacionados às taxas intermediária e alta de transcrição da proteína IL-1 $\beta$ ;
  - predomínio de pacientes com abscesso periapical agudo expressando genótipo relacionado à baixa taxa de transcrição da proteína TNF- $\alpha$ ;
  - predomínio de pacientes com lesão periapical inflamatória crônica de origem endodôntica expressando genótipo relacionado à alta taxa de transcrição da proteína TNF- $\alpha$ ;

- pacientes com genótipos relacionados à alta taxa de transcrição da proteína CD14 expressaram genótipos relacionados à baixa taxa de transcrição das proteínas IL-6 e IL-10, e vice-versa.
- Fatores genéticos parecem influenciar a evolução aguda dos processos inflamatórios de origem endodôntica.

## 8- SUMMARY

Persistent or severe injuries to the dental pulp usually cause irreversible damage and necrosis in this tissue, with subsequent formation of acute and chronic inflammatory periapical lesions. Although it is known that multiple immunological mechanisms are involved in formation and development of these lesions, the precise pathological mechanisms that lead to chronic and acute forms still remain unclear. Several reports have shown substantial evidence that suggests an association between genetic factors and the pathogenesis of many inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate the occurrence of the functional polymorphisms within five genes involved with the immune response, in individuals with acute periapical abscess. The functional gene polymorphisms analyzed were *CD14* (C/T, -260), *IL1B* (C/T, +3954), *IL6* (G/C, -174), *IL10* (G/A, -1082) and *TNFA* (G/A, -308). Genomic DNA was obtained from oral swabs from individuals with acute periapical abscess and chronic inflammatory periapical lesions, without previous exacerbation. Significant statistical differences were not observed in any of the evaluated polymorphisms between the individuals from both groups. However, significant association was observed between GG genotype and G allele of the polymorphism in the *locus* -174 (G/C) of the *IL6* gene, in women and in individuals  $\leq 35$  years old with presence of the acute periapical abscess. The test (Principal Components Analysis) suggested predominance of the acute periapical abscess in individuals displaying: high-producer IL-6 genotype; intermediate and high-producer IL-1 $\beta$  genotype and low-producer TNF- $\alpha$  genotype. The same test also suggested that individuals with high-producer CD14 genotype displayed low-producer IL-6 and IL-10 genotypes. The evaluation of the functional polymorphisms occurrence can be useful to identify susceptibility of the acute periapical abscess, establishing risk groups.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. *Cellular and Molecular Immunology*. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 553p.

AGGARWAL, B.B., VILCEK, J. and (eds). In "Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action" Marcel Dekker, New York, 1992.

AKIRA, S., TAGA, T., KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, v.54, p.1-78, 1993.

AMANO, S., KAWAKAMI, K., IWAHASHI, H., KITANO, S., HANAZAWA, S. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J.Cell.Physiol*, n.173, p.301-9, 1997.

ANTAAL-SZALMAS, P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur. J. Clin. Invest*, n.30, p.167-179, 2000.

ARAI, K., WATANABE, S., KOYANO, N., LEE H.J., MIYAJIMA, A., YSSEL, H., ARAI, N., YOKOTA, T. Cytokine network: control of allergic response and hemopoiesis by hemopoietic growth factors. *J Dermatol*, v.19, p.575-583, 1992.

ARTESE, L., PIATTELLI, A., QUARANTA, M., COLASANTE, A., MUSANI, P. Immunoreactivity for interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endodon*, v.17, p.483-487, 1991.

ATKINS, E. Pathogenesis of fever. *Physiol. Rev*, v.40, p.580-646, 1960.

BALDINI, M., LOHMAN I.C., HALONEN, M., ERICKSON R.P., HOLT P.G., MARTINEZ F.D. A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am. J.Respir.Cell.Mol.Biol*, v.20, p.976-983, 1999.

BALTO, K., SASAKI, H., STASHENKO, P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun*, v.69, p.744-750, 2001.

BARKHORDAR, R.A., HUSSAIN, M.Z., HAYASHI, C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.73, p.334-336, 1992.

BAUER, J., HERRMANN, F. Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann Hematol*, v.62, p.203-210, 1991.

BAUMANN, H., GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol Today*, v.15, p.74-80, 1994.

BAYLEY, J.P., DE ROOIJ, H., VAN DEN ELSEN, P.J., HUIZINGA, T.W.J., VERWEIJ, C.L. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF- $\alpha$  promoter. *Cytokine*, v.14, p.316-323, 2001.

BEESON, P.B. Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, v.27, p.524, 1948 (abstract).

BERGLUNDH, T., DONATI, M., HANH ZORIC, M., HANSON, L.A., PADYUKOV, L. Association of the -1087 IL10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*, v.30, p.249-254, 2003.

BERTOLINI, D.R., NEDWIN, G.E., BRINGMAN, T.S., SMITH, D.D., MUNDY, G.R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumor necrosis factors. *Nature*, v.319, p.516-518, 1986 (abstract).

BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification nucleic acids. *J.Clin.Microbiol*, v.28, p.495-503, 1990.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, v.32, p.314-331, 1980.

BURCHETT, S.K., WEAVER, W.M., WESTALL, J.A., LARSEN, A., KRONHEIM, S., WILSON, C.B. Regulation of tumor necrosis factor/cachetin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, v.140, p.3473-3481, 1988.

CASSATELA, M.A., MEDA, L., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BONORA, S. Interleukin-10 upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med*, v.179, p.1695-1699, 1994.

COHEN, S., BURNS, R.C. *Pathways of the pulp*. 7.ed. Saint Louis: Mosby Inc, 1998. 892p.

COX, A., CAMP, N.J., CANNINGS, C., DI GIOVINE, F.S., DALE, M., WORTHINGTON, J., JOHN, S., OLLIER, W.E., SILMAN, A.J., DUFF, G.W. Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum.Mol.Genet*, v.8, p.1707-1713, 1999 (abstract).

CRAANDIJK, J., VAN KRUGTEN, M.V., VERWEIJ, C.L., VAN DER VELDEN, U., LOOS, B.G. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.29, p.28-34, 2002.

CROWL, R.M., STOLLER, T.J., CONROY, R.R., STONER, C.R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem*, v.266, p.2647-2651, 1991.

DAISUKE, I., MURATA, M., TANAHASHI, N., SATO, H., SONODA, A., SAITO, I., WATANABE, K., FUKUUCHI, Y. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*, v.31, p.2661-2664, 2000.

D'ALFONSO, S., COLOMBO, G., DELLA BELLA, S., SCORZA, R., MOMIGLIANO-RICHIARDI, P. Association between polymorphisms in the TNF region and systemic lupus erythematosus in the Italian population. *Tissue Antigens*, v.47, p.551-555, 1996.

D'ANDREA, A., ASTE, A.M., VALIANTE, N.M., MA, X., KUBIN, M., TRINCHIERI, G. Interleukin-10 inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, v.178, p.1041-1048, 1993.

DE DEUS, Q.D. *Endodontia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 695p.

**DE SÁ, A.R.**, PIMENTA, F.J.G.S., DUTRA, W.O., GOMEZ, R.S. Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6 and lymphotoxin  $\alpha$  in dental granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.96, p.356-360, 2003.

DEL PRETE, G., DE CARLI, M., MASTROMAURO, C., BIAGIOTTI, R., MACCHIA, D., FALAGIANI, P., RICCI, M., ROMAGNANI, S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand *in vitro* human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest*, v.88, p.346-350, 1991.

DEL PRETE, G., DE CARLI, M., ALMERIGOGNA, F., GIUDIZI, M.G., BIAGIOTTI, R., ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, v.150, p.353-360, 1993.

DE WAAL MALEFYT, R., YSSEL, H., RONCAROLO, M.G., SPITS, H., DE VRIES, J.E. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol*, v.4, p.314-320, 1992.

DE WAAL MALEFYT, R., MOORE, K.M. *The cytokine handbook*, 3.ed. p.333-364, 1998.

DE WAAL MALEFYT, R. *IL-10*. rene@dnax.org, 2002.

DI GIOVINE, F.S., CORK, M.J., CRANE, A., MEE, J.B., DUFF, G.W. Novel genetic association of an IL-1B gene variation a + 3953 with IL-1 $\beta$  protein production and psoriasis. *Cytokine*, v.7, p.606-607, 1995 (abstract).

DI GIOVINE, F.S., CORK, M.J., CRANE, A., MEE, J.B., DUFF, G.W. Association between psoriasis, IL-1 beta gene polymorphism and IL-1 beta production. In manuscript form, submitted for publication, 1996.

DI GIOVINE, F.S., CAMP, N., COX, A., CHAUDHARY, A., SORRELL, J.A., CRANE, A., DUFF, G.W. Detection and population analysis of IL-1 and TNF gene polymorphisms. *Cytokine Molecular Biology- A practical approach* Fran Balkwill, p.21-46, 2000.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol*, v.44, p.153-205, 1989.

DINARELLO, C.A. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, v.179, p.294-304, 1999.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, v.118, p.503-508, 2000.

D'SOUZA R., BROWN, L.R., NEWLAND, J.R., LEVY, B.M., LACHMAN, L.B. Detection and characterization of IL-1 in human dental pulps. *Arch Oral Biol*, v.34, p.307-313, 1989.

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 alpha gene in japonese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, v.72, p.1554-1559, 2001.

ENDRES, S., CANNON, J.G., GHORBANI, R., DEMPSEY, R.A., SISSON, S.D., LONNEMANN, G., VANDER MEER, J.W., WOLFF, S.M., DINARELLO, C.A. *In vitro* production of IL-1 beta, IL-1 alpha, TNF and IL-2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independence gene regulation. *Eur J Immunol*, v.19, p.2327-2333, 1989.

ESKDALE, J., WORSWORTH, P., BOWMAN, S., FIELD, M., GALLAGHER, G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, v.49, p.635-639, 1997.

ESKDALE, J., McNICHOLL, J., WORSWORTH, P., JONAS, B., HUIZINGA, T., FIELD, M., GALLAGHER, G. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility (letter). *Lancet*, v.352, p.1282-1283, 1998.

FASSMAN, A., HOLLA, L.I., BUCKOVA, D., VASKU, A., ZNOJIL, V., VANEK, J. Polimorphisms in the +252 (A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G)

tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodont Res*, v.38, p.394-399, 2003.

FATTORI, E., CAPPELLETTI, M., COSTA, P., SELBITTO, C., CANTONI, L., CARELLI, M., FAGGIONI, R., FANTUZZI, G., GHEZZI, P., POLI, V. Defective inflammatory response in interleukin-6-deficient mice. *J Exp Med*, v.180, p.1243-1250, 1994.

FERRERO, E.; GOYERT, S.M. Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res*, v.16, p.4173, 1988.

FEYEN, J.H., ELFORD, P., DI PADOVA, F.E., TRECHSEL, U. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, v.4, p.633-638, 1989.

FIELD, M., GALLAGHER, G., ESKDALE, J. Tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms in rheumatoid arthritis (RA). *Tissue Antigens*, v.50, p.303-307, 1997.

FIGUEREDO, C., RIBEIRO, M., FISCHER, R., GUSTAFSSON, A. Increased interleukin-1 $\beta$  concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J.Periodontol*, v.70, p.1457-1463, 1999.

FISHMAN, D., FAULDS, G., JEFFERY, R., MOHAMED-ALI, V., YUDKIN, J.S., HUMPHRIES, S *et al*. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, v.102, p.1369-1376, 1998.

FOUAD, A.F. IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res*, v.76, p.1548-1554, 1997.

GALBRAITH, G.M., STEED, R.B., SANDERS, J.J., PANDEY, J.P. Tumor necrosis factor alpha production by oral leucocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol*, v.69, p.428-433, 1998.

GROSSMAN, R.M., KRUEGER, J., YOURISH, D., GRANELLI PIPERNO, A., MURPHY, D.P., MAY, L.T., KUPPER, T.S., SEHGAL, P.B., GOTTLIEB, A.B. Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.86, p.6367-6371, 1989.

GRUNWALD, U., FAN, X., JACK, R.S., WORKALEMAHU, G., KALLIES, A., STEHTER, F., SCHUTT, C. Monocytes can phagocytose gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J.Immunol*, v.157, p.4119-4125, 1996.

GUIMARÃES, A.L.S., **DE SÁ, A.R.**, VICTÓRIA, J.M.N., CORREA-SILVA, J.F., PESSOA, P.S., DINIZ, M.G., GOMEZ, R.S. Association of IL-1 beta polymorphism with RAS in Brazilian individuals. *Oral Diseases* (impress).

HAYASHI, J., MASAKA, T., ISHIKAWA, I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. *Infect Immun*, v.67, p.417-420, 1999.

HEESEN, M., BLOEMEKE, B., BACHMANN-MENNENGA, B., KUNZ, D. The CD14-260 C--> T promoter polymorphism co-segregates with the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-308G--> A polymorphism and is associated with the interleukin-1 beta (IL-1 beta) synthesis capacity of human leucocytes. *Eur Cytokine Netw*, v.13, p.230-233, 2002. (abstract)

HIRANO, T., MATSUDA, T., TURNER, M., MIYASAKA, N., BUCHAN, G., TANG, B., SATO, K., SHIMIZU, M., MAINI, R., FELDMANN, M., *et al.* Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, v.18, p.1797-1801, 1988.

HOFBAUER, J.C., LACEY, D.L., DUNSTAN, C.R., SPELSBERG, T.C., RIGGS, B.L., KHOSLA, S. Interleukin-1b and tumor necrosis factor-a, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, v.25, p.255-259, 1999.

HOLLA L.I., BUCKOVA D., FASSMANN A., HALABALA T., VASKU A., VACHA J. Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity chronic periodontitis. *J.Med.Genet*, v.39, p.844-848, 2002.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of educational psychology*, n.24, p.417-441; 498-520, 1933. (citado por FERREIRA, A.C.S., *dissertação de mestrado*, 2005).

HUBACEK, J.A., PITHA, J., SKODOVA, Z., STANEK, V., POLEDNE, R. C (-260) T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, v.99, p.3218-3220, 1999.

HURME, M., LAHDENPOHJA, N., SANTTILA, S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann Med*, v.30, p.469-473, 1998.

ISHIMI, Y., MIYAURA, C., JIN, C.H., AKATSU, T., ABE, E., NAKAMURA, Y., YAMAGUCHI, A., YOSHIKI, S., MATSUDA, T., HIRANO, T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol*, v.145, p.3297-3303, 1990.

JARVELAINEN, H.A., ORPANA, A., PEROLA, M., SAVOLAINEN, V.T., KARHUNEN, P.J., LINDROS, K.O. Promoter polymorphism of the CD14

endotoxin receptor gene as risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*, v.33, p.1148-1153, 2001.

JILKA, R.L., HANGOC, G., GIRASOLE, G., PASSERI, G., WILLIAMS, D.C., ABRAMS, J.S., BOYCE, B., BROXMEYER, H., MANOLAGAS, S.C. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, v.257, p.88-91, 1992.

JORDAN, M., OTTERNESS, I.G., NG, R., GESSNER, A., ROLLINGHOFF, M., BEUSCHER, H.U. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, v.154, p.4081-4090, 1995.

JORDE, L.B. *Genética Médica*. Guanabara Koogan, 1996, 226p.

KAKEHASHI, S., STANLEY, H.R., FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol*, v. 20, p.340-349, 1965.

KAWASHIMA, N., OKIJI, T., KOSAKA, T., SUDA, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemistry study. *J Endod*, v.22, p.311-316, 1996.

KAWASHIMA, N., STASHENKO, P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Archives Oral Biol*, v.44, p.55-66, 1999.

KINANE, D.F., HODGE, P., ESKDALE, J., ELLIS, R., GALLAGHER, G. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 and tumour necrosis factor *loci* in early-onset periodontitis. *J Periodont Res*, v.34, p.379-386, 1999.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. *Blood*, v.74, p.1-10, 1989.

KITCHENS, R. L., WANG, P., MUNFORD, R.S. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J.Immunol*, v.161, p.5534-5545, 1998.

KLEIN, W., TROMM, A., GRIGA, T., FRICKE, H., FOLWACZNY, C., HOCKE, M., EITNER, K., MARX, M., EPPLEN, J.T. The polymorphism at position -174 of the IL-6 gene is not associated with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v.13, p.45-47, 2001.

KOCH, W., KASTRATI, A., BOTTIGER, C., MEHILLI, J., VON BECKERATH, N., SCHOMIG, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*, v.159, p.137-144, 2001.

KOENIG, W., KHUSEYINOVA, N., HOFFMANN, M.M., MARZ, W., FROHLICH, M., HOFFMEISTER, A., BRENNER, H., ROTHENBACHER, D. CD14 C(-260)-T polymorphism, plasma levels of the soluble endotoxin receptor CD14. Their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, v.40, p.34-42, 2002.

KOPF, M., BAUMANN, H., FREER, G., FREUDENBERG, M., LAMERS, M., KISHIMOTO, T., ZINKERNAGEL, R., BLUETHMANN, H., KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, v.368, p.339-342, 1994.

KOPPELMAN, G.H., REIJMERINK, N.E., COLIN STINE, O., HOWARD, T.D., WHITTAKER, P.A., MEYERS, D.A., POSTMA, D.S., BLEECKER, E.R. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am.J.Respir.Crit.Care Med*, v.163, p.965-969, 2001.

KORNMAN, K. S., CRANE, A., WANG, H.Y., DI GIOVINE, F.S., NEWMAN, M.G., PIRK, F.W., WILSON, T.G.J.R., HIGGINBOTTOM, F.L., DUFF, G.W. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J.Clin.Periodontol*, v.24, p.72-77, 1997.

KORNMAN, K.S., HART, T.C. Genetics factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, v.14,p.202-215,1997.

KORNMAN, K.S., PANKOW, J., OFFENBACHER, S., BECK, J., DI GIOVINE, F., DUFF, G.W. Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease. *J Periodont Res*, v.34, p.353-357, 1999.

KUBE, D., PLATZER, C., VON KNETHEN, A., STRAUB, H., BOHLEN, H., HAFNER, M., TESH, H. Isolation of the human interleukin-10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*, v.7, p.1-7, 1995.

KUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations. *J Clin Invest*, v.86, p.1783-1789, 1990.

KURIHARA, N., BERTOLINI, D., SUDA, T., AKIYAMA, Y., ROODMAN, G.D. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*, v.144, p.4226-4230, 1990.

LANG, N.P., TONETTI, M.S., SUTER, J., SORRELL, J., DUFF, G.W., KORNMAN, K.S. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J.Periodont.Res*, v.35, p.102-107, 2000.

LE VAN, T.D., BLOOM, J.W., BAILEY, T.J., KARP, C.L., HALONEN, M., MARTINEZ, F.D., VERCELLI, D. A common single nucleotide polymorphism in

the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol*, v.167, p.5838-5844, 2001.

LEONARD, W.J., O'SHEA, J.J. Jaks and STATS: biological implications. *Annu Rev Immunol*, v.16, p.293-322, 1998.

LIM, C.S., ZHENG, S., KIM, Y.S., AHN, C., HAN, J.S., KIM, S., LEE, J.S., CHAE, D.W. The -174 G to C polymorphism of interleukin-6 gene is very rare in Koreans. *Cytokine*, v.19, p.52-54, 2002.

LIM, G.C., TORABINEJAD, M., KETTERING, J., LINKHART, T.A., FINKELMAN, R.D. Interleukin 1-beta in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endodon*, v.20, p.225-227, 1994.

LITTLEWOOD, A.J., RUSSEL, J., HARVEY, G.R., HUGHES, D.E., RUSSEL, R.G.G., GOWEN, M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts *in vitro*. *Endocrinology*, v.129, p.1513-1520, 1991.

LOOS, B.G., JOHN, R.P., LAINE, M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, v.32, p.159-179, 2005.

LOPES, H.P., SIQUEIRA Jr, J.F. *Endodontia – Biologia e Técnica*. 2. ed. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Editora Guanabara Koogan S.A, 2004. 964p.

LOWIK, C.W.G.M., VAN DER PLUIJM, G., BLOYS, H., HOEKMAN, K., BIJVOET, O.L.M., AARDEN, L.A., PAPAPOULOS, S.E. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, v.162, p.1546-1552, 1989.

MACATONIA, S.E., DOHERTY, T.M., KNIGHT, S.C., O'GARRA, A. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol*, v.150, p.3755-3765, 1993.

MADIANOS, P.N., BOBETSIS, Y.A., KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, v.32, p.57-71, 2005.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning, a laboratory manual, 1<sup>o</sup>ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982, Cap. 5, p.173-178.

MARIE, C., PITTON, C., FITTING, C., CAVAILLON, J.M. IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine*, v.8, p.147-151, 1996.

MASADA, M.P., PERSSON, R., KENNEY, J.S. LEE, S.W., PAGE, R.C. Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*, v.25, p.156-163, 1990.

McDOWELL, T.L., SYMONS, J.A., PLOSKI, R., FORRE, O., DUFF, G.W. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and novel IL-1 $\alpha$  polymorphism. *Arthritis and Rheumatism*, v.38, p.221-228, 1995.

McGUIRE, W., HILL, A.V.S., ALLSOFF, C.E., GREENWOOD, B.M., KWJATKOWSKI, D. Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, v.371, p.508-511, 1994.

MERRIMAN, C.R., PULLIAM, L.A., KAMPSCHDMIT, R.F. Comparison of leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.154, p.224-227, 1977.

MILLER III, M.C., MOHRENWEISER, H.W., BELL, D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, v.120, p.269-280, 2001.

MOLVIG, J., BAEK, L., CHRISTENSEN, P., MANOGUE, K.R., VLASSARA, H., PLATZ, P., NIELSEN, L.S., SVEJGAARD, A., NERUP, J. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol*, v.27, p.705-716, 1988.

MOORE, K.W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R., VIEIRA, P., MOSMANN, T.R. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, v.11, p.165-190, 1993.

MORAES, M.O., SANTOS, A.R., SCHONKEREN, J.J.M., VANDERBORGHT, P.R., OTTENHOFF, T.H.M., MORAES, M.E., MORAES, J.R., SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N., HUIZINGA, T.W.J. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics*, v.54, p.896-899, 2003.

MOREIRA, P.R. Avaliação da ocorrência de polimorfismos funcionais nos genes do receptor CD14 e da citocina IL-1 $\beta$  em pacientes com diferentes formas clínicas da doença periodontal. *Dissertação de mestrado*, 2003.

MOREIRA, P.R., **DE SÁ, A.R.**, XAVIER, G.M., COSTA, J.E., GOMEZ, R.S., GOLLOB, K.J., DUTRA, W.O. A functional interleukin-1 $\beta$  gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodont Res*, v.40, p.306-311, 2005.

MOREIRA, P.R., LIMA, P.M.A., SATHLER, K.O.B., IMANISHI, S.A.W., COSTA, J.E., GOMEZ, R.S., GOLLOB, K.J., DUTRA, W.O. IL-6 gene

polymorphism and phenotypic expression are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. (artigo submetido).

MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, v.136, p.2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol*, v.7, p.145-173, 1989.

MOSMANN, T.R., SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, v.17, p.138-146, 1996.

NEVILLE, B.W., DAMM, D.D., ALLEN, C.M., BOUQUOT, J.E. *Oral & Maxillofacial Pathology*. 1.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995. 711 p.

NICKLIN, M.J., WEITH, A., DUFF, G.W. A physical map of the region encompassing the human interleukin 1 alpha, beta and the interleukin 1 receptor antagonist genes. *Genomics*, v.19, p.382-384, 1994.

OTTO, P.G. *Genética humana e clínica*. Rocca, 1998, 333p.

PAGE, R.C., KORNMANN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, v.14, p.9-11, 1997.

PAN, Z., HETHERINGTON, C.J., ZHANG, D.E. CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development. *J Biol Chem*, v.274, p.23242-23248, 1999.

PAPASSOTIROPOULOS, A., BAGLI, M., JESSEN, F., BAYER, T.A., MAIER, W., RAO, M.L., *et al.* A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, v.45, p.666-668, 1999.

PARKHILL, J.M., HENNIG, B.J., CHAPPLE, I.L., HEASMAN, P.A., TAYLOR, J.J. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.27, p.682-689, 2000.

PARRA, F.C., AMADO, R.C., LAMBERTUCCI, J.R., ROCHA, J., ANTUNES, C.M., PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilian. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, p.177-182, 2003.

PERSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, n.6(2), p.559-572, 1901. (citado por FERREIRA, A.C.S., *dissertação de mestrado*, 2005).

POCIOT, F., MOLVIG, J., WOGENSEN, L., WORSAAE, H., NERUP, J. A Taq I polymorphism in the human interleukin 1 beta gene correlates with secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*, v.22, p.396-402, 1992.

POLI, V., BALENA, R., FATTORI, E., MARKATOS, A., YAMAMOTO, M., TANAKA, H., CILIBERTO, G., RODAN, G.A., COSTANTINI, F. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J*, v.13, p.1189-1196, 1994.

PRABHU, A., MICHALOWIEZ, B.S., MATHUR, A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J Periodontol*, v.67, p.515-522, 1996.

RAMSAY, A.J., HUSBAND, A.J., RAMSHAW, I.A., BAO, S., MATTHAEI, K.I., KOEHLER, G., KOPF, M. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*, v.264, p.561-563, 1994.

RAY, A., LA FORGE, K.S., SEHGAL, P.B. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*, v.10, p.5736-5746, 1990.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Immunology*, 5.ed. London: Mosby International Ltd.1998. 423p.

ROMANO-SPICA, V., GEORGIU, P., SUZUKI, H., PAPAS, T.S. BHAT, N.K. Role of ETS1 in IL-2 gene expression. *J Immunol*, v.154, p.2724-2732, 1995 (abstract).

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable polymerase. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.

SAKATA, M., SHIBA, H., KOMATSUZAWA, H., FUJITA, T., OHTA, K., SUGAI, M., SUGINAKA, H., KURIHARA, H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*, v.14, p.1486-1492, 1999.

SAMPAIO, I. Relatório das atividades de pós doutorado desenvolvidas no período de 03/09/92 a 04/03/93. Madrid: Universidade politécnica de Madrid, 1993, 123f.

SATO, T., ITO, A., MORI, Y. Interleukin-6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v.170, p.824-829, 1990.

SCAREL-CAMINAGA, R.M., TREVILATTO, P.C., SOUZA, A.P., BRITO Jr, R.B., CAMARGO, L.E., LINE, S.R. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.31, p.443-448, 2004.

SCHEIN, B., SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endodon*, v.1, p.19-21, 1975 (citados por STASHENKO, P., 1990).

SCHINDLER, R., MANCILLA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S.C., DINARELLO, C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, v.75, p.40-47, 1990.

SCHONFELD, S.E., GREENING, A.B., GLICK, D.H., FRANK, A.L., SIMON, J.H., HERLES, S.M. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.53, p.82-87, 1982.

SEHGAL, P.B., MAY, L.T., TAMM, I., VILCEK, J. Human  $\beta$ 2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science*, v.235, p.731-732, 1987.

SHIMADA, K., WATANABE, Y., MOKUNO, H., IWAMA, Y., DAIDA, H., YAMAGUCHI, H. Common polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. *The American Journal of Cardiology*, v.86, p.682-684, 2000.

SKOOG, T., VAN'T HOOFT, F.M., KALLIN, B., JOVINGE, S., BOQUIST, S., NILSSON, J., ERIKSSON, P. A common functional polymorphism (C/A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF- $\alpha$ . *Hum Mol Genet*, v.8, p.1443-1449, 1999.

SOGA, Y., NISHIMURA, F., OHYAMA, H., MAEDA, H., TAKASHIBA, S., MURAYAMA, Y. Tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) -1031/-863, -857 single nucleotide polymorphisms (SNP) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*, v.30, p.524-531, 2003.

STASHENKO, P., YU, S.M. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res*, v.68, p.830-834, 1989.

STASHENKO P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*, v.6, p.89-96, 1990.

STASHENKO, P., YU, S.M., WANG, C-Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endodon*, v.18, p.422-426, 1992.

STASHENKO, P., WANG, C-Y., TANI-ISHII, N., YU, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.78, p.494-502, 1994.

STUBER, F., UDALOVA, I.A., BOOK, M., DRUTSKAYA, L.N., KUPRASH, D.V., TURETSKAYA, R.L., SCHADE, F.U., NEDOSPASOV, S.A. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J.Inflamm*, v.46, 42-50, 1996.

SUGAWARA, S., SUGIYAMA, A., NEMOTO, E., RIKIISHI, H., TAKADA, H. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD 14 mediated interleukin 8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect.Immunol*, v.66, p.3043-3049, 1998.

TAKAHASHI, K., MACDONALD, D.G., KINANE, D.F. Analysis of immunoglobulin-synthesizing cells in human dental periapical lesions by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Patol Med*, v.25, p.331-335, 1996.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, v.31, p.311-325, 1998.

TANI-ISHII, N., WANG, C-Y., STASHENKO P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*, v.10, p.213-219, 1995.

TAYLOR, S.L. Genomics organization of the interleukin 1 locus. *Genomics*, v.79, p.726-733, 2002.

TERRY, C.F., LOUKACI, V., GREEN, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin-6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.18138-18144, 2000.

THOMPSON, M.W. *Genética médica*. Guanabara Koogan, 5.ed.1993.

TILG, H., TREHU, E., ATKINS, M.B., DINARELLO, C.A., MIER, J.W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, v.83, p.113-118, 1994.

TILG, H., DINARELLO, C.A., MIER, J.W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today*, v.18, p.428-432, 1997.

TORABINEJAD, M., EBY, W.C., NAIDORF, I.J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endodon*, v.11, p.479-488, 1985.

TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.78, p.511-521, 1994.

TURNER, D.M., WILLIAMS, D.M., SANKARAN, D., LAZARUS, M., SINNOT, P.J., HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, v.24, p.1-8, 1997.

VAN DEUREN, M., DOFFERHOFF, A.S.M., VAN DER MEER, J.W.M. Cytokines and the response to infection. *J Pathol*, v.168, p.349-356, 1992.

VAN DE LOO, A.J., KUIPER, S., VAN ENCKEVORT, H.J., ARNTZ, O.J., VAN DEN BERG, W.B. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. *Am J Pathol*, v.151, p.177-191, 1997.

VERCELLI, D. The functional genomics of CD14 and its role in IgE responses: an integrated view. *J Allergy Clin Immunol*, v.109, p.14-21, 2002.

VIEIRA, P., DE WAAL MALEFYT, R., DANG, W., JOHNSON, K.E., KASTELEIN, R., FIORENTINO, D. F., DE VRIES, J.E., RONCAROLO, M.G., MOSSMANN, T.R., MOORE, K.W. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) cDNA clones: homology to Epstein Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci*, v.88, p.1172-1176, 1991.

WALKER, K.F., LAPPIN, D.F., TAKAHASHI, K., HOPE, J., MACDONALD, D.G., KINANE, D.F. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci*, v.108, p.195-201, 2000.

WALKER, S.J., VAN DYKE, T.E., RICH, S., KORNMANN, K.S., DI GIOVINE, F.S., HART, T.C. Genetic polymorphisms of the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J.Periodontol*, v.71, p.723-728, 2000.

WANG, C-Y., TANI-ISHII, N., STASHENKO, P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol*, v.12, p. 65-71, 1997.

WANG, X.Y., HURME, M., JYLHA, M., HERVONEN, A. Lack of association between human longevity and polymorphisms of IL-1 cluster, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  genes in Finnish nonagenarians. *Mechanisms of Ageing and Development*, v.123, p.29-38, 2001.

WHYTE, M., HUBBARD, R., MELICONI, R., WHIDBORNE, M., EATON, V., BINGLE, C., TIMMS, J., DUFF, G., FACCHINI, A., PACILLI, A., FABBRI, M., HALL, I., BRITTON, J., JOHNSTON, I., DI GIOVANI, F. Increased risk of

fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med*, v.162, p.755-758, 2000.

WILSON, A.G., DI GIOVINE, F.S., BLAKEMORE, A.I.F., DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*, v.1, p.353, 1992.

WILSON, A.G., DE VRIES, N., POCIOT, F., DI GIOVINE, F.S., VAN DER PUTTE, L.B.A., DUFF, G.W. 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*, v.177, p.557-560, 1993.

WILSON, A.G., SYMONS, J.A., McDOWELL, T.L., McDEVITT, H.O., DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc.Natl.Acad.Sci*, v.94, p.3195-3199, 1997.

WORMHOUDT, L.W., COMMANDEUR, J.N., VERMEULEN, N.P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol*, v.29, p.59-124, 1999 (abstract).

WRIGHT, S.D., RAMOS, R.A., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J., MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, v.249, p.1431, 1990.

YAMAZAKI, K., TABETA, K., NAKAJIMA, T., OHSAWA, Y., UEKI, K., ITOH, H., YOSHIE, H. Interleukin 10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.28, p.828-832, 2001.

ZHANG, D.E., HETHERINGTON, C.J., TAN, S., DZIENNIS, S.E., GONZALEZ, D.A., CHEN, H.M., TENEN, D.G. Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem*, v.269, p.11425-11434, 1994.

## 10 - ANEXOS

## ANEXO A

## FICHA CLÍNICA

Caso nº \_\_\_\_\_

Data da inclusão: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_

Sexo: M ( ) F ( )

Data nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ País: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Principal local onde morou até 4 anos de idade:

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Zona rural ou urbana: \_\_\_\_\_ (R ou U)

Grau de Escolaridade: \_\_\_\_\_

Analfabeto= 1 I grau incompleto= 2 I grau completo= 3

II grau incompleto= 4 II grau completo= 5

III grau incompleto= 6 III grau completo= 7

Profissão: \_\_\_\_\_

Características da moradia/família

- nº de pessoas \_\_\_\_\_
- nº de cômodos da casa \_\_\_\_\_
- É abastecida por água tratada? (sim ou não) \_\_\_\_\_
- É servida por rede de esgoto? (sim ou não) \_\_\_\_\_
- Tem eletricidade? (sim ou não) \_\_\_\_\_

Possui

- telefone \_\_\_ (sim ou não) se sim: nº \_\_\_\_\_
- televisão \_\_\_ (sim ou não) se sim: nº \_\_\_\_\_
- carro \_\_\_ (sim ou não) se sim: nº \_\_\_\_\_

Renda familiar (em salários mínimos vigentes no país): \_\_\_\_\_

1 salário mínimo= R\$ \_\_\_\_\_ U\$ \_\_\_\_\_

Hábitos

- Ingere bebidas alcoólicas? \_\_\_ (sim ou não) se sim, quais? \_\_\_  
quantos copos? \_\_\_\_\_
- Fuma \_\_\_ (sim ou não) se sim, que tipo? \_\_\_\_\_  
quantidade (unidades) \_\_\_\_\_

Doenças pré-existentes (sim ou não)

- asma \_\_\_\_\_
- diabetes \_\_\_\_\_
- anemia \_\_\_\_\_
- úlcera péptica \_\_\_\_\_

Quanto à lesão de origem endodôntica:

- tempo de duração da doença \_\_\_\_\_ (dias)]
- manifestação primária -----(sim ou não) Se recorrente, especificar a quantidade de recorrências.
- Região acometida:
- via de drenagem: ----- intra-oral (especificar o local da drenagem):  
-----  
----- extra-oral
- tomou drogas para estes sintomas\_\_\_\_ (sim ou não)
- Se sim, tomou antibióticos\_\_\_\_ (sim ou não)
- quais ? \_\_\_\_\_
- há quanto tempo? \_\_\_\_\_
- tomou aspirina? \_\_\_\_\_ (sim ou não)
- tomou anti-inflamatório? \_\_\_\_\_ (sim ou não)
- Usou antibiótico no último mês \_\_\_\_ (sim ou não)
- Se sim, qual o nome? \_\_\_\_\_
- Usou outros remédios no último mês \_\_\_\_\_ (sim ou não)
- Se sim, tipo de medicamento e posologia
- Tem alergia a medicamentos o alimentos? \_\_\_\_ (sim ou não)
- Se sim, qual ou quais? \_\_\_\_\_

## ANEXO B

**DADOS CLÍNICOS COLETADOS DOS PACIENTES DOS GRUPOS  
EXPERIMENTAL E CONTROLE**

<b>PACIENTES G. EXPERIMENTAL</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>	<b>VIA DE DRENAGEM</b>	<b>PACIENTES G. CONTROLE</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>
1 - SG	F	12a	Extra-oral	C51 - LKMA	F	11a
2 - APR	M	40a	Intra-oral			
3 - SSS	M	33a	Intra-oral	C4 - PRL	M	32a
4 - DN	F	51a	Intra-oral	C41 - CMRF	F	52a
5 - MAMN	F	24a	Intra-oral	C2 - RV	F	27a
6 - CEM	M	25a	Intra-oral	C26 - ALF	M	29a
7 - ACJS	F	22a	Intra-oral	C8 - RDG	F	22a
8 - EXCLUÍDO						
9 - PHBS	M	27a	Intra-oral			
10 - INA	M	19a	Intra-oral			
11 - LA	M	47a	Intra-oral	C7 - KBC	M	50a
12 - EXCLUÍDO						
13 - GML	F	20a	Intra-oral			
14 - FFC	F	8a	Extra-oral			
15 - WLS	F	36a	Intra-oral	C5 - RBS	F	40a
16 - ASP	F	19a	Intra-oral	C9 - IFD	F	18a
17 - WAM	M	18a	Intra-oral	C57 - FJS	M	11a
18 - LACC	F	24a	Intra-oral	C3 - CSS	F	29a
19 - AES	M	44a	Extra-oral	C6 - TED	M	44a
20 - EAM	M	18a	Intra-oral	C52 - DCP	M	13a
21 - ELS	M	16a	Intra-oral	C49 - HF	M	14a
22 - WRA	M	29a	Intra-oral	C53 - GAP	M	29a
23 - CRP	M	20a	Intra-oral			
24 - JNSB	M	39a	Intra-oral	C10 - MMP	M	40a
25 - ALSP	F	24a	Intra-oral	C18 - AJS	F	21a
26 - JCO	M	39a	Intra-oral	C29 - BM	M	37a
27 - JGM	M	30a	Extra-oral			
28 - JWOM	M	33a	Intra-oral	C47 - AJS	M	34a
29 - PCV	F	23a	Intra-oral	C21 - KN	F	30a
30 - PME	F	31a	Intra-oral	C11 - RAGS	F	36a
31 - DB	M	40a	Intra-oral	C48 - NAO	M	35a
32 - AMMCR	F	34a	Intra-oral	C24 - KBO	F	40a
33 - VLE	F	39a	Intra-oral	C12 - AS	F	40a
34 - RSC	F	20a	Intra-oral			
35 - ES	F	39a	Intra-oral	C28 - ALLD	F	34a
36 - G	M	34a	Extra-oral	C17 - JCS	M	37a
37 - ESA	F	51a	Intra-oral	C14 - NHLC	F	52a
38 - JER	F	6 a	Intra-oral			
39 - MPF	M	71 a	Intra-oral			
40 - AASS	M	21a	Intra-oral			
41 - LEJ	F	10a	Intra-oral			
42 - MLR	M	45a	Intra-oral	C15 - MASS	M	41a
43 - AFR	F	19a	Intra-oral			

44 - CAGT	M	42a	Intra-oral	C31 - PRH	M	42 a
45 - CSS	F	39 a	Intra-oral	C40 - KSL	F	35a
46 - RSS	F	63a	Intra-oral	C22 - DFC	F	61a
47 - RCB	F	21a	Intra-oral	C36 - DPM	F	24a
48 - PISG	F	9a	Intra-oral			
49 - SJLS	M	50a	Intra-oral	C23 - JDV	M	51a
50 - ELS	M	40a	Intra-oral	C46 - EFDJ	M	35 a
51 - FA	M	27a	Intra-oral	C45 - AAB	M	30a
52 - VLMM	F	45a	Intra-oral	C32 - IM	F	44a
53 - EGS	F	34a	Intra-oral	C34 - ALT	F	34a
54- RAO	F	29a	Intra-oral	C50 - SA	F	21a
55 - MCA	F	42a	Intra-oral	C13 - VAGBM	F	42a
56 - MTMF	M	48a	Intra-oral	C42 - LM	M	45a
57 - NES	F	40a	Intra-oral	C55 - SFS	F	35a
58 - EAMS	F	31a	Intra-oral	C39 - EOG	F	34a
59 - JPB	M	58 a	Intra-oral	C44 - AA	M	54a
				C20 - CSCF	F	41a
				C1 excluído		
				C19 - MSRSA	F	46a
				C25 - MCP	F	72 a
				C16 excluído		
				C30 excluído		
				C35 - MASB	F	48a
				C37 - DGB	M	41a
				C38 - MCO	M	42a
				C33 excluído		
				C54 - PHSJ	M	10a
				C27 excluído		
				C43 - NMB	M	53a
				C56 - BPE	M	10a
				C58 - DHNM	M	9a
				C59 - AAP	M	9a

## ANEXO C

### SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA

<b>Sílica</b>	-SiO <sub>2</sub>	60g
	-H <sub>2</sub> O q.s.p	500ml

#### **Preparo da sílica:**

- Ressuspender em cilindro graduado de 5cm de diâmetro com 27,5cm de coluna de H<sub>2</sub>O
- Sedimentar por 24 horas;
- Descartar o sobrenadante e adicionar H<sub>2</sub>O q.s.p. 500ml. Ressuspender o sedimento;
- Deixar a temperatura ambiente por 5 horas. Em seguida descartar o sobrenadante;
- Adicionar à suspensão 600µl de HCl para ajustar o pH para 2,0;
- Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por no mínimo 6 meses.

#### **Tampão de Lise (L6)**

- GuHCL	97g
- Tris HCL 0,1M pH 6,4	100ml
- EDTA 0,2M pH8,0	22ml
- Triton X-100	2,45ml

#### **Tampão de Lavagem (L2)**

- GuHCL	97g
- Tris HCL 0,1M pH 6,4	100ml

Os tampões de lise e lavagem devem ser estocados ao abrigo da luz, por no máximo 15 dias.

#### **Etanol 70%**

- Medir o volume de etanol absoluto de acordo com o volume final;
- Completar com água destilada;

- Homogeneizar.

### **Acetona 100%**

-Qualidade compatível com os processos de Biologia Molecular.

### **Tampão Tris-EDTA (TE)**

-.Preparar as seguintes soluções:

o Tris HCL 1M pH 8,0

o EDTA 0,5M pH 8,0

- Unir em um único recipiente as soluções preparadas, nas seguintes concentrações, de acordo com o volume final a ser preparado:

o Tris HCL 10mM pH 8,0

o EDTA 1mM pH 8,0

- Completar o volume final com água milli-Q;

- Homogeneizar;

- Autoclavar;

- Conservar à temperatura ambiente.

## ANEXO D

### SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE PCR

-Água milli-Q

-Pré-mix (Phoneutria): \*Tampão IB - 200µl

dNTP 1mM - 200µl

Taq 5u/µl - 20µl

H<sub>2</sub>O- 580µl

\* Tampão IB: 500mM KCl; 100mM Tris-HCl pH8,4; 1,5mM MgCl<sub>2</sub>  
(10X); 1% Triton X – 100.

- *Primer 1* (Invitrogene ou Fermentas)

- *Primer 2* (Invitrogene ou Fermentas)

Os *primers* foram utilizados em uma concentração de 20 picomoles

**ANEXO E****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E  
POLIACRILAMIDA.****GEL DE POLIACRILAMIDA A 10%****Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 20x**

- Tris	121g
- Ácido bórico	61,7g
- EDTA	7,44g
- H <sub>2</sub> O q.s.p.	1000ml

**TBE 10X**

- TBE 20X	500ml
- H <sub>2</sub> O q.s.p	1000ml

**TBE 1X**

- TBE 20X	50ml
- H <sub>2</sub> O q.s.p	1000ml

**Acrilamida 40%**

- Acrilamida	38g
- Bis-acrilamida	2g
- H <sub>2</sub> O q.s.p	100ml

**Acrilamida 30%**

- Acrilamida 29g
- Bis-acrilamida 1g
- H<sub>2</sub>O q.s.p 100ml

**Confecção do gel de poliacrilamida a 10% (18x16cm)**

- Lavar as placas de vidro com éter, álcool isopropílico e álcool 70%;
- Adicionar em um Béquer;

- o- Acrilamida 40% =10ml
- o- TBE10X =4ml
- o- H<sub>2</sub>O q.s.p =40ml
- o- Temed =40µl
- o- Persulfato de amônio (APS) 10%=400µl

**Confecção do gel de poliacrilamida a 10% (10x7cm)**

- Lavar as placas de vidro com éter, álcool isopropílico e álcool 70%;
- Adicionar em um Béquer;

- o- Acrilamida 30% =4,16ml
- o- TBE5X =2,5ml
- o- H<sub>2</sub>O q.s.p =5,72ml
- o- Temed =10µl
- o- Persulfato de amônio (APS) 10%=100µl

**Coloração pela Prata :****-Solução fixadora:**

-100ml de etanol absoluto; 5ml de ácido acético; 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**-Solução reveladora:**

-15g de NaOH; 3ml de formaldeído; 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**-Solução de coloração:**

- 0,15g de AgNO<sub>3</sub>; 50ml de solução fixadora; 100ml de H<sub>2</sub>O destilada qsp.

-Colocar o gel em uma vasilha de vidro contendo 150ml de solução fixadora por 10'.

-Retirá-la e guardá-la para utilizar depois.

-Adicionar a solução de coloração por 15 a 20'.

-Lavar o gel com água por 30''.

-Colocar a solução reveladora até o aparecimento das bandas.

**Géis de agarose 1,5% e 2,0%**

-1,5g de agarose para 100ml de Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 1x

-2,0g de agarose para 100ml de TAE1x

**EDTA 0,5M**

EDTA	18,612g
H <sub>2</sub> O q.s.p	100ml
Acertar pH para 8,0 com NaOH	

**Tampão TAE 50X**

Tris base	242,0g
-----------	--------

Ácido acético glacial	57,1ml
EDTA 0,5M pH 8,0	100ml
H <sub>2</sub> O q.s.p	1000ml

**Tampão TAE 1X**

Tampão TAE 50X 20ml	
H <sub>2</sub> O q.s.p	1000ml

**Solução de Brometo de etídeo 0,3µg/ml**

Brometo de etídeo	6µl
H <sub>2</sub> O q.s.p	200ml

**Tampão de amostra (Gel Loading buffer) 6x**

Azul de bromofenol	0,025g
Glicerol	3ml
H <sub>2</sub> O q.s.p	10ml

## ANEXO F

### Sequência da região promotora do gene *CD14*

agttaaatat ctgaggatat tcagggactt ggatttggtg gcaggagatc aacataaacc  
 aagacaagga agaagtcaaa gaaatgaatc aagtagattc tctgggatat aaggtagggg  
 gattgggggg ttggatagtg cagagtatgg tactggccta aggcactgag gatcatcctt  
 ttccacacc caccagagaa ggcttaggct cccgagtcaa cagggcattc acgcctgggg  
 cgctgagtc atcaggacac tgccaggaga cacagaaccc tagatgcctt gcagaatcct

tctgttacg tccccctcc ctgaaacatc cttcattgca atatttcag gaaaggaagg  
 gggctggctc ggaggaagag aggtggggag gtgatcaggg ttcacagagg agggaactga  
 atgacatccc aggattacat aaactgtcag aggcagccga agagttcaca agtgtgaagc  
 ctggaagccg gcggtgccc ctgtgtagga aagaagctaa agcactcca gagcctgtcc  
 ggagctcaga ggttcggaag acttatcgac catggtgagt gtagggctt ggggtcgaac  
 cggtgccact cgggagccac aggggttga tggggcctcc tagacc

### Sequência do exon 5 do gene *IL1B*

gacttgacc gtatatctc aggtgtcctc  gaagaaatca aatttgcca cctcgcctca  
 cgaggcctgc ccttctgatt ttatacctaa acaacatgtg ctccacatt cagaacctat

cttct cgacacatgggata acgaggctta tgtgcacgat gcacctgtac gatcactgaa  
 ctgcacgctc cgggactcac agcaaaaaag cttggtgatg tctggtccat atgaactgaa  
 agctctccac ctccaggac aggatatgga gcaacaaggt aatggaac atcctggtt  
 ccctgcctgg cctcctggca gcttgctaat tctcatggt taaacaaag tagaaagtta  
 atttaaggca aatgatcaac acaagtgaaa aaaaatatta aaaaggaata taaaacttt  
 ggcctagaa atggcacatt tgattgact ggccagtgca ttgttaaca ggagtgtgac  
 cctgagaaat tagacggctc aagcactccc aggaccatgt ccaccaagt ctctgggca  
 tagtgcagtg tcaattctc cacaatatgg ggtcattga tggacatggc ctaactgcct

### Sequência da região promotora do gene *IL6*

ggagtcacac actccacctg gagacgcctt gaagtaactg cacgaaattt gaggatggcc  
 aggcagtcta caacagccgc tcacagggag agccagaaca [cagaagaact cagatgaccg](#)  
 gtagtattac cttctcata atccaggctt ggggggctgc gatggagtca gaggaaactc  
 agttcagaac atctttggtt ttacaaata caaattaact ggaacgctaa attctagcct  
 gttaatctgg tcaactgaaa aaaaattttt tttttcaaa aaacatagct ttagcttatt  
 tttttctct ttgtaaact tcgtgcatga cttcagcttt actctttgtc aagacatgcc  
 aaagtgtga gtcactaata aaagaaaaaa agaaagtaaa ggaagagtgg ttctgcttct  
 tagcgctagc ctcaatgacg acctaagctg cactttccc cctagttgtg tcttgccatg  
 ctaaaggacg tcacattgca caatcttaat aaggttcca [atcagcccca](#) cccgctctgg  
 cccaccctc accctcaac aaagattat caaatgtggg atttcccat gagtctcaat  
 attagagtct caaccccaa taaatatagg actggagatg tctgaggctc attctgccct  
 cgagccaccg ggaacgaaag agaagctcta tctcccctcc aggagcccag ctatgaactc  
 cttctccaca agtaagtga gaaatcctt agccctggaa ctgccagccg gtcgagccct  
 gtgtgagga ggggtgtgtg gccagggat gcggggccc agcagcagag gcaggctccc  
 agctgtgctg tcagtcac

### Sequência da região promotora do gene *IL10*

cctaggtcag tgttctccc agttacagtc taaactggaa tggcaggcaa agcccctgtg  
 gaaggggaag gtgaaggctc aatcaaagga tcccagaga cttccagat atctgaagaa  
 gtctgatgt cactgccccg gtcctcccc aggtagagca acactcctcg tcgcaacca  
 actggtcccc cttacctct acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac  
 acacaaatcc [aagacaacac tactaaggct cctt](#) tgggaa ggggaagtag ggataggtaa  
 gaggaaagta agggacctcc tatccagcct ccatggaatc ctgacttctt ttcttgta  
 ttcaacttc tccaccca tctttaaac ttagactcc agccacagaa gcttacaact  
 aaaagaaact ctaaggcaa ttaaatcaa ggttcatc tatgtgctgg agatggtga  
 cagtagggtg aggaaaccaa attctcagtt ggcactggtg taccctg ta caggtgatgt  
 aatatctctg tgcctcagtt tgctcactat aaaatagaga cggtaggggt catggtgagc  
 actacctgac [tagcatataa gaagc](#)ttca gcaagtgcag actactctta cccacttccc  
 ccaagcacag ttggggtggg ggacagctga agaggtggaa acatgtgccg gagaatccta  
 atgaaatcgg ggtaaaggag cctggaacac atcctgtgac cccgcctgta ctgtaggaag  
 ccagtctctg gaaagtaaaa tgaagggtc gcttggaac ttgaggata tttagcccac  
 cccctcattt ttacttggg aaactaaggc ccagagacct aagggtactg cctaagttag  
 caaggagaag tcttgggtat tcatccagg ttggggggac ccaattatt ctcaatcca  
 ttgtattctg gaatgggcaa ttgtccacg tcactgtgac ctaggaacac gcgaatgaga  
 acccacagct gagggcctct gcgcacagaa cagctgttct cccagggaaa tcaactttt  
 ttaattgaga agctaaaaa ttattctaag agaggtagcc catcctaaaa atagctgtaa  
 tgcagaagtt catgttcaac caatcattt tgcttacgat gcaaaaattg aaaactaagt

ttattagaga ggtagagaa ggaggagctc taagcagaaa aaatcctgtg ccgggaaacc  
 ttgattgtgg cttttaatg aatgaagagg cctccctgag cttacaatat aaaaggggga  
 gagagagtg aaggtctaca catcaggggc ttgctcttg caaaaccaaac cacaagacag  
 acttgcaaaa gaagcatgc acagctcagc actgc

### Sequência da região promotora do gene *TNFA*

gctgtctgct tgtgtgtgtg tgtctgggag tgagaacttc ccagtctatc taaggaatgg  
 agggagggac agagggtca aaggagcaa gagctgtggg gagaacaaaa ggataagggc  
 tcagagagct tcaggatat gtgatggact caccaggtga ggccgccaga ctgctgcagg  
 ggaagcaaag gagaagctga gaagatgaag gaaaagtcag ggtctggagg ggcgggggtc  
 agggagctcc tgggagatat ggccacatgt agcggctctg aggaatgggt tacaggagac  
 ctctggggag atgtgaccac agcaatgggt aggagaatgt ccagggctat ggaagtcgag  
 tatggggacc ccccctaac gaagacaggg ccatgtagag ggccccaggg agtgaaagag  
 cctccaggac ctccaggtat ggaatacagg ggacgttaa gaagatatgg ccacacactg  
 gggccctgag aagtgagagc tcatgaaaa aaatcagga cccagagtt ccttgaagc  
 caagactgaa ccaagcatta tgagtctccg ggtcagaatg aaagaagagg gctgcccc  
 gtgggtctg tgaattccg ggggtgattt cactccccg ggctgtcca ggctgtccc  
 tgctaccgc acccagcctt tctgaggcc tcaagcctgc caccaagccc ccagctcctt  
 ctccccgag ggcccaaca caggcctcag gactcaacac agctttccc tccaaccccg  
 ttttctctcc ctcaacggac tcagcttct gaagcccctc ccagttctag ttctatctt  
 ttctgcatc ctgtctgaa gttagaagga aacagaccac agacctggtc ccaaaaagaa  
 atggaggcaa taggtttga ggcctatggg gacgggggtc agcctccagg gtctacaca  
 caaatcagtc agtggcccag aagaccccc tcggaatcgg agcagggagg atggggagtg  
 tgaggggtat cctgatgct tgtgtgtccc c

As sequências em azul correspondem às regiões às quais os *primers* se ligam e o símbolo ↓ corresponde ao sítio de restrição das enzimas.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)