



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α -308 G/A) EM DIFERENTES
FORMAS DE PERIODONTITE

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

**DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE
NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α -308 G/A) EM DIFERENTES
FORMAS DE PERIODONTITE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Mestrado), Faculdade de Odontologia da UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

ORIENTADORA: PROF. DRA. ANA PAULA VIEIRA COLOMBO

Rio de Janeiro

2007

Ficha Catalográfica

Giovannetti-Menezes, Natascha

Determinação do polimorfismo genético do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α -308G/A) em diferentes formas de periodontite / Natascha Giovannetti de Menezes. - Rio de Janeiro: UFRJ/F.O., 2007.

xx, 91 f: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo

Dissertação (Mestrado) - UFRJ/ F.O./ Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), 2007.

Referências Bibliográficas: f.47-62.

1. Polimorfismo genético. 2. TNF- α . 3. Doença periodontal. I.Colombo, Ana Paula Vieira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia). III. Título.

NATASCHA GIOVANNETTI DE MENEZES

**DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL ALFA (TNF- α -308G/A) EM DIFERENTES FORMAS DE
PERIODONTITE**

ORIENTADORA: PROF. DRA. ANA PAULA VIEIRA COLOMBO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Mestrado), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Rio de Janeiro, _____ de março de 2007.

Aprovada por:

Milton de Uzeda – Doutor (Presidente da Banca)

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ricardo Guimarães Fischer – Doutor (Membro da Banca)

Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Lúcio de Souza Gonçalves – Doutor (Membro da Banca)

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ana Paula Vieira Colombo – Doutora (Orientadora)

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2007

Trabalho realizado no Departamento de Clínica da Faculdade de Odontologia e Departamento de Microbiologia Médica, laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ, sob a orientação da Prof^a Ana Paula Vieira Colombo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Branca, que sempre colocou minha educação como prioridade em seus ideais, ensinando-me que o conhecimento intelectual e a família representam o nosso maior patrimônio. Agradeço a ela todo o estímulo e amor que me dedica e que é fundamental em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por todas as oportunidades e conquistas obtidas ao longo da minha trajetória; e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, para que eu pudesse chegar até aqui.

A todos os pacientes que com muita boa vontade e paciência contribuíram para a realização deste estudo.

A Prof^a. Dr^a. Ana Paula Vieira Colombo pelo exemplo pessoal de determinação, por todos os seus ensinamentos teóricos, laboratoriais e pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho pela constante atenção ao longo de todo o curso, principalmente nos seminários e na clínica, pela paciência e orientação durante os procedimentos cirúrgicos e por transmitir seus conhecimentos e experiências.

Ao Neio Boechat pelo carinho, companheirismo, apoio e incentivo.

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFRJ: Anna Theresa Thomé Leão, Carmelo Sansone, Maria Cynésia Torres e Ricardo Lima pela dedicação ao ensino e à pesquisa e pela ajuda no atendimento aos pacientes.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Odontológica: Arlene, Rosinha, Simone, Leandro, Antônio e Beto pelo apoio e colaboração na clínica durante todo o curso.

Aos amigos do curso de mestrado: Cristine, Susane, Celso, Lorena, Nilo, Vinícius e David pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia Oral: Carina, Renata, Lúcio, Andréa, Rodrigo e Cíntia pela amizade, atenção e auxílio na coleta das amostras clínicas e na realização dos experimentos laboratoriais.

Aos membros da banca – Prof. Dr. Milton de Uzeda, Prof. Dr. Ricardo Fischer, Prof. Dr. Lúcio Gonçalves - por terem aceito o compromisso de julgar o meu trabalho de tese.

Ao Fernando Magalhães, técnico do laboratório de Microbiologia Oral, pelo auxílio nas atividades de bancada.

Agradecimento especial ao Marlei Gomes, por sua disponibilidade constante e precioso auxílio durante todo período de realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Departamento de Microbiologia Médica, em particular a Ivi Cristina.

Aos amigos Prof. Dr. Walter Oelemann e Karla Rodrigues por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

À Dr^a Yuriko Kurosawa pelo exemplo de profissional competente e atenciosa. Com ela tive o privilégio de iniciar o exercício da Periodontia.

A todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado durante este período.

Às instituições de fomento à pesquisa e a pós-graduação: CAPES, CNPq, Pró-Reitoria e FAPERJ pelo suporte financeiro.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade em que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

MENEZES, NATASCHA GIOVANNETTI DE. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α -308G/A) EM DIFERENTES FORMAS DE PERIODONTITE. Dissertação de Mestrado em Odontologia (Mestrado), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

O polimorfismo genético de nucleotídeo único (SNP) na posição - 308 da região promotora do gene do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) tem sido associado com um incremento na produção desta citocina e susceptibilidade à doença periodontal. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência do SNP do TNF- α (-308 G/A) em indivíduos de uma amostra da população brasileira com diferentes condições periodontais. Cento e sessenta e três pacientes categorizados como saúde periodontal (SP = 51), periodontite crônica (PC = 74) e periodontite agressiva generalizada (PAG = 38) participaram deste estudo. O DNA genômico foi obtido a partir das amostras de saliva. A genotipagem do TNF- α foi realizada através da amplificação do gene pela técnica da PCR e análise dos produtos amplificados através da RFLP. Diferenças nos parâmetros clínicos e na frequência dos alelos/genótipos entre os grupos foram analisadas através dos testes de Kruskal-Wallis, χ^2 e teste exato de Fisher. O alelo -308G foi detectado em 91,7%, enquanto o alelo -308A foi encontrado em 35,4% de todos os indivíduos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição da frequência dos alelos A e G ($\chi^2 = 2,610$; $p > 0,05$), e dos genótipos G/G, G/A e A/A ($\chi^2 = 2,547$; $p = 0,636$) entre os grupos. Os dados aqui obtidos demonstram que o polimorfismo do TNF- α (-308 G/A) não está associado com doença periodontal nesta amostra da população brasileira.

Palavras-chaves: TNF- α ; doença periodontal; polimorfismo genético.

ABSTRACT

MENEZES, NATASCHA GIOVANNETTI DE. DETERMINATION OF THE GENETIC POLYMORPHISM OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α -308G/A) IN DIFFERENT FORMS OF PERIODONTITIS. Dissertation (Master in Dentistry - Periodontics), School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

A single nucleotide polymorphism (SNP) at the position -308 of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) promoter region has been shown to influence cytokine production and susceptibility to periodontitis. The aim of this study was to determine the frequency of the TNF- α (-308 G/A) SNP in subjects with different periodontal conditions from a Brazilian population. One hundred and sixty-three subjects, categorized as periodontal health (PH = 51), chronic (CP = 74) and generalized aggressive (GAgP = 38) periodontitis participated in the study. Genomic DNA was obtained from mouthwash samples and TNF- α genotyping was performed by PCR and RFLP analyses. Differences in clinical parameters and frequency of allotypes/genotypes among groups were sought by Kruskal-Wallis, χ^2 and Fisher's exact tests. The allele -308G was detected in 91.7%, whereas the -308A allele was found in 35.4% of all subjects. No significant differences were observed in the frequency distribution of these alleles ($\chi^2 = 2.610$; $p > 0.05$), and the genotypes G/G, G/A, and A/A ($\chi^2 = 2.547$; $p = 0.636$) among groups. These data suggest that the TNF- α (-308 G/A) polymorphism is not associated with periodontitis in this Brazilian population.

Key words: TNF- α , periodontal diseases; genetic polymorphism

SUMÁRIO

	Págs.
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doenças Periodontais.....	1
1.2. Etiologia Microbiana.....	3
1.3. Imunidade, Inflamação e Doença Periodontal.....	7
1.3.1. Efeitos Inflamatórios do TNF- α e da IL-1.....	8
1.3.2. O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α).....	10
1.4. O Gene Codificante do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α).....	16
1.5. Doenças Periodontais e o Paradigma Genético.....	17
1.5.1. Polimorfismos Genéticos Associados à Doença Periodontal.....	20
1.5.2. Polimorfismos Genéticos do TNF- α	21
2. PROPOSIÇÃO.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Seleção de Pacientes.....	25
3.2. Avaliação Clínica Periodontal.....	26
3.3. Análise Genética.....	27
3.3.1. Coleta da Amostra de Saliva e Extração de DNA Humano.....	27
3.3.2. Amplificação do Gene do TNF pela Técnica da PCR.....	28
3.3.3. Determinação do Genótipo do TNF- α (-308G/A).....	29
3.4. Análise Estatística.....	30

4. RESULTADOS.....	32
4.1. Dados Demográficos e Clínicos.....	32
4.2. Frequência dos Alelos e Genótipos do TNF- α (-308G/A).....	36
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8. ANEXOS	
Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	63
Anexo II: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	64
Anexo III: Anamnese.....	65
Anexo IV: Ficha Clínica Periodontal.....	67
Artigo submetido ao <i>Journal of Periodontal Research</i>	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Adenina

A/A – Genótipo homozigoto para alelo A

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AAP – *American Association of Periodontology* (Associação Americana de Periodontia)

BS – Biofilme supragengival

BP- Bolsa periodontal

C - Citocina

CD40 LG- Ligante CD40

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CNS/MS- Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde

CP – *Chronic periodontitis* (Periodontite crônica)

CRP – *C- Reactive protein* (Proteína C reativa)

DNA – *Desoxiribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Deoxinucleotídeo trifosfatado

E – Esmalte dentário

EJ – Epitélio juncional

Xg – Força de gravidade

G – Guanina

G/A - Genótipo heterozigoto para alelos G e A

G/G - Genótipo homozigoto para alelo G

GagP – *Generalized aggressive periodontitis* (Periodontite agressiva generalizada)

HLA- *Human Leukocyte Antigen*

HUCFF- Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL- 1-- Interleucina –1

IL-1 α - Interleucina –1 alfa

IL- 1 β – Interleucina 1- beta

IL- 6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-R- Receptor de interleucina 1

IL-2- Interleucina -2

IL-10- Interleucina -10

IL-12- Interleucina -12

IL- 4- Interleucina -4

IFN- γ - Interferon-gama

IFN- α - Interferon-alfa

IFN- β -Interferon-beta

JCE – Junção cimento-esmalte

kDa -Kilodaltons

LT- α - Linfotoxina –alfa

LPS - Lipopolissacarídeo

M – molar

MMP – *Matrix metalloproteinase* (Metaloproteinase da matriz)

mM – milimolar

mm – milímetro

μ M – micromolar

μ L – microlitro

ng – nanograma

Nco I- Nocardia coralina I

NK- Células *Natural Killer*

MHC- *Major histocompatibility complex* (Complexo de Histocompatibilidade principal)

NF κ B – *Nuclear factor Kappa B* (Fator Nuclear de Transcrição – kappa B)

NCI – Nível clínico de inserção

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para a Informação da Biotecnologia)

NGFR- *Nerve growth factor receptor* (Receptor do fator de crescimento do nervo)

OPG - *Osteoprotegerin ligand* (ligante da osteoprotegerina)

OR – *Odds ratio* (razão de chance)

pb – Pares de base

pH – Potencial de hidrogênio

PH- *periodontal health* (Saúde periodontal)

PAG - Grupo de indivíduos com periodontite agressiva generalizada

PC - Grupo de indivíduos com periodontite crônica

PCR – *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PMN- *Polymorphonuclear leucocyte* (Leucócitos polimorfonucleares)

PAF- *Platelet-Activating Factor* (Fator ativador de plaquetas)

PBS – Profundidade de bolsa à sondagem

RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Comprimento de fragmento de restrição de polimorfismo)

SAS – Sangramento à sondagem

SP – Grupo de indivíduos com saúde periodontal

SPPS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SUP – Supuração

SNP – *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

TACE- *TNF- α converting enzyme* (enzima de conversão do TNF- α)

Taq – Enzima Taq polimerase

TCI – Tecido conectivo inflamado

TNF- *Tumor necrosis factor* (Fator de Necrose Tumoral)

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

TNF- β - *Tumor necrosis factor beta* (Fator de Necrose Tumoral beta)

TNFR1-TNF- α – *TNF receptor I* (receptor tipo I para TNF- α)

TNFR2 -TNF- α – *TNF receptor II* (receptor tipo II para TNF- α)

TRAF1- *TNF Receptor-Associated Factor 1*(receptor associado ao fator 1)

TLR-4 – *Toll like receptor 4* (receptor *toll like 4*)

TSH- *Thyroid-stimulating hormone* (Hormônio estimulante da tireóide)

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

χ^2 - Teste do Qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos (média \pm DP) de uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

Tabela 2. Parâmetros clínicos periodontais (média \pm DP) de uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

Tabela 3. Frequência dos alelos do polimorfismo genético do TNF- α -308G/A em uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia do periodonto. (Painel A) Esquema de um periodonto saudável. (Painel B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. BP, bolsa periodontal; JCE, junção cimento-esmalte; TCI, tecido conectivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de Lindhe e Karring, 1999.

Figura 2. Classificação da doença periodontal. (Painel A) Esquema de um periodonto inflamado sem perda de inserção clínica e óssea alveolar (gingivite). (Painel B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com perda óssea alveolar e bolsa periodontal (periodontite). Adaptado de: Carranza *et al.*, 2003.

Figura 3. Complexos microbianos observados no biofilme subgingival. O esquema piramidal representa o “modelo de sucessão ecológica na colonização microbiana”. Fonte: Socransky e Haffajee, 2005.

Figura 4. Estrutura tridimensional do TNF- α . Resolução de 2.6 angstroms. Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1TNF> (acessado em 24/06/05).

Figura 5. Receptores do TNF- α , TNFRI e TNFRII. Efeitos principais a partir da ligação do TNF- α com seus receptores I e II. Adaptado de Janeway *et al.*, 2006.

Figura 6. Efeitos do TNF- α sobre a longevidade celular. Via de indução da apoptose (caspase dependente) versus via de indução do aumento da longevidade. Fonte: Janeway *et al.*, 2006.

Figura 7. Mapa genético representando o cromossomo 6 humano e identificando o *locus* do TNF. Fonte: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=TNF&direct=on (*acessado em 26/07/05*)

Figura 8. Esquema proposto para representar a inter-relação dos fatores de risco com a doença periodontal.

Figura 9: Esquema ilustrativo representando a seqüência: 1-coleta da amostra de saliva; 2- extração do DNA genômico; 3- amplificação do gene do TNF- α pela técnica da PCR, 4- visualização dos fragmentos de 107 pb em gel de agarose a 2%.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do gene TNF- α (-308). Coluna 1: Ladder 100 pb; Colunas 2, 3 e 5: Indivíduos homozigoto GG (87/20pb); Coluna 6: indivíduo heterozigoto AG (107/87/20pb); Colunas 4 e 7: Indivíduo homozigoto AA (107 pb)

Figura 11. Gráfico de barras da distribuição da freqüência dos genótipos do TNF- α - 308G/A em indivíduos com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC), e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG) selecionados de uma população brasileira. As barras representam a % de indivíduos com um genótipo específico em cada grupo. As cores representam os diferentes genótipos. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos ($\chi^2 = 2,547$, $p = 0,636$).

1- INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Periodontais

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias, de etiologia polimicrobiana e natureza multifatorial que resultam na destruição dos tecidos de proteção e suporte dos dentes, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento radicular e o osso alveolar (Haffajee e Socransky, 1994).

Do ponto de vista clínico, podem ser detectadas através da presença de inflamação gengival, formação de bolsa periodontal e reabsorção óssea alveolar (**Figura 1**) (Lindhe e Karring, 1999).

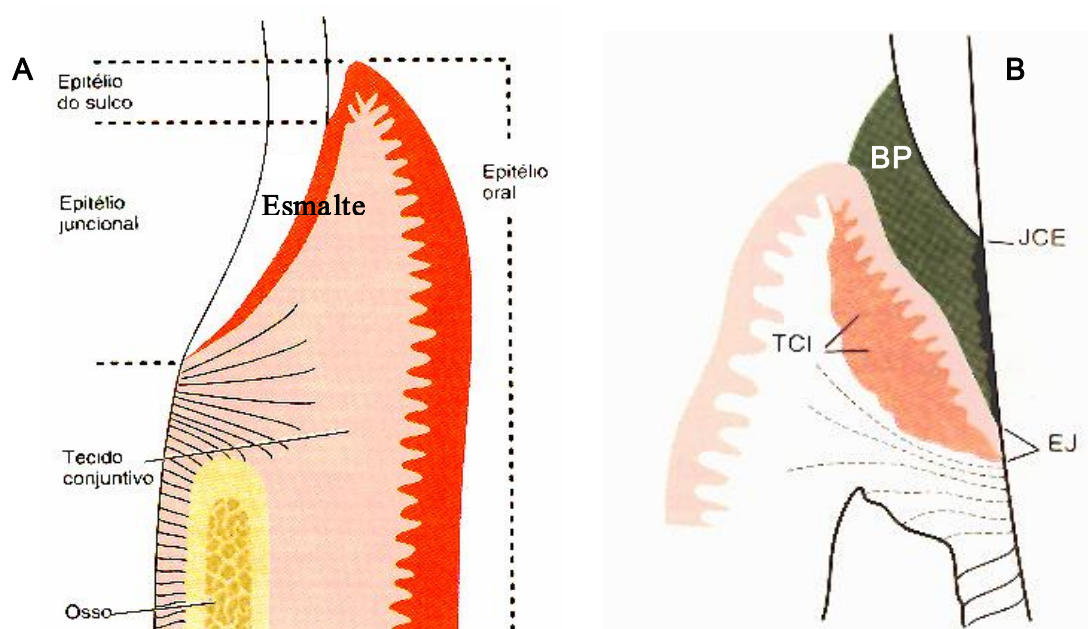


Figura 1. Anatomia do periodonto. (Painel A) Esquema de um periodonto saudável. (Painel B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. BP, bolsa periodontal; JCE, junção cemento-esmalte; TCI, tecido conectivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de Lindhe e Karring, (1999).

A doença periodontal é uma das doenças inflamatórias crônicas humanas mais freqüentes. Estima-se que nos EUA entre 5 a 30% da população adulta, na faixa etária de 25 a 75 anos, seja acometida pela doença periodontal. Além disso, ela representa uma das mais importantes causas de dor, desconforto e perda dos dentes em adultos (Rose *et al.* 2002).

De acordo com as características clínicas e os tipos de microorganismos envolvidos, a doença periodontal pode ser classificada basicamente em dois grupos principais: as gengivites e as periodontites (**Figura 2**) (AAP, 1999).

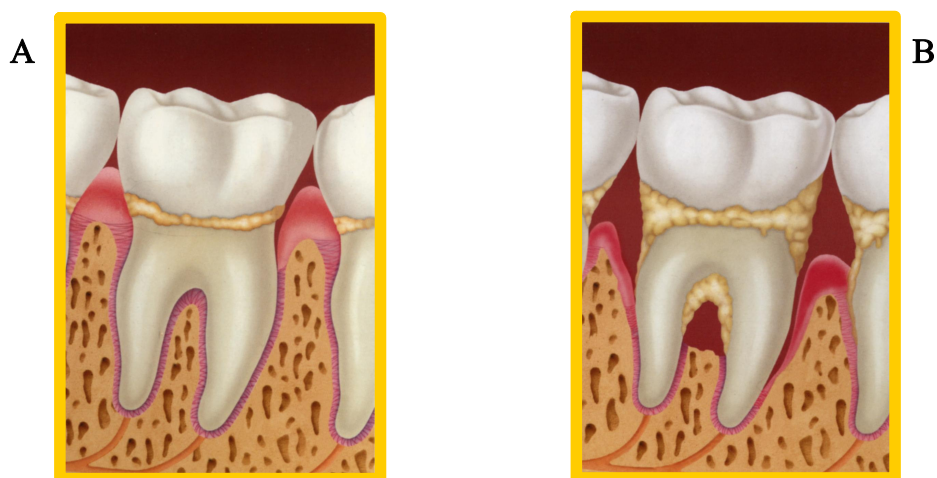


Figura 2. Classificação da doença periodontal. (Painel A) Esquema de um periodonto inflamado sem perda de inserção clínica e óssea alveolar (gengivite). (Painel B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com perda óssea alveolar e formação de bolsa periodontal (periodontite). Adaptado de: Carranza *et al.*, 2003.

As gengivites são definidas como inflamações gengivais, sem perda de inserção clínica e sem evidência radiográfica de perda óssea alveolar. As periodontites envolvem inflamação gengival com perda de inserção clínica e óssea em diferentes graus de destruição. As periodontites são atualmente classificadas em crônicas (leve, moderada ou grave) e agressivas (localizadas ou generalizadas)

(AAP,1999). A periodontite crônica é a forma mais comum de doença periodontal destrutiva. Caracteriza-se pela presença e acúmulo de cálculo e biofilme dental supra e/ou subgingival, e pela progressão lenta à moderada, com surtos de exacerbação. Acomete principalmente indivíduos com mais de 35 anos de idade. A quantidade de destruição periodontal está diretamente relacionada com a presença de fatores irritantes locais, tais como grau de higiene oral, quantidade de biofilme e cálculo dentais. Outros fatores intrínsecos do hospedeiro como a presença de doenças sistêmicas e o tabagismo podem favorecer o desenvolvimento da doença periodontal. A periodontite agressiva compreende um grupo raro dessas doenças e se caracteriza normalmente pela pouca quantidade de cálculo e biofilme dentais, progressão rápida, e o acometimento de indivíduos jovens, inclusive crianças. Além das características clínicas, outros parâmetros foram associados à periodontite agressiva. Dentre estes estão: o caráter de agregação familiar (Page *et al.*,1983), a presença predominante do patógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (Slots,1976), e defeitos na resposta imunológica, tais como a disfunção fagocítica de neutrófilos e disfunção de ativação de macrófagos (Oshrain *et al.*,1987).

O tratamento das doenças periodontais visa à eliminação ou supressão da microbiota patogênica através da remoção do biofilme e cálculo dentais pela raspagem e alisamento radicular, e educação do paciente quanto à higiene oral e controle do biofilme dental. Em alguns casos mais agressivos, a utilização conjunta de antibióticos e anti-sépticos tópicos e/ou sistêmicos com a terapia mecânica tem sido indicada (Van Winkelhoff *et al.*, 1989).

1.2. Etiologia Microbiana

O biofilme bacteriano que se forma na superfície dos dentes é o fator etiológico primário da doença periodontal. A composição da microbiota é complexa e

varia bastante entre os pacientes (Socransky e Haffajee, 2005). Dentre as mais de 700 espécies ou filotipos distintos atualmente encontrados na cavidade oral (Aas *et al.*, 2005; Paster *et al.*, 2006), apenas um pequeno subgrupo de microrganismos presentes no biofilme subgengival está fortemente associado com infecções do periodonto (Socransky *et al.*, 1998). Diversos trabalhos demonstraram que determinadas espécies subgengivais e/ou complexos de microrganismos orais estão intimamente associados com diferentes tipos de doenças periodontais e com um risco maior à progressão dessas infecções, bem como com condições de saúde periodontal (Newman e Socransky, 1977; Slots, 1979, 1986; Tanner, Socransky e Goodson, 1984; Haffajee *et al.*, 1988; Socransky, Haffajee e Dzink, 1988; Tanner *et al.*, 1998; Colombo *et al.*, 1998, 2002; Ezzo e Cutler, 2003).

Dentre as espécies mais comumente encontradas estão *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* (Slots, 1986; Slots *et al.*, 1986; Socransky e Haffajee, 1992; Haffajee e Socransky, 1994). Em 1998, Socransky e colaboradores descreveram cinco principais complexos microbianos observados no biofilme subgengival de pacientes com doença periodontal e de indivíduos com saúde periodontal (**Figura 3**).

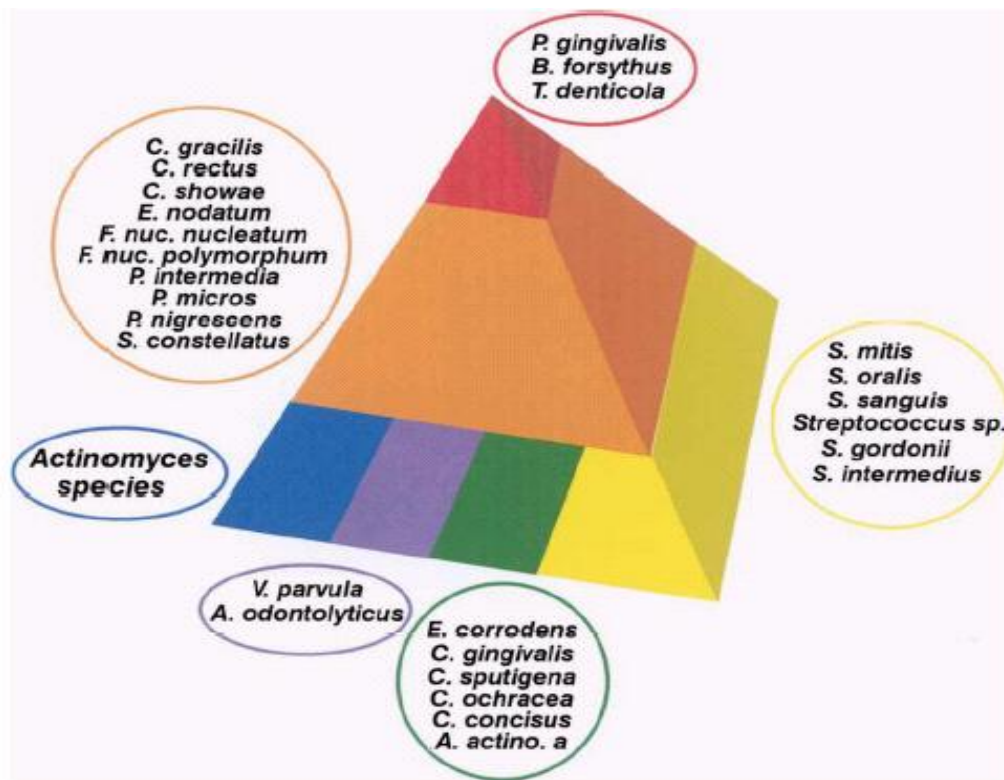


Figura 3. Complexos microbianos observados no biofilme subgengival. O esquema piramidal representa o “modelo de sucessão ecológica na colonização microbiana”.
Fonte: Socransky e Haffajee, 2005.

O denominado "**complexo vermelho**" consiste de três espécies, *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, fortemente relacionadas com sinais clínicos de doença, tais como bolsas periodontais profundas e sangramento à sondagem. Um outro grupo, "**complexo laranja**", inclui espécies de *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*. Os autores demonstraram que este grupo, também associado a sinais de doença, parece anteceder a colonização por espécies do **complexo vermelho**. O "**complexo amarelo**" é representado por espécies de *Streptococcus* e o "**complexo verde**" composto por três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*,

Eikenella corrodens e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo **a**. O quinto grupo, denominado de "**complexo roxo**", compreende as espécies *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus* (Socransky *et al.*, 1998). Mais recentemente, um grupo constituído por espécies de *Actinomyces* foi descrito como "**complexo azul**" (Socransky e Haffajee, 2005). As espécies constituintes de um mesmo complexo são fortemente associadas entre si. De modo semelhante, os complexos também mantêm inter-relações específicas. Estes aspectos permitem a concepção de um modelo de sucessão ecológica na colonização microbiana. A prevalência das espécies dentro dos complexos microbianos e os sucessivos níveis de colonização variam de acordo com o estado clínico periodontal dos indivíduos. Diferenças étnicas e/ou geográficas parecem também contribuir para essas variações (Haffajee *et al.*, 2004). Além disso, é possível que outras comunidades compostas por espécies ainda não identificadas ou não cultiváveis possam existir (Socransky e Haffajee, 2005; Paster *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos microbiológicos terem contribuído para o estabelecimento da etiologia microbiana infecciosa das doenças periodontais, inúmeros fatores, incluindo fatores locais, ambientais, comportamentais, imunológicos e genéticos associados ao hospedeiro podem atuar como moduladores do processo de patogenia dessas doenças (Page e Kornman, 1997). Essa natureza multifatorial das doenças periodontais torna seu diagnóstico, prevenção e tratamento um grande desafio para clínicos e pesquisadores. Assim, não só a microbiota patogênica específica de uma infecção periodontal deve ser determinada, mas também esses fatores associados ao hospedeiro, a fim de que se possa propiciar um diagnóstico e tratamento mais adequados e menos empíricos.

1.3. Imunidade, Inflamação e Doença Periodontal

A inflamação crônica do periodonto, como ocorre em diferentes tecidos, pode ser observada clinicamente através dos cinco sinais cardinais: rubor, calor, edema, dor e perda de função. O rubor e calor resultam do aumento de circulação sanguínea na área inflamada, podendo ser visualizado através do sangramento à sondagem do sulco gengival. O edema é a consequência do aumento local do líquido intersticial e a dor depende do acúmulo, no local, de substâncias que atuam sobre as terminações nervosas do ligamento periodontal. A perda da função se caracteriza, especialmente, pela destruição do osso alveolar, o que pode levar à mobilidade e a consequente perda do elemento dentário (Rose *et al.* 2002).

O processo inflamatório periodontal resulta da reação local dos tecidos à agressão causada pelos microorganismos patogênicos presentes no biofilme dental (Williams e Offenbacher, 2000). Componentes microbianos, como os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de espécies Gram negativas, ativam um amplo espectro de clones celulares do hospedeiro. Dentre estes, os fibroblastos, os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares (PMN) que passam a secretar inúmeras moléculas imunomoduladoras nos tecidos e fluidos gengivais. As citocinas constituem um grupo de interesse especial dentre as moléculas moduladoras da resposta imunoinflamatória (Page e Kornman, 1997; Hayday e Viney, 2000). As citocinas podem exercer seus efeitos através de vias distintas: ativando a própria célula que a produziu (efeito autócrino), células circunvizinhas (efeito parácrino) e atuando em outros órgãos, à distância, de forma sistêmica (efeito endócrino).

As citocinas ditas “pró-inflamatórias” são responsáveis pela iniciação e manutenção da resposta imune e inflamatória do hospedeiro a patógenos e agentes agressores diversos. Alguns exemplos destas citocinas são: Interleucina-1 (IL-1),

Interleucina -6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interferon-gama (IFN- γ) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) (Janeway *et al.*,2006).

1.3.1. Efeitos Inflamatórios do TNF- α e da IL-1

As citocinas TNF- α e IL-1 atuam como mediadores em doenças inflamatórias crônicas (Birkedal-Hansen, 1993) e representam as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de destruição dos tecidos periodontais (Wilton *et al.*, 1992; Page *et al.*, 1997; Graves *et al.*, 1998; Assuma *et al.*,1998; Delima *et al.*,2001; Shimada *et al.*, 2004). Estes mediadores têm sido encontrados em altos níveis no fluido gengival e nos tecidos gengivais de sítios com lesão periodontal (Graves *et al.*, 1998; Engebretson *et al.*, 1999). Eles são capazes de estimular a síntese de colagenase tecidual e apresentam um efeito sinérgico no processo de desmineralização óssea (Gemmell *et al.*, 1997).

Essas citocinas também atuam como mediadores nos processos de lesões celulares e tissulares, nas modificações de vias metabólicas e de mensageiros secundários. A proteína NF- κ B (*Nuclear factor Kappa B*), um regulador da atividade de transcrição do RNA mensageiro, parece ser o responsável pela ação sinérgica do TNF- α e IL-1. O fator NF- κ B é responsável pela iniciação da síntese de mais de 50 proteínas envolvidas na regulação da resposta imune e inflamatória. Esse fator constitui o alvo comum das vias de sinalização intracelular destas duas citocinas (Janssen-Heininger *et al.*, 2000).

O TNF- α e a IL-1 ativam as células endoteliais na indução da marginação e migração dos neutrófilos para a área inflamada. Essas citocinas também estimulam a atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos, a reabsorção óssea por osteoclastos, e a proliferação dos fibroblastos (Janeway *et al.*,2006).

Estudos de periodontite experimental, utilizando primatas, identificaram essas citocinas como potentes indutores da destruição e reabsorção óssea em diferentes formas de periodontite (Graves *et al.*, 1998). O uso simultâneo de bloqueadores solúveis do TNF- α /IL-1 injetados nas papilas interproximais de animais com periodontite, mostrou resultar, através de análises histomorfométricas, na redução da perda do tecido conjuntivo em 51% (Delima *et al.*, 2001), na diminuição de 80% no recrutamento de células inflamatórias e de 60% na perda óssea (Assuma *et al.*, 1998).

É interessante notar que o TNF- α e a IL-1, juntamente com outras citocinas, participam da indução da resposta da fase aguda no fígado (Moshage, 1997). Essa reação envolve uma alteração nas proteínas hepáticas secretadas no plasma sanguíneo, incluindo a diminuição dos níveis de algumas proteínas como albumina e transferrina e o aumento marcante de outras. As proteínas cuja síntese é induzida pelas citocinas são chamadas de “proteínas de fase aguda”. Entre estas, encontram-se a proteína ligadora de manose, a proteína amilóide sérica A e a proteína C-reativa (CRP) (Janeway *et al.*, 2006). Foi sugerido que a elevação dos níveis séricos de CRP seria um marcador de risco para a doença periodontal, pois indivíduos com doença periodontal apresentam níveis aumentados de CRP em comparação a controles saudáveis (Beck *et al.*, 1996; Noack *et al.*, 2001; D' Aiuto *et al.*, 2004a). Por outro lado, sabe-se que a CRP se encontra elevada em diversas outras situações clínicas, sendo atualmente considerada um importante marcador de risco para doenças cardiovasculares (Meurman *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004). Estes estados de manutenção da inflamação, espelhados no aumento da CRP, foram descritos na doença periodontal. Consequentemente, diversos investigadores sugeriram a hipótese de uma eventual associação entre doenças cardiovasculares e/ou outras condições sistêmicas e as infecções periodontais (Beck *et al.*, 1996; Noack *et al.*, 2001; Rose *et al.* 2002).

A considerável redundância funcional do TNF- α e da IL-1 é provavelmente protetora, visto que fornece vias alternativas para mobilizar as reações do hospedeiro em casos de emergência. Além disso, o TNF- α e a IL-1 regulam-se mutuamente, e suas capacidades sinérgicas permitem-lhes alcançar efeitos máximos em concentrações subótimas. Esta associação é econômica, resultando em uma enorme amplificação das reações do hospedeiro e aumentando a eficácia do sistema imune. As importantes diferenças fenotípicas observadas nos receptores e inúmeros outros ligantes do TNF- α e da IL-1 indicam que cada uma destas citocinas desempenha funções fisiopatológicas específicas (Janeway *et al.*,2006).

1.3.2. O Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF - α)

O TNF- α (**Figura 4**) foi descrito pela primeira vez pela sua atividade no soro de animais tratados com LPS, sendo capaz de induzir necrose hemorrágica em certos tumores. Este fenômeno ficou conhecido como reação de Shwartzman. O LPS induz a produção de TNF- α pelos macrófagos. Por sua vez, o TNF- α estimula as células endoteliais a produzirem prostaglandinas, IL-6 e uma proteína denominada fator pró-coagulante (ou fator tecidual III). O fator tecidual III tem a capacidade de iniciar a cascata da coagulação. Estes efeitos locais de coagulação e inflamação bloqueiam o suprimento sanguíneo e são responsáveis pela característica do TNF- α de causar infartos e necrose hemorrágica de tumores, propriedade que levou à sua descoberta e denominação (Carswell *et al.*,1975).

Posteriormente, Kawakami *et al.* (1982) identificaram um mediador circulante produzido por macrófagos de animais tratados com endotoxina capaz de suprimir a lipoproteína lipase e provocar a caquexia. Este mediador, uma proteína que foi nomeada caquectina, após ser purificado e ter seu DNA complementar clonado, mostrou-se idêntico ao TNF- α , previamente descrito. Portanto, a identificação e

caracterização do TNF- α ocorreram através de duas linhas de investigação diferentes, e os termos caquectina e TNF- α se referem ao mesmo composto.

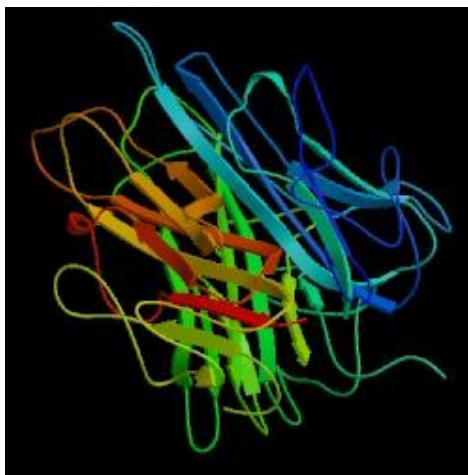


Figura 4. Estrutura tridimensional do TNF- α . Resolução de 2.6 angstroms. Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1TNF> (acessado em 24/06/05)

Por desempenhar um papel chave no sistema de defesa do hospedeiro e na vigilância imune, o TNF- α , membro da superfamília do TNF, tem sido foco de grande interesse e de um imenso número de publicações.

A superfamília TNF inclui 19 ligantes e 29 receptores. Dentre estes, por sua importância nos processos reguladores da diferenciação celular, imunidade e inflamação, destacam-se: a Linfotóxina-alfa (LT- α ou TNF- β), o receptor do fator de crescimento do nervo (NGFR), o ligante Fas, ligante da osteoprotegerina (OPG), o ligante CD40 (CD40 LG), *TNF Receptor-Associated Factor 1* (TRAF-1) (Aderka, 1996).

O TNF- α é produzido predominantemente por macrófagos ativados e em menores quantidades por outros tipos celulares, tais como monócitos, mastócitos, fibroblastos, células endoteliais, células “natural killer” (NK) e linfócitos (Dinarello, 1987).

O TNF- α é uma glicoproteína transmembranária, e constitui o protótipo das proteínas da “família TNF de citocinas”. Originalmente produzida como uma cadeia de 233 aminoácidos apresenta atributos de estrutura e função de proteína transmembranária tipo II. Esta forma da proteína agrupa-se em homotrímeros que, a partir da ação de uma enzima denominada TACE, *TNF- α converting enzyme*, sofre clivagem, com a geração de um fragmento de 157 aminoácidos, sua forma madura, e consequente liberação da membrana celular (Wallach *et al.*, 1991). Assim, o TNF- α atua basicamente de duas formas: como um ligante de membrana ou em sua forma solúvel (Li e Stashenko, 1993; Gravenstein e Borst, 1998). Nos processos biológicos dos quais participa, o TNF- α interage com seus receptores TNF- α receptor I (p55 TNF- α receptor, TNFRI) e TNF- α receptor II (p75 TNF- α receptor, TNFRII), de pesos moleculares 55 Kda e 75 kDa, respectivamente (Wallach *et al.*, 1991). Como outras citocinas, o TNF- α caracteriza-se por intensa ação pleiotrópica, sendo capaz de produzir uma grande variedade de efeitos pró-inflamatórios (**Figura 5**) (Bertolini *et al.*, 1986; Beutler e Cerami, 1989).

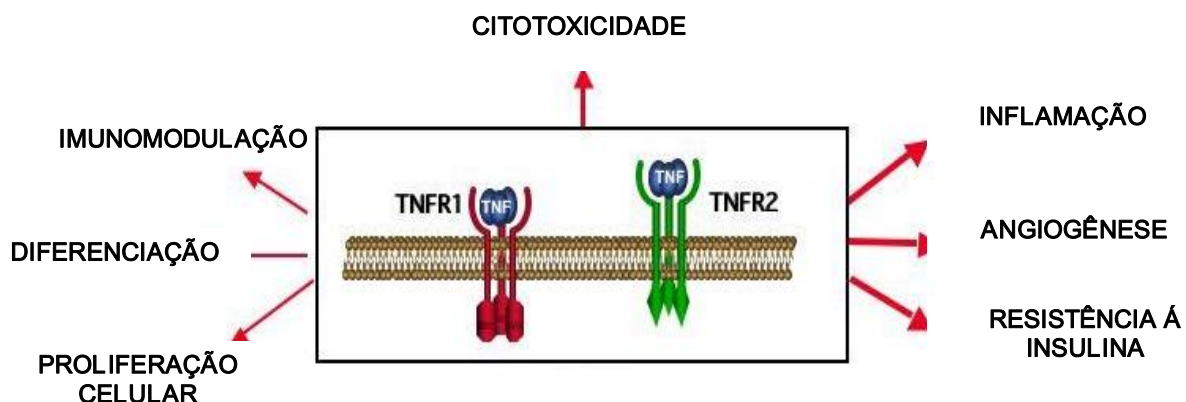


Figura 5. Receptores do TNF- α , TNFR1 e TNFR2. Efeitos principais a partir da ligação do TNF- α com seus receptores I e II. Adaptado de Janeway *et al.*, 2006.

A ligação do TNF- α aos seus receptores induz toxicidade, atividade antiviral, proliferação de fibroblastos, linfócitos T citotóxicos e timócitos, além da indução do fator de transcrição NF- κ B, eventos que normalmente resultam na ativação de caspases e, finalmente em apoptose “caspase dependente” (**Figura 6**) (Tartaglia e Goeddel, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993; Curtin e Cotter, 2002). O TNF- α também pode induzir outras células a liberar diferentes citocinas que agem como reforço ou como antagonistas de algumas de suas próprias ações (Nathan, 1987).

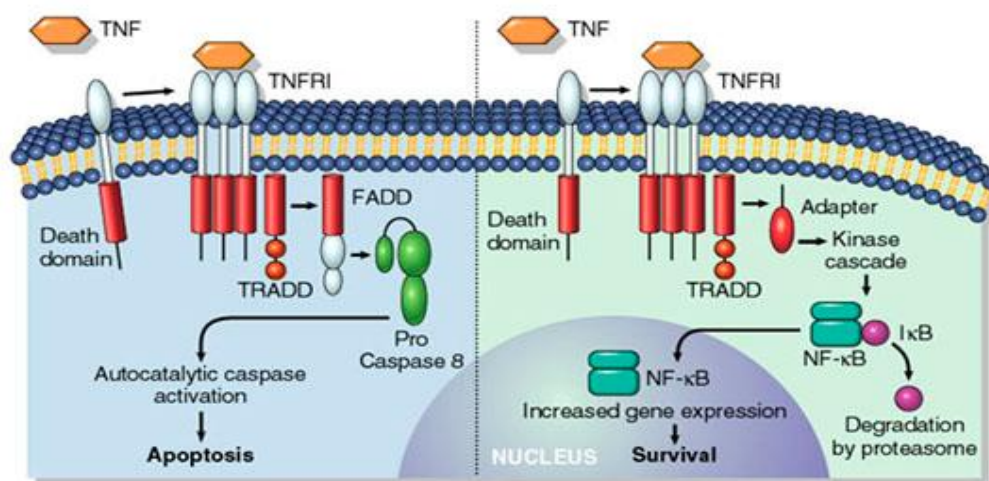


Figura 6. Efeitos do TNF- α sobre a longevidade celular. Via de indução da apoptose (caspase dependente) *versus* via de indução do aumento da longevidade. Fonte: Janeway *et al.*,2006.

Cada receptor de TNF- α possui um grande domínio de ligação extracelular, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda de transdução de sinais intracelulares (**Figura 6**). O TNF- α liga-se a estes receptores como trímero, com ligação simultânea de cada trímero a 2 ou 3 receptores do tipo I ou tipo II. Esta ligação cruzada dos receptores mediada por ligantes inicia a transdução de sinais, resultando numa cascata de fosforilação de proteínas e ativação gênica semelhante àquela produzida pela IL-1. Os dois tipos distintos de receptores do TNF- α induzem respostas específicas. O TNFR1 promove atividade citotóxica, induzindo a apoptose e o choque endotóxico, enquanto o TNFR2 promove a proliferação dos linfócitos T (Wallach *et al.*,1991; Janeway *et al.*,2006). Tanto o TNFR1 quanto o TNFR2 são expressos na maioria das linhagens celulares. Entretanto, o TNFR2 é primariamente expresso nas células do sistema imune, sobretudo linfócitos B e T, outras células de origem mielóide e células endoteliais (Janeway *et al.*,2006).

A sinalização do TNF- α para suas células-alvo é amplamente mediada pelo TNFR1, enquanto a principal função do TNFR2 é a apresentação do TNF- α para o TNFR1. A presença do receptor TNFR2 na superfície celular aumenta a taxa de associação do TNF- α ao TNFR1, podendo reverter a dessensibilização do TNFR1 ao TNF- α (Janeway *et al.*, 2006).

O balanço final dos efeitos do TNF- α pode ser considerado benéfico ou deletério para o hospedeiro, dependendo do *timing*, duração, localização e magnitude da sua liberação (Ver revisão por Verweij, 1999). Quando produzido em pequenas quantidades, exerce um grande número de atividades pleiotrópicas que estão relacionadas com o controle da proliferação e diferenciação celular, regulação da interação das citocinas, interação com outros mediadores da resposta ao estresse, incluindo prostaglandinas e corticosteróides, e mediação da resposta à injúria (Souba *et al.*, 1984).

Inúmeros fatores podem desencadear a produção do TNF- α . A apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígeno profissionais (macrófagos e células dendríticas) que estabelecem uma sinapse imunológica direta com os linfócitos T, a fagocitose de partículas pelos monócitos/macrófagos, e ainda a adesão celular a superfícies epiteliais ou endoteliais constituem potentes indutores da síntese de TNF- α . Componentes solúveis de bactérias como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas peptídeoglicanas são também capazes de induzir a produção de TNF- α pelos macrófagos. O LPS, presente abundantemente em bactérias Gram-negativas é um potente indutor da síntese do TNF- α (Cavaillon, 1994).

Em razão da importante participação do TNF- α nos processos imuno-inflamatórios, foi postulado por diferentes autores que o incremento da sua produção, estabilidade ou a diminuição de sua degradação poderia influenciar o

desenvolvimento e o curso de diferentes condições clínicas, inclusive da doença periodontal (Page *et al.*, 1997). De fato, estudos de indivíduos com doença periodontal identificaram concentrações elevadas de TNF- α no fluido e tecido gengival destes pacientes, sugerindo um papel desta citocina na destruição tecidual e reabsorção óssea do periodonto (Rossomando *et al.*, 1990; Hirose *et al.* 1997; Graves *et al.*, 1998).

A procura por alterações no gene do TNF- α , visto que variações individuais nas concentrações tissulares dessa citocina em diferentes circunstâncias clínicas podem ser atribuídas a alterações genéticas, identificou a existência de vários polimorfismos bi-alélicos (Takashiba *et al.*, 1993; Ver revisão por Verweij, 1999). Conseqüentemente, os polimorfismos do gene que codifica o TNF- α foram propostos como candidatos a biomarcadores de diversas doenças inflamatórias crônicas, incluindo as periodontites (Verweij, 1999; Qian *et al.*, 2002; Fassmann *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.* 2003; Rodriguez-Carreon *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007).

1.4. O Gene Codificante do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α)

O gene que codifica a citocina TNF- α localiza-se dentro da região Classe III do MHC, no braço menor do cromossomo 6, sendo sua posição codificada como 6p21.33. Sua disposição física dentro do cromossomo 6 está representada no esquema abaixo (**Figura 7**) (Wilson *et al.*, 1992).

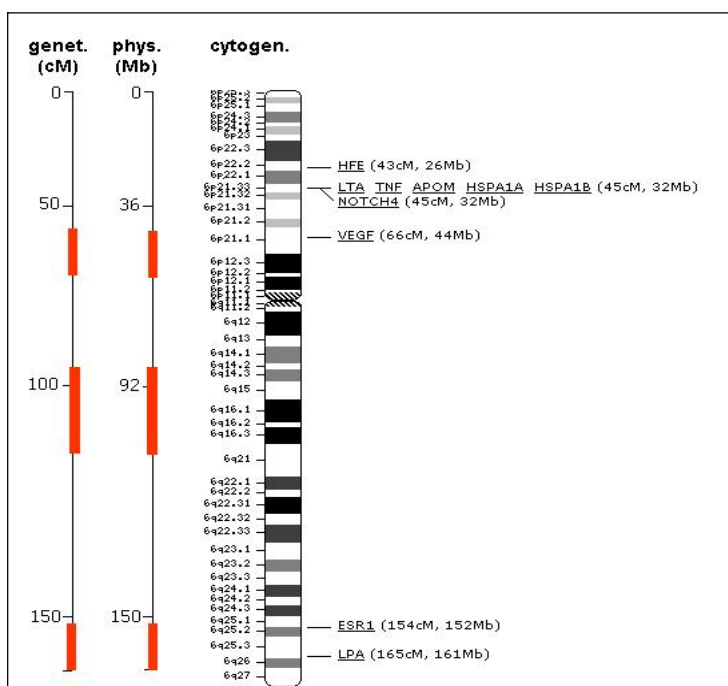


Figura 7. Mapa genético representando o cromossomo 6 humano e identificando o *locus* do TNF. Fonte: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=TNF&direct=on (acessado em 26/07/05)

1.5 Doenças Periodontais e o Paradigma Genético

Apesar de o biofilme dental ser considerado o fator etiológico primário da doença periodontal, fatores comportamentais, ambientais e genéticos podem atuar como fatores de risco (**Figura 8**) (Kornman e Löe, 1993). Esses fatores modificadores da doença periodontal podem comprometer a resposta do hospedeiro, interferir na reparação tecidual, na idade de estabelecimento da doença, no grau de destruição periodontal, na resposta ao tratamento periodontal, assim como na gravidade, progressão e frequência de recorrência da doença (Page e Kornman, 1997).

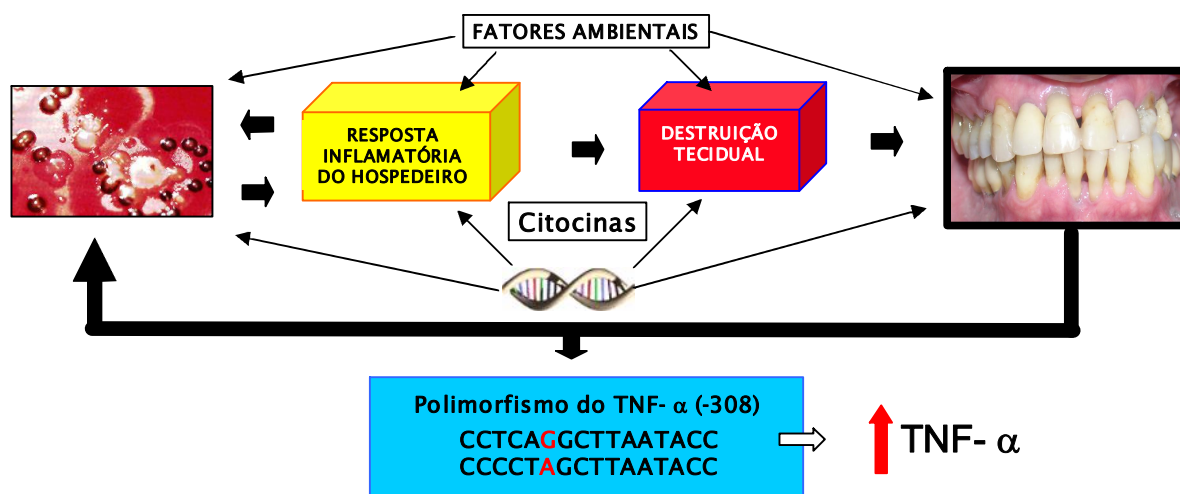


Figura 8. Esquema proposto para representar a inter-relação dos fatores de risco com a doença periodontal.

A elucidação da estrutura do genoma humano e o desenvolvimento da genômica funcional estão entre os maiores avanços científicos do século XX. A relevância da hereditariedade nos processos de saúde e doença é histórica e amplamente reconhecida. Entretanto, somente no decorrer do século XX as regras que definem os padrões de transmissão das doenças de base genética e os mecanismos pelos quais a informação genética é armazenada e transmitida foram elucidados. A aplicação destas informações na prática clínica foram majoritariamente focadas nas relativamente raras doenças monogênicas e defeitos cromossômicos específicos (Korf, 2004).

O seqüenciamento do genoma humano permitiu grande progresso no entendimento das doenças monogênicas e nas condições causadas por alterações num conjunto limitado de genes (Nardi, 2004). As doenças monogênicas também conhecidas como doenças de herança monogênica ou mendeliana, resultam de

alterações em um único gene. Essas alterações genéticas em um único *locus* no gene, na maioria dos casos, é o maior determinante para o fenótipo clínico da doença. As doenças monogênicas costumam seguir um padrão simples de probabilidade matemática, tomando como base o modelo clássico de herança Mendeliana (autossômicas dominantes, autossômicas recessivas ou ligadas ao cromossomo X) que busca permitir a previsão dos fenótipos resultantes. A prevalência das doenças mendelianas na população é rara (taxas inferiores a 0,1%), com exceção de algumas populações únicas isoladas (Kinane *et al.* 2005). Alguns exemplos de doenças tipicamente mendelianas incluem amelogênese imperfeita, síndrome de Crouzon, displasia cleidocraniana e síndrome de Papillon-Lefèvre (Kinane *et al.* 2005).

No entanto, as doenças mais comuns e de maior importância em termos de mortalidade e/ou morbidade (como exemplo: as doenças cardiovasculares; câncer; diabetes, assim como os perfis de resistência/susceptibilidade às doenças infecciosas e, dentre estas, a doença periodontal) não podem ser atribuídas a um único gene ou a um fator ambiental isoladamente. Essas doenças são determinadas por um grande número de interações gene-ambiente e gene-gene, sendo por isso, chamadas de multifatoriais ou complexas (Nardi, 2004). As doenças complexas diferem das doenças mendelianas em inúmeros e importantes aspectos. Talvez, o mais importante destes seja o fato de não seguirem o padrão Mendeliano de distribuição e transmissão familiar. Nas doenças complexas, os fatores ambientais são etiológicamente necessários para o seu estabelecimento, assim como a participação e interação de alelos em múltiplos *loci* diferentes. É por esta razão que essas doenças são também denominadas doenças poligênicas. Ao contrário das raras e bem definidas mutações responsáveis pelas doenças genéticas ditas “simples” ou de base monogênica”, as variantes alélicas importantes para o

desenvolvimento das doenças complexas, são bastantes comuns na população, com prevalência acima de 1% (Kinane *et al.*, 2005).

No estudo da influência do paradigma genético no desenvolvimento da doença periodontal, três estratégias foram utilizadas. A primeira abordagem busca associar doença periodontal com marcadores determinados geneticamente tais como grupos sanguíneos ou HLA. A segunda abordagem utiliza como estratégia a observação de gêmeos, e a terceira, mais recente, investiga o papel do polimorfismo em diferentes genes candidatos (Kinane *et al.*, 2005).

Dentre os diversos fatores genéticos que têm sido investigados como fatores de risco à doença periodontal, destacam-se genes polimórficos associados à resposta imunológica celular e humoral, em particular os genes que codificam algumas citocinas inflamatórias (Kinane e Hart, 2003; Kinane *et al.*, 2005). Neste contexto, o TNF- α , em especial o polimorfismo -308 G/A é alvo de grande interesse em inúmeros estudos.

1.5.1. Polimorfismos Genéticos Associados à Doença Periodontal

O polimorfismo genético é uma característica na qual um determinado gene pode exibir, em uma dada população, variações na sua seqüência de nucleotídeos dentro de um limite considerado “biologicamente normal”, ou seja, com freqüências superiores a 1%. Deve-se lembrar que, diferentemente do polimorfismo, a presença de mutação na seqüência de um determinado gene, caracteriza-se por sua raridade, devendo sua freqüência em uma determinada população ser menor que 1% (Nardi, 2004).

As observações de que o polimorfismo genético pode estar associado ou ser responsável funcionalmente pelas aparentes diferenças entre indivíduos nos aspectos qualitativo e quantitativo da resposta imune à agressão microbiana resultou

em grande interesse na identificação de polimorfismos genéticos potencialmente importantes nas periodontites (McDevitt *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000). Essas variações genéticas podem resultar em maior suscetibilidade ou resistência para doenças inflamatórias crônicas, tais como osteoporose, distúrbios temporomandibulares, neoplasias, doenças auto-imunes, e as doenças periodontais (Bailly *et al.*, 1993).

Polimorfismos em um único nucleotídeo, denominados SNPs, em genes codificadores da IL-1- α (-889), IL-1- β (-511) (Kornman *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 2006), Fc γ RIIa e Fc γ RIIIb (Kobayashi *et al.*, 1997, 2000, 2001; De Souza e Colombo, 2006), receptor da IL-1, IL-2, IL-6 (-174), IL-10, IL-12, TLR4 (-299, -399) (D'Aiuto *et al.*, 2004b) e TNF- α (-238) (D'Alfonso & Richiardi, 1994), (-308) (Kornman *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1999a; Shapira *et al.*, 2001; Trevisatto *et al.*, 2002; Craandijk *et al.*, 2002; Fassmann *et al.*, 2003; D'Aiuto *et al.*, 2004b) têm sido investigados como possíveis marcadores genéticos específicos e/ou fatores de risco associados à suscetibilidade para as doenças periodontais.

1.5.2. Polimorfismos Genéticos do TNF- α

Em 1992, Wilson e colaboradores descreveram a presença de um polimorfismo genético na posição -308 do promotor do gene do TNF- α . Este polimorfismo é representado pela troca da base guanina (G) por adenina (A) e cria dois alelos distintos. O alelo -308A tem sido associado com uma alta atividade na região promotora do gene, aumento na transcrição e produção de TNF- α (Pociot *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 1998; Abraham e Kroeger, 1999).

Wilson e colaboradores (1997) relataram que o polimorfismo do TNF- α (-308G/A) está associado com um aumento *in vitro* de 8 vezes na taxa de ativação transcricional e que o genótipo A/A está associado a uma maior expressão gênica e a uma produção elevada da proteína.

Recentemente, novos SNPs para o TNF- α (-1031, -863, -857) e variantes, foram observados em relativamente grande proporção de japoneses. Algumas variantes de alelos para esses SNPs parecem também estar relacionadas com altas concentrações de TNF- α (Higuchi *et al.*, 1998).

Polimorfismos genéticos no gene do TNF- α têm sido associados com várias infecções e doenças inflamatórias não-relacionadas, incluindo malária cerebral grave (Wilson *et al.*, 1994), leishmaniose mucocutânea (Cabrera *et al.*, 1995), septicemia meningocócica (Nadel *et al.*, 1996), e diversas desordens auto-imunes (por exemplo, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn e estomatite aftosa recorrente) (Gonzalez *et al.* 2003; Rodriguez-Carreon *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007).

Por analogia às situações clínicas acima mencionadas, seguindo esta mesma linha de investigação, diferentes pesquisadores investigaram a presença do polimorfismo do TNF- α (-308 G/A) em pacientes com diferentes condições periodontais (Kornman *et al.*, 1997; Galbraith *et al.*, 1998; Kinane *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2001; Craandijk *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002; Trevilatto *et al.*, 2002; Fassmann *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2003; Folwaczny *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005; Donati *et al.*, 2005; Babel *et al.*, 2006; Sakellari *et al.*, 2006). Apenas um destes estudos, realizado na China, demonstrou que esse polimorfismo, em particular o alelo A parece estar fortemente associado a uma maior susceptibilidade à doença periodontal (Lin *et al.*, 2003). Um fato intrigante foi que um segundo estudo, avaliando também a população chinesa, identificou justamente o

genótipo GG, o mais prevalente (cerca de 80%) em diferentes populações, como o genótipo associado à maior susceptibilidade à doença periodontal (Qian *et al.*, 2002). É possível que este efeito tenha sido decorrente da baixa frequência do alelo A em populações orientais (Endo *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003).

A frequência alélica de genes polimórficos parece variar bastante entre diferentes grupos étnicos (Kornman *et al.*, 1997; van der Pol e van de Winkel, 1998; Kinane e Hart, 2003), logo a aplicação de tais marcadores genéticos como ferramenta de diagnóstico e prognóstico das periodontites deve ser avaliada em diferentes populações. Assim, estudos de associação entre polimorfismos do TNF- α e doença periodontal em indivíduos brasileiros poderão contribuir para uma melhor compreensão da etiopatogenia e auxiliar no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico destas doenças na nossa população.

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Determinar a prevalência do polimorfismo genético do TNF- α (-308 G/A) em pacientes com diferentes formas de periodontite.
2. Correlacionar as diferentes combinações de genótipos do TNF- α (-308 G/A) com os parâmetros clínicos periodontais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Seleção de Pacientes:

Indivíduos que buscavam atendimento odontológico no Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFRJ no período de março de 2005 a agosto de 2006 foram convidados a participar da pesquisa. Cento e sessenta e três (n = 163) pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão e aceitaram fazer parte do estudo foram selecionados. Todos os participantes receberam informações por escrito e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS). O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ e aprovado sob o número 201/05 (Anexo II).

Os critérios para seleção dos indivíduos foram:

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Indivíduos na faixa etária de 18 - 75 anos;
- Presença de pelo menos 10 dentes naturais;
- Concordância em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Grávidas e lactantes;
- Indivíduos que fizeram uso de antiinflamatórios e/ou antimicrobianos nos últimos seis meses previamente à data do exame inicial periodontal;

- Indivíduos com condições sistêmicas tais como: Diabetes, Infecção pelo HIV/AIDS, e outras condições de imunossupressão que poderiam afetar a condição periodontal;
- Indivíduos que realizaram tratamento periodontal nos últimos seis meses antes do início do estudo.

Além do questionário médico e odontológico (Ficha de Anamnese - Anexo III), foram registrados os dados demográficos de cada paciente, incluindo a raça, a idade, o sexo e o tabagismo.

Em relação à raça, os pacientes foram definidos (por auto-relato) como: Brancos, Negros ou Outros. A história de tabagismo também foi registrada, e todos os indivíduos foram classificados como: nunca-fumantes, ex-fumantes e fumantes. Ex-fumantes foram definidos como aqueles que pararam de fumar nos últimos dois anos.

3.2. Avaliação Clínica Periodontal:

A avaliação periodontal foi realizada por uma periodontista previamente treinada e consistiu na mensuração da profundidade de bolsa à sondagem (PBS) e nível clínico de inserção (NCI) em milímetros, presença ou ausência de sangramento à sondagem (SAG), biofilme supragengival (BS) e de supuração (SUP) (Anexo IV). Essas medidas foram realizadas em seis sítios de cada dente, sendo três na face vestibular (mésio-vestibular, vestibular, e disto-vestibular) e três na face lingual ou palatina (mésio-lingual, lingual, e disto-lingual), em todos os dentes excluindo os terceiros molares. O instrumental utilizado para o exame periodontal foi um espelho bucal plano número cinco (Duflex-SSWhite^R) e uma sonda periodontal manual milimetrada, da Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA), com marcações a

cada milímetro totalizando 15 mm, e apresentando 0,35 mm de diâmetro. Cabe ressaltar que foi realizada a calibração da examinadora previamente à execução das medições clínicas periodontais (Ver em Análise Estatística). Radiografias periapicais completas também foram realizadas para todos os pacientes.

Após o exame clínico e radiográfico, os indivíduos selecionados foram categorizados em três grupos: Grupo controle ou com saúde periodontal (SP; n = 51), Grupo com periodontite crônica (PC; n = 74) e Grupo com periodontite agressiva generalizada (PAG; n = 38). O grupo SP incluiu indivíduos com PBS e/ou NCI < 4 mm, e que não apresentavam mais de 10% dos sítios com SAS. O Grupo PC apresentava pelo menos 10% dos dentes com PBS e/ou NCI \geq 5 mm, ou pelo menos 15% dos dentes com PBS e/ou NCI \geq 4 mm. Indivíduos no Grupo PAG apresentavam pelo menos 30% dos dentes com PBS e/ou NCI \geq 5 mm, ou 60% dos dentes com PBS e/ou NCI \geq 4 mm. Os pacientes do Grupo PAG se encontravam na faixa etária entre 30-39 anos.

Após o final da consulta odontológica e da coleta dos dados, os pacientes receberam orientação sobre higiene oral e informação sobre sua condição clínica. Em casos onde houve a detecção de necessidade de tratamento odontológico clínico, os pacientes foram encaminhados para tratamento na Faculdade de Odontologia da UFRJ.

3.3 Análise Genética

3.3.1. Coleta da Amostra de Saliva e Extração de DNA Humano:

A fonte de DNA humano utilizada para a análise genética deste estudo foi a saliva (Lench *et al.*, 1988; Laine *et al.*, 2000). Este método apresenta várias vantagens sobre a coleta de sangue periférico, tais como a fácil execução, o aspecto

não-invasivo e a obtenção de grandes quantidades de DNA humano (Trevilatto e Line, 2000). Os participantes permaneceram sem escovar os dentes ou ingerir alimentos 30 minutos antes da coleta das amostras. Em seguida, bochecharam com uma solução salina a 0,9% por 60 segundos e o material foi coletado em recipientes plásticos estéreis. O DNA genômico foi extraído das amostras através do QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os sobrenadantes contendo DNA foram coletados e estocados a -20°C.

3.3.2. Amplificação do Gene do TNF- α (-308 G/A) pela Técnica da PCR:

Para a análise genética, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em uma reação com volume de 50 μ l, contendo aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 5 μ l de solução tampão de PCR (100 mM Tris HCL, pH 8,3, 500 mM KCl) (Promega®, Maddison, WI, USA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dNTP), 1,25 unidades de *Taq* polimerase (Promega®), 0,2 pM de cada primer de oligonucleotídeo [TNF- α (-308 G/A)] (Bio-Synthesis®.Inc, TX, USA) e água bidestilada estéril (**Figura 9**).

As seqüências dos primers para amplificação do gene do TNF- α foram previamente descritas por Wilson *et al.* (1992): sense 5' – AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT – 3' e antisense 5' – TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG – 3'.

A amplificação foi realizada num Termociclador (Primus 25/96, MWG-Biotech-INC®, High Point, NC, EUA) e incluiu uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 38 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (57 °C por 1 min), e alongamento (72°C por 1 min). A amplificação dessa seqüência do gene TNF- α resultou em um amplicon de 107 pb (**Figura 9**). Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados

com 0,2 µg/ml de brometo de etídio, e em seguida visualizados em transiluminador ultravioleta (Syngene, Synoptics, Uniscience do Brasil, SP, BR).

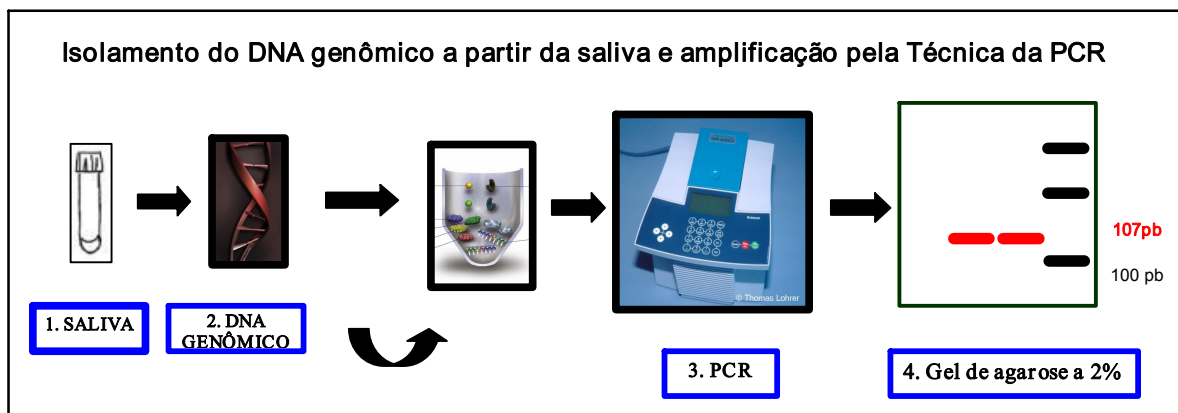


Figura 9. Esquema ilustrativo representando a seqüência: 1- coleta da amostra de saliva; 2- extração do DNA genômico; 3- amplificação do gene do TNF- α pela técnica da PCR, e a subsequente 4- visualização dos fragmentos de 107 pb em gel de agarose a 2%.

3.3.3. Determinação do Genótipo do TNF- α (-308G/A):

Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *Nco*I (Promega®), a 37°C por um mínimo de 20 horas. Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com 0,2 µg/ml de brometo de etídeo e visualizados através de um transiluminador ultravioleta. Indivíduos homozigotos para o alelo G, o qual é digerido pela *Nco*I, exibiam os fragmentos de 87 e 20 pb. No caso dos indivíduos homozigotos para o alelo A, que não é digerido pela enzima, somente o produto total de 107 pb estava presente. Os indivíduos heterozigotos exibiam os 3 fragmentos: 107, 87 e 20 pb (**Figura 10**) (Soga *et al.*, 2003).

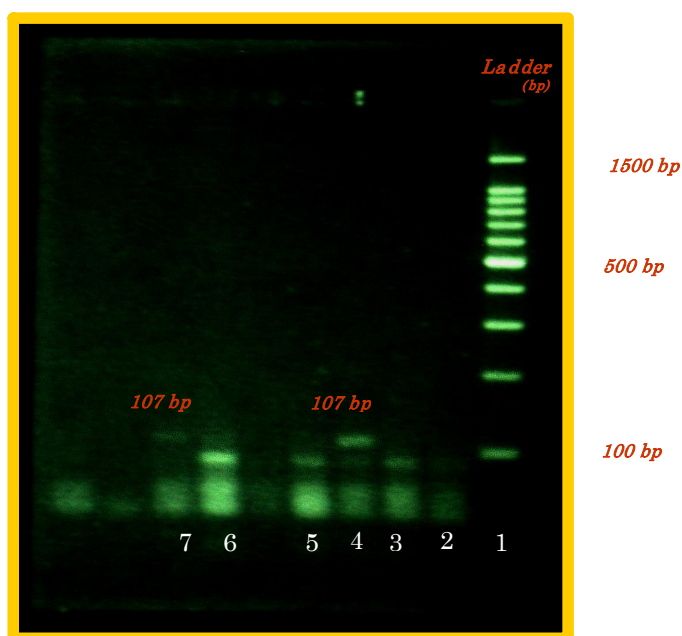


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do gene TNF- α (-308). Coluna 1: Ladder 100 pb; Colunas 2,3 e 5: Indivíduos homocigoto GG (87/20pb); Coluna 6: indivíduo heterocigoto AG (107/87/20pb); Colunas 4 e 7: Indivíduo homocigoto AA (107 pb)

3.4. Análise estatística

Todos os testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados utilizando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc[®]. Chicago, IL, USA), versão 13.0. Na calibragem da examinadora, a reprodutibilidade das mensurações das variáveis NCI e PBS realizadas em um subgrupo de pacientes foi analisada através do coeficiente de correlação intra-classe (Hill *et al.*, 2006). A análise das medidas repetidas demonstrou uma concordância

intra-examinador maior que 70% (coeficiente de correlação intra-classe para NCI = 0,72, e para PBS = 0,74).

Todos os parâmetros clínicos, epidemiológicos e genéticos foram computados em cada sítio e/ou indivíduos. Foram calculadas a média de idade e a frequência das diferentes categorias de raça, sexo e tabagismo em cada grupo estudado. A frequência de sítios com SAG, BS e SUP, assim como as médias da PBS e NCI foram calculadas para cada paciente, e posteriormente em cada um dos grupos clínicos. Os parâmetros PBS e NCI foram categorizados em níveis rasos (0 – 4 mm), médios (5 – 6 mm) e profundos (> 6 mm), e a média de suas frequências calculada em cada grupo. A frequência dos diferentes alelos e genótipos para o TNF- α foi computada em cada grupo. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e epidemiológicos entre os grupos foram analisadas através dos testes de Kruskal-Wallis e Qui-Quadrado. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar diferenças significantes entre pares de grupos. A distribuição da frequência dos alelos e genótipos do TNF- α – 308(G/A) foi examinada entre os grupos pelos testes do Qui-Quadrado e o teste exato de Fischer. Em seguida, foram determinados a razão de chance (OR) e o intervalo de confiança de 95%. Com o objetivo de ajustar a diferenças nos parâmetros clínicos e genéticos em relação à idade e à raça, os dados foram estratificados para essas 2 categorias e analisados através dos testes de Kruskal-Wallis e Qui-Quadrado. Quaisquer diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Dados Demográficos e Clínicos

Os dados demográficos dos três grupos clínicos estão sumarizados na tabela 1. Pacientes dos grupos SP e PAG eram significativamente mais jovens do que os indivíduos do grupo PC ($p < 0,01$; testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). Em relação à etnia, foi observada uma maior percentagem de indivíduos Brancos no grupo SP (81%), enquanto os grupos PC e PAG apresentaram uma maior proporção de negros (22% e 14%, respectivamente) e indivíduos de origem racial mista (19% e 50%, respectivamente) ($p = 0,002$; Teste do Qui-Quadrado). Em geral, a maioria dos pacientes era composta por indivíduos que nunca fumaram (78,5%) (dado não mostrado). Entretanto, uma alta frequência de indivíduos fumantes e ex-fumantes foi detectada no grupo com periodontite crônica ($p < 0,001$; Teste do Qui-Quadrado).

Tabela 1. Dados demográficos (média \pm DP) de uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

Parâmetros	SP (N = 51)	PC (N = 74)	PAG (N = 38)
Idade * †	30 \pm 10	48 \pm 12	31 \pm 6
Homens (%)	31	41	18
Raça (%) †			
Branco	81	59	36
Negro	8	22	14
Outros	11	19	50
Fumo (%) †			
Não-fumantes	88	61	100
Ex-fumantes	8	27	0
Fumantes	4	12	0

* Referente ao $p < 0,01$; testes de Kruskal-Wallis e † Mann-Whitney; † referente ao $p < 0,01$; teste do χ^2 .

A Tabela 2 apresenta os parâmetros clínicos periodontais da população de estudo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram observadas para todos os parâmetros ($p < 0,01$; teste de Kruskal-Wallis). Quando pares de grupos foram comparados, não foram encontradas diferenças significantes para o número de dentes perdidos, SAS, BS, SUP e NIC > 6 mm entre os grupos PC e

PAG ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). Com o objetivo de controlar as variáveis fumo e raça, foram realizadas comparações entre os grupos para os parâmetros clínicos somente em indivíduos não-fumantes e Brancos. Mesmo assim, as diferenças entre os grupos permaneceram estatisticamente significativas para todos os parâmetros clínicos ($p < 0,001$; teste de Kruskal-Wallis; dados não mostrados).

Tabela 2. Parâmetros clínicos periodontais (média \pm DP) de uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

	SP	PC	PAG
<i>Parâmetros</i>	(N = 51)	(N = 74)	(N = 38)
N. de dentes perdidos ^{*†}	2,3 \pm 3,6	5,5 \pm 4,8	4,4 \pm 4,7
PBS (mm) ^{*†‡}	1,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,9	3,3 \pm 0,9
NCI (mm) ^{*†}	1,8 \pm 0,3	3,6 \pm 1,5	3,8 \pm 1,1
<i>% sítios com:</i>			
SAS ^{*†}	4,3 \pm 4,3	41,2 \pm 26,6	48,6 \pm 28,4
BS ^{*†}	13,4 \pm 16	46,3 \pm 30	37,4 \pm 29
SUP ^{*†}	0	0,6 \pm 1,6	2,3 \pm 4,9
PBS \leq 4mm ^{*†‡}	100	88 \pm 16	75 \pm 20,3
PBS 5-6mm ^{*†‡}	0	8,5 \pm 9,4	19 \pm 14
PBS > 6mm ^{*†‡}	0	3,5 \pm 8,5	6 \pm 8,5
NCI \leq 4mm ^{*†‡}	100	73 \pm 27	66 \pm 24
NCI 5-6mm ^{*†‡}	0	16 \pm 15	24 \pm 14
NCI > 6mm ^{*†}	0	11 \pm 17	10 \pm 14

* Referente ao $p < 0,01$; teste de Kruskal-Wallis; † referente ao $p < 0,01$; teste de Mann-Whitney entre SP e PC, ou SP e PAG); ‡ referente ao $p < 0,01$; teste de Mann-Whitney entre PC e PAG; PBS = profundidade de bolsa à sondagem; NCI = nível clínico de inserção; SAS= sangramento à sondagem; BS = biofilme supragengival; SUP = supuração.

4.2. Freqüência dos Alelos e Genótipos do TNF- α (-308G/A)

A distribuição dos alelos do TNF- α (-308G/A) entre os três grupos clínicos está apresentada na Tabela 3. Não foi encontrada diferença significativa entre a distribuição observada e esperada para os genótipos do grupo controle. Logo, considerou-se que a distribuição dos alelos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Deng *et al.*, 2001). Uma alta prevalência do alelo G foi observada em todos os grupos (SP = 72,5%, PC = 81%, PAG = 81,6%). Da mesma forma, a freqüência dos indivíduos que carregavam pelo menos uma cópia do alelo -308G foi maior do que a dos indivíduos que carregavam o alelo -308A. Entretanto, não foram encontradas diferenças significantes na distribuição desses alelos entre os grupos ($\chi^2 = 2,610$, $p > 0,05$ para freqüência dos alelos; $\chi^2 = 1,01$, $p = 0,604$ para indivíduos G+ e $\chi^2 = 2,12$, $p = 0,345$ para indivíduos A+). Quando indivíduos do grupo controle foram comparados com os pacientes dos grupos PC e PAG separadamente, não foram observadas diferenças significativas para a freqüência dos alelos (SP *vs.* PC – OR = 0,616, 95 % IC = 0,34-1,12; SP *vs.* PAG – OR = 0,596, 95 % IC = 0,29-1,23). Além disso, não houve diferenças significantes na distribuição dos alelos quando somente indivíduos não-fumantes e brancos foram incluídos nas análises (dados não apresentados).

Tabela 3. Frequência dos alelos do polimorfismo genético do TNF- α -308G/A em uma amostra de indivíduos da população brasileira com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG).

	SP	PC	PAG	SP vs. PC [‡]	SP vs. PAG [‡]
	N = 51	N = 74	N = 38	OR (95%IC)	OR (95%IC)
<i>Frequência</i>					
<i>alélica^{* ‡}</i>					
TNF- α -308G	72,5 %	81 %	81,6 %		
TNF- α -308A	27,5 %	19 %	18,4 %	0,616 (0,34–1,12)	0,596 (0,29-1,23)
<i>Positividade</i>					
<i>para o alelo[†]</i>					
G+ **	88,4 %	92,3 %	94,4 %	1,5 (0,43-5,82)	4,5 (0,40-12,3)
A+ ††	44,2 %	31 %	33,3 %	0,59 (0,25-1,25)	0,69 (0,25-1,58)

* Esses valores representam a % em que os alelos aparecem do total de vezes ($2n$) que eles podem ocorrer (SP = 102; PC = 148; PAG = 76); [‡] $\chi^2 = 2,610$, $p > 0,05$; [†] Porcentagem de indivíduos que carregam pelo menos uma cópia de cada alelo; ** $\chi^2 = 1,01$, $p = 0,604$; †† $\chi^2 = 2,12$, $p = 0,345$; ^{‡‡} Sem significância (teste exato de Fisher).

As frequências dos genótipos G/G, G/A e A/A do TNF- α estão demonstradas na Figura 11. A distribuição dos 3 genótipos foi similar entre os pacientes pertencentes aos grupos PS, PC, PAG, e não foram observadas diferenças significativas entre os mesmos ($\chi^2 = 2,547$, $p = 0,636$).

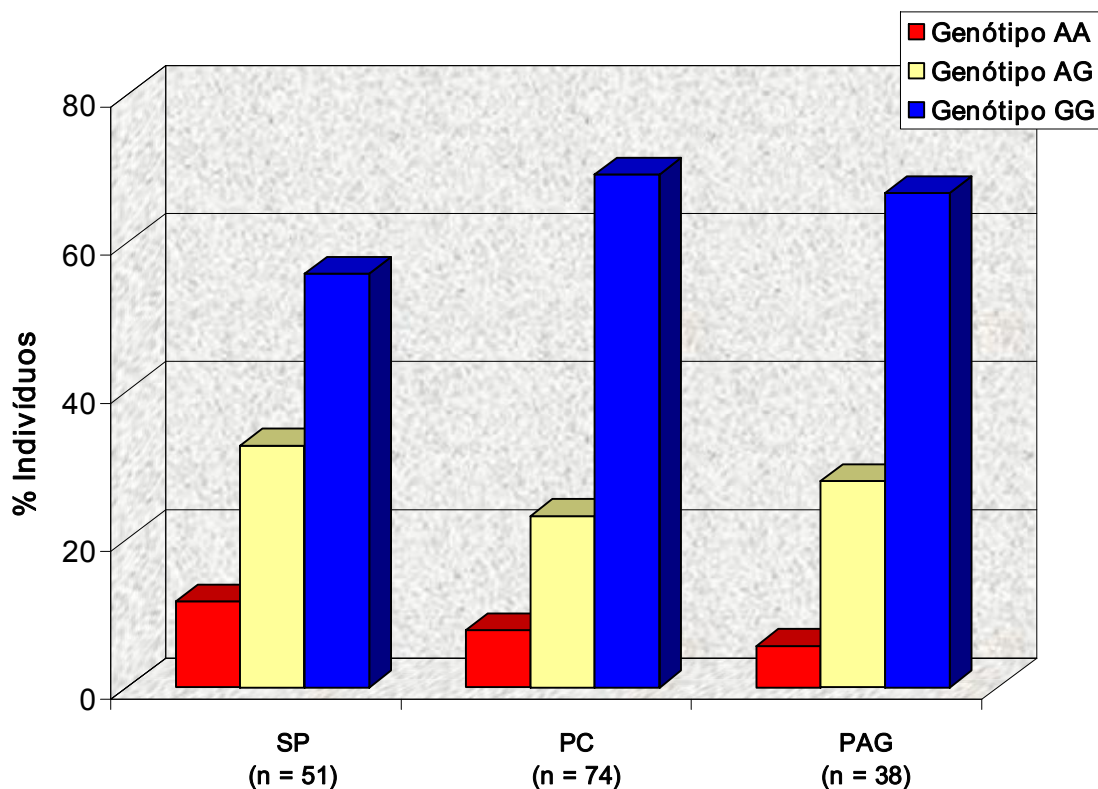


Figura 11. Gráfico de barras da distribuição da frequência dos genótipos do TNF- α -308G/A em indivíduos com Saúde Periodontal (SP), Periodontite Crônica (PC), e Periodontite Agressiva Generalizada (PAG) selecionados de uma população brasileira. As barras representam a % de indivíduos com um genótipo específico em cada grupo. As cores representam os diferentes genótipos. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos ($\chi^2 = 2,547$, $p = 0,636$).

5. DISCUSSÃO

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias, de natureza polimicrobiana e multifatorial (Page e Kornman, 1997; Socransky e Haffajee, 2005). Embora o agente etiológico primário para a iniciação da doença periodontal seja o biofilme patogênico, recentes evidências indicam que os fatores genéticos são também importantes determinantes para a sua susceptibilidade e progressão (Kinane e Hart, 2003; Kinane *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2005; Takashiba e Nairushi, 2006). Assim, as doenças periodontais fazem parte de um grupo de doenças “complexas” que, além de estarem relacionadas a fatores de risco ambientais e comportamentais, também possuem um caráter poligênico (Tabor *et al.*, 2002; Kinane *et al.*, 2005). Contudo, ainda não foram identificados quais os genes que poderiam estar envolvidos nos processos fisiopatológicos destas doenças (Tabor *et al.*, 2002). Na busca de possíveis marcadores genéticos para a doença periodontal, os pesquisadores vêm dando, nos últimos anos, considerável atenção aos genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias (Kinane *et al.* 2005., Loos, 2005). O TNF- α é um dos mais importantes mediadores envolvidos no processo imuno-inflamatório e é considerada uma citocina crítica na resposta do hospedeiro a infecções. A procura por alterações genéticas no gene do TNF- α mostrou a existência de vários polimorfismos bi-alélicos (Ver revisão por Verweij, 1999). Entre esses polimorfismos, o mais estudado ocorre na região promotora do gene do TNF- α e representa uma transição de G para A na posição -308. O alelo -308A tem sido associado com uma alta atividade na região promotora do gene, aumento na transcrição e produção de TNF- α (Pociot *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 1998; Abraham e Kroeger, 1999). Polimorfismos no gene do TNF- α têm sido associados com várias infecções e doenças inflamatórias não-relacionadas

(McGuire *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Cabrera *et al.*, 1995; Nadel *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2003; Rodriguez-Carreón *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007). Além disso, o polimorfismo genético do TNF- α (-308 G/A) tem sido sugerido ser um marcador genético em potencial para a periodontite (Qian *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003). Entretanto, a frequência alélica desse gene polimórfico pode variar bastante entre grupos étnicos distintos. Logo, a aplicação desses marcadores genéticos para uso como ferramenta de diagnóstico e prognóstico da periodontite deve ser examinada em diferentes populações (Kinane *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2005).

No presente estudo, nós investigamos a frequência dos alelos e genótipos do TNF- α (-308 G/A) em uma amostra de brasileiros com diferentes formas de periodontite. Nossos resultados mostraram que a taxa de carregamento do alelo 'raro' -308A era levemente maior no grupo controle (27,5%) comparado aos grupos com doença (PC = 19% e PAG = 18,4%). No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Tabela 3). A frequência do alelo -308A apresentou uma ampla variação (3 - 32%) na maioria dos estudos conduzidos em diferentes populações (Kornman *et al.*, 1997; Galbraith *et al.*, 1998, 1999; Kinane *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2001; Fassmann *et al.*, 2003; Folwaczny *et al.*, 2004; Donati *et al.*, 2005; Sakellari *et al.*, 2006). Em particular, é interessante notar que a prevalência deste SNP em indivíduos japoneses (2 - 3%) está bastante diminuída (Endo *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003).

Em relação aos genótipos do TNF- α (-308 G/A), uma distribuição similar dos genótipos G/G, G/A e A/A foi observada em todos os grupos do presente estudo (Fig. 1). Usualmente, o alelo -308A do TNF- α é considerado o marcador de susceptibilidade para a doença devido ao seu efeito supra-regulatório na produção desta citocina. Por outro lado, Folwaczny *et al.* (2004) e Sakellari *et al.* (2006) reportaram uma baixa frequência para o genótipo A/A em pacientes periodontais (2 -

4%), enquanto esse genótipo não foi detectado nos pacientes com saúde periodontal. Outros estudos não detectaram o genótipo A/A em pacientes com periodontite, nem em indivíduos do grupo controle (Galbraith *et al.*, 1999; Shapira *et al.*, 2001; Donati *et al.*, 2005). Ao contrário desses achados, nossos dados mostraram que o genótipo A/A tendeu a ser mais prevalente no grupo controle (11,6%) em relação aos grupos PC (7,7%) e PAG (5,6%), contudo essas diferenças não foram estatisticamente significativas. No Brasil, apenas dois estudos correlacionando o polimorfismo genético do TNF- α com a condição periodontal foram relatados na literatura internacional. Trevilatto e colaboradores (2002) avaliaram diversos polimorfismos genéticos em uma família de 14 indivíduos com periodontite agressiva. Os autores observaram uma prevalência de 100% para o genótipo G/G do TNF- α -308 nesses indivíduos. Nenhum dos marcadores genéticos avaliados (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-RN) foi relevante como indicador de suscetibilidade à doença nesta família. Um outro estudo mais recente examinou a associação entre o polimorfismo TNF- α (-308G/A) e a perda precoce de implantes dentários (Campos *et al.*, 2004). Estes autores também não encontraram nenhuma associação significativa entre esse polimorfismo e o desfecho clínico estudado.

Apesar dos achados controversos, os nossos resultados estão de acordo com a maioria dos estudos reportados na literatura, os quais não conseguiram mostrar uma associação entre o polimorfismo do TNF- α (-308 G/A) e a susceptibilidade e/ou gravidade da doença periodontal (Kornman *et al.*, 1997; Galbraith *et al.*, 1998; Kinane *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2001; Craandijk *et al.*, 2002; Trevilatto *et al.*, 2002; Fassmann *et al.*, 2003; Soga *et al.*, 2003; Folwaczny *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005; Donati *et al.*, 2005; Babel *et al.*, 2006; Sakellari *et al.*, 2006).

Poucos estudos reportaram alguma correlação entre o polimorfismo do gene do TNF- α (-308 G/A) e a doença periodontal. Numa população composta por

indivíduos caucasianos, Galbraith *et al.* (1999) encontraram uma alta frequência do genótipo TNF- α -308 G/G em indivíduos com periodontite avançada (95%) em comparação com os pacientes que apresentavam gengivite (65%). Entretanto, esses achados devem ser interpretados com cautela, pois não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na prevalência do genótipo G/G entre os pacientes periodontais e os controles (75,6%).

Na população chinesa, Lin *et al.* (2003) mostraram uma associação significativa entre o alelo TNF- α -308A com periodontite (moderada a avançada). Em contrapartida, Qian *e cols.* (2002) encontraram uma alta prevalência do genótipo G/G nos pacientes com periodontite grave em relação aos controles.

Embora o polimorfismo genético do TNF- α mais estudado seja a transição de G para A no *locus* -308 da região promotora, outros SNPs do TNF- α têm sido investigados (Galbraith *et al.*, 1998; Kinane *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003). Somente Soga *et al.* (2003) reportaram uma associação significativa entre TNF- α -1031,-863 e -857 SNPs e periodontite avançada em indivíduos japoneses.

Os dados inconsistentes reportados na literatura podem ser atribuídos a vários fatores relacionados tanto aos critérios de definição de doença, como à heterogeneidade das populações estudadas (Kinane *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2005). Fatores de risco para a doença periodontal certamente desempenham um papel importante na patogênese da doença e devem ser sempre considerados nesses estudos. Embora, diferenças em relação à idade e tabagismo tenham sido observadas entre os grupos de indivíduos participantes deste estudo, o padrão de distribuição da frequência dos alelos e genótipos não se alterou quando os dados foram analisados separadamente em subgrupos de pacientes, ou seja, somente indivíduos brancos e não-fumantes (dados não apresentados).

Em relação à raça, os indivíduos do presente estudo foram solicitados a se auto-definirem como brancos, negros ou outras raças. Observamos uma distribuição

entre os grupos similar aos dados do censo demográfico realizado em 2003 na cidade do Rio de Janeiro, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Entretanto, deve-se enfatizar que essa avaliação pode ser bastante subjetiva, pois muitas vezes ela se baseia na cor e não no *background* genético do indivíduo. Segundo Parra *et al.*, (2003), nenhum critério para classificação de raças em nosso país parece confiável devido à sobreposição de genótipos resultante da alta miscigenação da população brasileira. Apesar disso, os achados clínicos e genéticos foram similares quando os dados foram analisados somente para os participantes definidos como brancos. Além da alta heterogeneidade da população estudada, o tamanho da amostra foi pequeno, logo, é necessário que se tenha cautela na interpretação dos dados. A falta de associação entre os diferentes genótipos e as condições clínicas pode ser devido ao tamanho pequeno da amostra, em particular para alelos de baixa prevalência. No entanto, nós observamos uma alta taxa de carregamento do alelo “raro” -308A em comparação com outros investigadores (Shapira *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003; Folwaczny *et al.*, 2004; Donati *et al.*, 2005; Sakellari *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante que pode influenciar os resultados de estudos sobre etiopatogenia da doença periodontal é a falta de consenso definitivo quanto à classificação da doença. Esse viés, de caráter metodológico, também pode contribuir para as diferenças encontradas entre os estudos genéticos. É claramente conhecida a existência da sobreposição de fenótipos clínicos entre as diferentes formas de periodontite, mesmo sem levar em consideração os critérios de diagnóstico utilizados. Embora em nosso estudo nós tenhamos utilizado critérios bem definidos para se diferenciar os grupos clínicos, principalmente os grupos PC e PAG, a comparação dos nossos achados com os dados relatados por outros pesquisadores é bastante difícil, pois basicamente cada investigador utiliza um sistema único e distinto de classificação da doença.

A base genética para as doenças complexas, como a periodontite, pode estar relacionada não somente com uma única variante genética, mas pode, talvez, sofrer a influência de múltiplas variantes em múltiplos genes. Estes fatores genéticos múltiplos atuam em conjunto com os fatores ambientais, aumentando ou diminuindo a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (Kinane *et al.*, 2005). Outra razão que torna ainda mais complexa a análise dos polimorfismos genéticos do TNF- α em associação à doença periodontal, é o fato do gene do TNF- α estar localizado na região da classe III do MHC. Esta região exibe um alto grau de *linkage disequilibrium* com outros polimorfismos em genes próximos, envolvidos na resposta inflamatória (Wilson *et al.*, 1993; Price *et al.*, 1999a,b; Ozaki *et al.*, 2002; Waterer e Wunderink, 2003). Os genes da Linfotóxina- α (LT- α), Linfotóxina- β (LT- β), HLA A, B, C, DR, DP e DQ estão entre esses principais genes (Price *et al.*, 1999a,b). Como exemplo, Fassmann *et al.* (2003) sugeriram que o genótipo composto do TNF- α (-308 G/A) e LT- α (+ 252 G/A) pode influenciar a susceptibilidade à periodontite crônica. Logo, a análise de um polimorfismo genético de nucleotídeo único parece ser insuficiente como ferramenta de diagnóstico e/ou prognóstico da doença periodontal. Sendo assim, combinações de diferentes genótipos ou haplótipos para possíveis interações gene-gene e gene-ambiente devem ser avaliadas futuramente nesses estudos.

A natureza multifatorial das infecções periodontais e a complexidade genética envolvida conferem um caráter de particular dificuldade aos estudos de etiopatogenia e à busca de marcadores biológicos para essas doenças. A fim de minimizar essas dificuldades, estudos futuros devem considerar os aspectos metodológicos, tais como o emprego de novas tecnologias laboratoriais, o desenvolvimento de critérios universais bem definidos de classificação de doença, a composição da população, o tamanho amostral e acompanhamento longitudinal da população alvo para o melhor esclarecimento do papel dos polimorfismos genéticos

como fatores de risco e como ferramentas de diagnóstico/prognóstico da doença periodontal.

Dentro das limitações metodológicas do presente estudo, e de acordo com outros dados reportados na literatura, o polimorfismo do TNF- α (-308 G/A) não está associado com aumento da susceptibilidade e/ou gravidade da doença periodontal nesta amostra particular da população brasileira.

6. CONCLUSÕES

1. O alelo -308G do gene do TNF- α foi o mais prevalente em todos os grupos clínicos estudados, enquanto o alelo -308A mostrou uma tendência a predominar em indivíduos do grupo controle.
2. Uma distribuição similar na frequência dos genótipos G/G, G/A e A/A foi observada nos grupos clínicos. Não foi observada nenhuma correlação significativa entre o polimorfismo do TNF- α (-308 G/A) com a condição periodontal nesta população estudada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43, 5721-5732.
2. Abraham, L. J. & Kroeger, K. M. (1999). Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol*, 66, 562-566.
3. Aderka, D. (1996). The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7, 231-240.
4. Annals of Periodontology (AAP) International Woorkshop for a classification of periodontal diseases and conditions, 1999, 4:32-378
5. Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*, 160, 403-409.
6. Babel, N., Cherepnev, G., Babel, D., Tropmann, A., Hammer, M., Volk, H. D. & Reinke, P. (2006). Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 77, 1978-1983.
7. Bailly, S., di Giovine, F. S., Blakemore, A. I. & Duff, G. W. (1993). Genetic polymorphism of human interleukin-1 alpha. *Eur J Immunol*, 23, 1240-1245.
8. Beck, J., Garcia, R., Heiss, G., Vokonas, P. S. & Offenbacher, S. (1996). Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*, 67, 1123-1137.
9. Beutler, B. & Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 7, 625-655.

10. Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D. & Mundy, G. R. (1986). Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 319, 516-518.
11. Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, 28, 500-510.
12. Braun, N., Michel, U., Ernst, B. P., Metzner, R., Bitsch, A., Weber, F. & Rieckmann, P. (1996). Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett*, 215, 75-78.
13. Brett, P. M., Zygogianni, P., Griffiths, G. S., Tomaz, M., Parkar, M., D'Aiuto, F. & Tonetti, M. (2005). Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*, 84, 1149-1153.
14. Cabrera, M., Shaw, M. A., Sharples, C., Williams, H., Castes, M., Convit, J. & Blackwell, J. M. (1995). Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 182, 1259-1264.
15. Campos, M. I., dos Santos, M. C., Trevilatto, P. C., Scarel-Caminaga, R. M., Bezerra, F. J. & Line, S. R. (2004). Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent*, 13, 95-101.
16. Carranza, F. A.; Newman, M. G.; Takei, H. H. (2003). *Periodontia Clínica*. 9ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan.
17. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-3670.
18. Cavallion, J. M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*, 48, 445-453.
19. Censo Demográfico de 2003: Características da População e Moradia. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE). Rio de Janeiro, Brasil.

20. Colombo, A. P., Haffajee, A. D., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Smith, C. M., Cugini, M. A. & Socransky, S. S. (1998). Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25, 169-180.
21. Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Souto, R., Rosalem, W. J., Mendes, M. C. & Uzeda, M. (2002). Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*, 73, 360-369.
22. Craandijk, J., van Krugten, M. V., Verweij, C. L., van der Velden, U. & Loos, B. G. (2002). Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29, 28-34.
23. Curtin, J. F. & Cotter, T. G. (2002). Anisomycin activates JNK and sensitises DU 145 prostate carcinoma cells to Fas mediated apoptosis. *Br J Cancer*, 87, 1188-1194.
24. D'Aiuto, F., Ready, D. & Tonetti, M. S. (2004a). Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodontal Res*, 39, 236-241.
25. D'Aiuto, F., Parkar, M., Brett, P. M., Ready, D. & Tonetti, M. S. (2004b). Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine*, 28, 29-34.
26. D'Alfonso, S. & Richiardi, P. M. (1994). A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*, 39, 150-154.
27. De Souza, R. C. & Colombo, A. P. (2006). Distribution of FcgammaRIIa and FcgammaRIIIb genotypes in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 77, 1120-1128.
28. Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28, 233-240.

29. Deng, H. W., Chen, W. M. & Recker, R. R. (2001). Population admixture: detection by Hardy-Weinberg test and its quantitative effects on linkage-disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics*, **157**, 885-897.
30. Dinarello, C. A. & Bernheim, H. A. (1981). Ability of human leukocytic pyrogen to stimulate brain prostaglandin synthesis in vitro. *J Neurochem*, **37**, 702-708.
31. Dinarello, C. A. (1987). The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett*, **16**, 227-231.
32. Donati, M., Berglundh, T., Hytonen, A. M., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A. & Padyukov, L. (2005). Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*, **32**, 474-479.
33. Endo, M., Tai, H., Tabeta, K., Kobayashi, T., Yamazaki, K. & Yoshie, H. (2001). Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **72**, 1554-1559.
34. Endres, S., van der Meer, J. W. & Dinarello, C. A. (1987). Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *Eur J Clin Invest*, **17**, 469-474.
35. Engebretson, S. P., Lamster, I. B., Herrera-Abreu, M., Celenti, R. S., Timms, J. M., Chaudhary, A. G., di Giovine, F. S. & Kornman, K. S. (1999). The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol*, **70**, 567-573.
36. Ezzo, P. J. & Cutler, C. W. (2003). Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*, **32**, 24-35.
37. Fassmann, A., Holla, L. I., Buckova, D., Vasku, A., Znojil, V. & Vanek, J. (2003). Polymorphisms 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 Periodontal Res*, 38, 394-399.

38. Folwaczny, M., Glas, J., Torok, H. P., Mende, M. & Folwaczny, C. (2004). Lack of association between the TNF alpha G -308 A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31, 449-453.

39. Galbraith, G. M., Steed, R. B., Sanders, J. J. & Pandey, J. P. (1998). Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol*, 69, 428-433.

40. Galbraith, G. M., Hendley, T. M., Sanders, J. J., Palesch, Y. & Pandey, J. P. (1999). Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 26, 705-709.

41. Gemmell, E., Marshall, R. I. & Seymour, G. J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 14, 112-143.

42. Gonçalves L., S., Ferreira, S. M., Souza, C. O. & Colombo, A. P. (2006). IL-1 gene polymorphism and periodontal status of HIV Brazilians on highly active antiretroviral therapy. *Aids*, 20, 1779-1781.

43. Gonzalez, S., Rodrigo, L., Martinez-Borra, J., Lopez-Vazquez, A., Fuentes, D., Nino, P., Cadahia, V., Saro, C., Dieguez, M. A. & Lopez-Larrea, C. (2003). TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol*, 98, 1101-1106.

44. Graves, D. T., Delima, A. J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T. & Cochran, D. (1998). Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 69, 1419-1425.

45. Gravestain, L. A. & Borst, J. (1998). Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol*, 10, 423-434.
46. Guimaraes, A. L., Correia-Silva Jde, F., Sa, A. R., Victoria, J. M., Diniz, M. G., Costa Fde, O. & Gomez, R. S. (2007). Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol*, 52, 268-272.
47. Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dzink, J. L., Taubman, M. A., Ebersole, J. L. & Smith, D. J. (1988). Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15, 240-246.
48. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 78-111.
49. Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*, 31, 996-1002.
50. Hayday, A. & Viney, J. L. (2000). The ins and outs of body surface immunology. *Science*, 290, 97-100.
51. Higuchi, T., Seki, N., Kamizono, S., Yamada, A., Kimura, A., Kato, H. & Itoh, K. (1998). Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens*, 51, 605-612.
52. Hill, E. G., Slate, E. H., Wiegand, R. E., Grossi, S. G. & Salinas, C. F. (2006). Study design for calibration of clinical examiners measuring periodontal parameters. *J Periodontol*, 77, 1129-1141.
53. Hirose, K., Isogai, E., Miura, H. & Ueda, I. (1997). Levels of Porphyromonas gingivalis Fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. *Microbiol Immunol*, 41, 21-26.
54. Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchick, (2006). *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença* 6ª edição: São Paulo, Artmed.

55. Janssen-Heininger, Y. M., Poynter, M. E. & Baeuerle, P. A. (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med*, 28, 1317-1327.
56. Kawakami, M., Pekala, P. H., Lane, M. D. & Cerami, A. (1982). Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 912-916.
57. Kinane, D. F. & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 430-449.
58. Kinane, D. F., Hodge, P., Eskdale, J., Ellis, R. & Gallagher, G. (1999). Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*, 34, 379-386.
59. Kinane, D. F., Shiba, H. & Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 39, 91-117.
60. Kobayashi, T., Westerdal, N. A., Miyazaki, A., van der Pol, W. L., Suzuki, T., Yoshie, H., van de Winkel, J. G. & Hara, K. (1997). Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun*, 65, 3556-3560.
61. Kobayashi, T., Sugita, N., van der Pol, W. L., Nunokawa, Y., Westerdal, N. A., Yamamoto, K., van de Winkel, J. G. & Yoshie, H. (2000). The Fc gamma receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 71, 1425-1432.
62. Kobayashi, T., Yamamoto, K., Sugita, N., van der Pol, W. L., Yasuda, K., Kaneko, S., van de Winkel, J. G. & Yoshie, H. (2001). The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 72, 1324-1331

63. Korf, B. F. (2004). Principles of genetics: overview of the paradigm of genetic contribution to health and disease. *In* Goldman, L. e Ausiello D. (eds): Cecil Textbook of Medicine 22^a edição, Philadelphia, Saunders.
64. Kornman, K. S. & Loe, H. (1993). The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 2, 83-97.
65. Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., Jr., Higginbottom, F. L. & Duff, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 24, 72-77.
66. Laine, M. L., Farre, M. A., Crusius, J. B., van Winkelhoff, A. J. & Pena, A. S. (2000). The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol*, 71, 1315-1318.
67. Lee, Y. H., Harley, J. B. & Nath, S. K. (2006). Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet*, 14, 364-371.
68. Lench, N., Stanier, P. & Williamson, R. (1988). Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet*, 1, 1356-1358.
69. Li, Y. P. & Stashenko, P. (1993). Characterization of a tumor necrosis factor-responsive element which down-regulates the human osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 13, 3714-3721.
70. Lin, L., Pan, Y. P. & Yin, L. Y. (2003). Study on the correlation of cytokine gene polymorphism with chronic periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 12, 456-459.
71. Lindhe, J. & Karring, T. (1999). Anatomia do Periodonto *In* Lindhe, J.; Karring, T.; Lang, N. (eds): Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia 3^a edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

72. Loos, B. G. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*, 76, 2106-2115.
73. Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., Gevaert, Y., Schaaf-Lafontaine, N., Roland, S., Mahieu, P., Malaise, M., De Groote, D., Louis, R. & Belaiche, J. (1998). Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*, 113, 401-406.
74. McDevitt, M. J., Wang, H. Y., Knobelmann, C., Newman, M. G., di Giovine, F. S., Timms, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000). Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol*, 71, 156-163.
75. McGuire, W., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M. & Kwiatkowski, D. (1994). Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, 371, 508-510.
76. Meurman, J. H., Sanz, M. & Janket, S. J. (2004). Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 403-413.
77. Moshage, H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol*, 181, 257-266.
78. Nadel, S., Newport, M. J., Booy, R. & Levin, M. (1996). Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis*, 174, 878-880.
79. Nardi, N.B. (2004). Doenças genéticas: gênicas, cromossômicas, complexas. *In* Mir, Luís (ed): *Genômica*^{1ª} edição, São Paulo, Atheneu.
80. Nathan, C. F. (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest*, 80, 1550-1560.
81. Newman, M. G. & Socransky, S. S. (1977). Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res*, 12, 120-128.

82. Noack, B., Genco, R. J., Trevisan, M., Grossi, S., Zambon, J. J. & De Nardin, E. (2001). Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*, 72, 1221-1227.
83. Oshrain, H. I., Telsey, B. & Mandel, I. D. (1987). Neutrophil chemotaxis in refractory cases of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 14, 52-55.
84. Ozaki, K., Ohnishi, Y., Iida, A., Sekine, A., Yamada, R., Tsunoda, T., Sato, H., Hori, M., Nakamura, Y. & Tanaka, T. (2002). Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 32, 650-654.
85. Page, R. C. & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
86. Page, R. C., Altman, L. C., Ebersole, J. L., Vandesteen, G. E., Dahlberg, W. H., Williams, B. L. & Osterberg, S. K. (1983). Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. *J Periodontol*, 54, 197-209.
87. Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14, 216-248.
88. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42, 80-87.
89. Parra, F. C., Amado, R. C., Lambertucci, J. R., Rocha, J., Antunes, C. M. & Pena, S. D. (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 177-182.
90. Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H. & Nerup, J. (1992). A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*, 22, 396-402.

91. Price, P., Calder, D. M., Witt, C. S., Allcock, R. J., Christiansen, F. T., Davies, G. R., Cameron, P. U., Rogers, M., Baluchova, K., Moore, C. B. & French, M. A. (1999a). Periodontal attachment loss in HIV-infected patients is associated with the major histocompatibility complex 8.1 haplotype (HLA-A1,B8,DR3). *Tissue Antigens*, 54, 391-399.
92. Price, P., Witt, C., Allcock, R., Sayer, D., Garlepp, M., Kok, C. C., French, M., Mallal, S. & Christiansen, F. (1999b). The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev*, 167, 257-274.
93. Qian, W., Zhang, J. & Zhang, Y. (2002). [The relationship between tumor necrosis factor A-308 gene polymorphism and susceptibility of severe periodontitis in adults]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 37, 126-128.
94. Rodriguez-Carreón, A. A., Zuniga, J., Hernandez-Pacheco, G., Rodriguez-Perez, J. M., Perez-Hernandez, N., Montes de Oca, J. V., Cardiel, M. H., Granados, J. & Vargas-Alarcon, G. (2005). Tumor necrosis factor- α -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun*, 24, 63-68.
95. Rose, L. E.; Genco, R. J.; Mealey, B. L.; Cohen, D. W. (2002) *Medicina Periodontal*. 1edição. São Paulo: Santos.
96. Rossomando, E. F., Kennedy, J. E. & Hadjimichael, J. (1990). Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol*, 35, 431-434.
97. Sakellari, D., Katsares, V., Georgiadou, M., Kouvatsi, A., Arsenakis, M. & Konstantinidis, A. (2006). No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol*, 33, 765-770.

98. Shapira, L., Stabholz, A., Rieckmann, P. & Kruse, N. (2001). Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontol Res*, 36, 183-186.
99. Shimada, Y., Tai, H., Endo, M., Kobayashi, T., Akazawa, K. & Yamazaki, K. (2004). Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31, 463-469.
100. Slots, J. (1976). The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*, 84, 1-10.
101. Slots, J. (1979). Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 6, 351-382.
102. Slots, J. (1986). Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol*, 13, 912-917.
103. Slots, J., Bragd, L., Wikstrom, M. & Dahlen, G. (1986). The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*, 13, 570-577.
104. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, 63, 322-331.
105. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38, 135-187.
106. Socransky, S. S., Haffajee, A. D. & Dzink, J. L. (1988). Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol*, 15, 440-444.
107. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-144.
108. Soga, Y., Nishimura, F., Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba, S. & Murayama, Y. (2003). Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-

nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*, 30, 524-531.

109. Souba, W. W., Scott, T. E. & Wilmore, D. W. (1984). Gut consumption of intravenously administered fuels. *Curr Surg*, 41, 461-464.

110. Suzuki, Y., Horio, T., Nonogi, H., Hayashi, T., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K. & Kawano, Y. (2004). Adrenomedullin as a sensitive marker for coronary and peripheral arterial complications in patients with atherosclerotic risks. *Peptides*, 25, 1321-1326.

111. Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 3, 391-397.

112. Takashiba, S. & Naruishi, K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 40, 94-106.

113. Takashiba, S., Shapira, L., Amar, S. & Van Dyke, T. E. (1993). Cloning and characterization of human TNF alpha promoter region. *Gene*, 131, 307-308.

114. Takashiba, S., Naruishi, K. & Murayama, Y. (2003). Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol*, 74, 103-110.

115. Tanner, A. C., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1984). Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontal Res*, 19, 279-291.

116. Tanner, A., Maiden, M. F., Macuch, P. J., Murray, L. L. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*, 25, 85-98.

117. Tartaglia, L. A. & Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today*, 13, 151-153.

118. Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F. & Goeddel, D. V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell*, 73, 213-216.

119. Trevilatto, P. C. & Line, S. R. (2000). Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*, 18, 6-9.
120. Trevilatto, P. C., Tramontina, V. A., Machado, M. A., Goncalves, R. B., Sallum, A. W. & Line, S. R. (2002). Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29, 233-239.
121. van der Pol, W. L. & van de Winkel, J. G. (1998). Immunology in clinical practice. X. IgG receptors: structure, function and immunotherapy. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 142, 335-340.
122. van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989). Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol*, 16, 128-131.
123. Verweij, C. L. (1999). Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58 Suppl 1, I20-26.
124. Walker, S. J., Van Dyke, T. E., Rich, S., Kornman, K. S., di Giovine, F. S. & Hart, T. C. (2000). Genetic polymorphisms of the IL-1alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol*, 71, 723-728.
125. Wallach, D., Engelmann, H., Nophar, Y., Aderka, D., Kemper, O., Hornik, V., Holtmann, H. & Brakebusch, C. (1991). Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl*, 35, 51-57.
126. Waterer, G. W. & Wunderink, R. G. (2003). Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Crit Care*, 7, 308-314.
127. Williams, R. C. & Offenbacher, S. (2000). Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol 2000*, 23, 9-12.

128. Wilson, A. G., di Giovine, F. S., Blakemore, A. I. & Duff, G. W. (1992). Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*, 1, 353.
129. Wilson, A. G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F. S., van der Putte, L. B. & Duff, G. W. (1993). 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*, 177, 557-560.
130. Wilson, A. G., Gordon, C., di Giovine, F. S., de Vries, N., van de Putte, L. B., Emery, P. & Duff, G. W. (1994). A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol*, 24, 191-195.
131. Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O. & Duff, G. W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3195-3199.
132. Wilton, J. M., Bampton, J. L., Griffiths, G. S., Curtis, M. A., Life, J. S., Johnson, N. W., Powell, J. R., Harrap, G. J. & Critchley, P. (1992). Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol*, 19, 53-57.

8- ANEXOS



ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA

“Determinação do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em diferentes formas de periodontite”

Prezado(a) Senhor(a).

A pesquisa da qual você está sendo convidado a participar visa identificar e caracterizar as doenças que afetam as **gengivas e o osso** que suportam os dentes na boca, denominadas **DOENÇAS PERIODONTAIS**. As doenças periodontais são infecções causadas pelo **acúmulo de bactérias** específicas presentes na **placa dental**, localizada abaixo da gengiva, o que leva a uma inflamação e possível perda do dente. Ela se manifesta pela inflamação da gengiva, com sangramento e vermelhidão gengival, presença de tártaro e placa dental, dor, presença ou não de pus e mobilidade do dente. Além das bactérias, outros fatores podem favorecer o aparecimento desta doença, como o fumo, stress, diabetes e a composição genética do paciente. Alguns indivíduos possuem **genes específicos** no seu cromossomo que podem aumentar sua chance de desenvolver a doença. Por isso, este estudo irá avaliar alguns genes específicos que possam ter alguma influência nessas doenças. Para participar deste estudo é necessário ter doença periodontal (**sangramento, vermelhidão e inchaço da gengiva, dente amolecido, dor, presença de tártaro**), não estar grávida nem amamentando, estar com boa saúde geral, não ter tido tratamento para as gengivas ou ter tomado antibióticos nos últimos 6 meses. O protocolo da pesquisa envolve inicialmente um **exame clínico oral** (exame da gengiva e dentes para avaliar inflamação e presença de placa dental ou tártaro) e **radiográfico** de todos os dentes. A **saliva** (que contém grandes quantidades de células da bochecha) será coletada num recipiente plástico para a identificação dos genes específicos do paciente. Os indivíduos selecionados que aceitarem participar desse estudo receberão **tratamento periodontal gratuito**, consistindo de limpeza dos dentes para remoção da placa dental e tártaro, e controle da higiene oral. O estudo terá uma duração de 6-8 meses e envolverá de 1 visita de aproximadamente 1 hora. Todos os exames serão feitos com material estéril e equipamento odontológico adequados na Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da UFRJ, por alunos treinados sob supervisão dos professores responsáveis. Pacientes que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades da Clínica Integrada de Graduação. Os procedimentos deste estudo envolvem exame clínico e coleta de saliva que são normalmente feitos no consultório dentário e não implicam em nenhum risco ou desconforto ao paciente. A saliva coletada para este estudo somente será utilizada para esta pesquisa. Os participantes terão como benefício o tratamento odontológico por profissionais especializados, sem custos, assim como um melhor conhecimento do seu estado de saúde oral e geral. Os resultados deste estudo serão divulgados no meio científico, sendo eles favoráveis ou não e você poderá requisitá-los quando quiser. Finalmente, você estará à vontade para desistir de participar desse estudo, a qualquer momento, sem prejuízo ao seu tratamento.

Em caso de dúvidas e necessidades, você poderá entrar em contato com: Dr^a. Natascha Giovannetti de Menezes na Faculdade de Odontologia da UFRJ, Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, ou pelos telefones 2562-2001 ou 2562-2098-RJ. Se você tiver alguma consideração ou dúvida entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)-sala 01D-46- 1º andar, telefone 2562-2480-Email: ccp@hucff.ufrj.br. Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, solicitamos que você date e assine esse formulário de consentimento.

Termo de consentimento

Declaro ter lido e entendido os termos da pesquisa a ser realizada pela Faculdade de Odontologia da UFRJ sobre doença gengival, variação genética, dando expressamente o meu “De acordo” com os mesmos, e com reserva do meu direito de desistência, assumo o compromisso de minha participação no programa de pesquisa.

DATA ____/____/____

Dra. Natascha Giovannetti de Menezes (Pesquisadora responsável)

DATA ____/____/____

Assinatura do paciente

ANEXO II

APROVAÇÃO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA

ANEXO III
PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nasc: ___/___/___

Endereço: _____

Telefone: _____ Estado civil: _____ Profissão: _____

Sua cor ou raça é: () branca () preta () amarela () parda () indígena

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____

2. Data do último exame médico: _____

3. Você já foi hospitalizado(a)? Sim Não NS

4. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5. Você está sob cuidados médicos? Sim Não NS

6. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

7. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:

a) Doenças congênitas do coração? Sim Não NS

b) Doenças cardíacas (ex.: enfarte, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)? Sim Não NS

• Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? Sim Não NS

• Inchaço nos pés ou nos tornozelos? Sim Não NS

• Dor, pressão ou mal estar no peito? Sim Não NS

c) Febre reumática? Sim Não NS

d) Endocardite bacteriana? Sim Não NS

e) Sopro no coração? Sim Não NS

f) Desmaios convulsões ou epilepsia? Sim Não NS

g) Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? Sim Não NS

h) Tratamento nervoso? Sim Não NS

i) Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? Sim Não NS

j) Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? Sim Não NS

k) Artrite ou dores articulares? Sim Não NS

l) Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? Sim Não NS

m) Diabetes? Sim Não NS

• Demora na cicatrização dos ferimentos? Sim Não NS

• Você urina mais de seis vezes por dia? Sim Não NS

• Você sente sede a maior parte do tempo? Sim Não NS

n) Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemese, hemotúria, epistaxes)? Sim Não NS

o) Úlceras ou outros problemas estomacais? Sim Não NS

p) Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? Sim Não NS

8. Você já sofreu transfusão sangüínea? Sim Não NS

9. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? Sim Não NS

10. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? Sim Não NS

11. Você teve uma variação recente no apetite? Sim Não NS

12. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? Sim Não NS
Somente para mulheres
13. Você está grávida? Sim Não NS
14. Em caso de resposta positiva, há quantos meses? _____
15. Você já passou pela menopausa? Sim Não NS
16. Você está tomando algum hormônio? Sim Não NS

Questionário Odontológico

1. Nome do seu dentista: _____ Telefone: _____
2. Frequência de visitas ao dentista: _____
3. Data da última visita ao dentista: _____
4. História das extrações:
- a) Causa provável das extrações: _____
- b) Data da última extração: _____
- c) Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária Sim Não NS
- d) Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? Sim Não NS
5. Suas gengivas sangram? Sim Não NS
6. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUNA? Sim Não NS
7. Você já fez algum tratamento periodontal? Sim Não NS
8. Em caso de resposta positiva, qual? _____
9. Você já teve algum tratamento ortodôntico? Sim Não NS
10. Em caso de resposta positiva, listar data do tratamento, condição tratada, e tempo de duração do tratamento: _____
11. Você já fez algum tratamento de canal? Sim Não NS
12. Em caso de resposta positiva, data do tratamento de canal: _____
13. Você usa ou já usou alguma prótese dentária? Sim Não NS
14. Em caso de resposta positiva, citar idade da prótese em uso: _____
15. História dentária familiar:
- a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? Sim Não NS
- b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? Sim Não NS
- c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: _____
16. Você costuma respirar pela boca? Sim Não NS
17. Você range os dentes? Sim Não NS
18. Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
19. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? Sim Não NS
20. Você usa fio dental? Sim Não NS
21. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários? Sim Não NS
22. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso: _____
23. Você fuma? Sim Não
24. Em caso de resposta positiva, quantos cigarros por dia? _____
25. Caso você seja ex-fumante, há quanto tempo parou, por quanto tempo fumou, e quantos cigarros costumava fumar? _____

Data ____ / ____ / ____

Assinatura

Lack of association between the TNF- α -308 (G/A) polymorphism and periodontal disease in Brazilians.

¹ **Natascha Giovannetti de Menezes, DDS**

Postgraduate student, Department of Periodontology, Dental School of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

² **Ana Paula Vieira Colombo, DDS, DMSc**

Adjunct Professor, Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology of Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence should be sent to:

Dr. Ana Paula V. Colombo
R. Gal. Dionísio, 60 apt. 604 – Humaitá
CEP: 22271-050 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Email: anapaulacolombo@yahoo.com or apcolombo@micro.ufrj.br

Running Title: TNF- α polymorphism and periodontal status

Abstract

Background and Aim: A single nucleotide polymorphism (SNP) at the position -308 of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) promoter region has been shown to influence cytokine production and susceptibility to periodontitis. The aim of this study was to determine the frequency of the TNF- α (-308 G/A) SNP in subjects with different periodontal conditions from a Brazilian population.

Material and Methods: One hundred and sixty-three subjects, categorized as periodontal health (PH = 51), chronic (CP = 74) and generalized aggressive (GAgP = 38) periodontitis participated in the study. Genomic DNA was obtained from mouthwash samples and TNF- α genotyping was performed by PCR and RFLP analysis. Differences in clinical parameters and frequency of allotypes/genotypes among groups were sought by Kruskal-Wallis, χ^2 and Fisher's exact tests.

Results: The allele -308G was detected in 91.7%, whereas the -308A allele was found in 35.4% of all subjects. No significant differences were observed in the frequency distribution of these alleles ($\chi^2 = 2.610$, $p > 0.05$), and the genotypes G/G, G/A and A/A ($\chi^2 = 2.547$, $p = 0.636$) among groups.

Conclusion: These data suggest that the TNF- α (-308 G/A) polymorphism is not associated with periodontitis in this Brazilian population.

Key words: TNF- α , periodontal diseases; genetic polymorphism

Introduction

Periodontal diseases are infectious diseases caused by specific bacteria of the subgingival biofilm which elicit an inflammatory response, leading to destruction of the periodontal attachment apparatus and alveolar bone (1). Although the primary etiologic agent in the initiation of periodontal diseases is the pathogenic biofilm, progression of these infections is dependent on host-derived, behavioral and environmental factors (1). Indeed, a significant amount of evidence has indicated that host genetic factors are also important determinants of periodontitis susceptibility and progression (2). In particular, polymorphisms in genes encoding molecules involved in the host immune and inflammatory responses have been targeted as potential genetic markers for periodontitis susceptibility and severity (3 - 7).

TNF- α , a major proinflammatory cytokine, has been found at high levels in gingival crevicular fluids and in gingival tissues from periodontitis lesions of humans (8). TNF- α or the synergistic action of TNF- α and IL-1 was clearly identified as a potent inducer of tissue destruction and bone resorption in different forms of periodontal disease (9). Interestingly, studies in primates provided convincing evidence that inhibition of TNF- α and/or IL-1 β reduces as much as 51% of connective tissue attachment (10), 80% of the inflammatory cell recruitment and 60% of bone loss (11).

Data in the literature have indicated that any genetic variability in the production of TNF- α after an infectious stimulus may have a significant impact on the level of the inflammatory response and thus on the clinical outcome (12, 13). The highly polymorphic TNF locus is located tandemly on the long arm of chromosome 6 within the MHC class III region (6p21.33). A guanine (G) to adenine (A) transition at position -308 of the TNF- α promoter region is perhaps the best studied cytokine single nucleotide polymorphism (SNP). This point mutation affects a consensus sequence for a binding site of the transcription factor AP-2 (14). Studies have suggested that carriage of the rare TNF- α -308 A allele is associated

with significantly greater TNF- α production (14) and TNF- α mRNA transcription (13). Moreover, the A allele has been associated with an increased risk for various non-related infectious and inflammatory diseases, including severe cerebral malaria (12), mucocutaneous leishmaniasis (15), meningococcal sepsis (16), autoimmune disorders (17), and periodontitis (18, 19). However, despite the biological plausibility of TNF polymorphisms as markers for susceptibility to periodontal diseases, other investigators have failed to corroborate the association between these polymorphisms and increased risk for periodontal diseases (3 - 5, 20 - 25).

It is possible that these results may reflect the complexity and heterogeneity of genetic basis of periodontitis and also the effect of different confounders such as environmental and behavioral factors. Moreover, the distribution and frequency of gene polymorphisms may vary considerably among populations with distinct racial backgrounds. Hence, data obtained from one study may not be properly ascribed to other populations. The purpose of the present study was to determine the frequency distribution of the -308(G/A) TNF- α alleles in individuals with different periodontal status from a Brazilian population.

Material and Methods

Human Subjects and Clinical Assessments

One hundred and sixty-three adult subjects who sought dental treatment at the Dental School of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, were recruited for the study. Informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was approved by the Review Committee for Human Subjects of the Clementino Fraga Filho University Hospital. Exclusion criteria included pregnancy, use of local or systemic antimicrobial agents within 6 months before entry into the study, diabetes, and other systemic

conditions that could affect the periodontal status. All subjects had at least 10 teeth and were over 18 years of age. Clinical measurements were performed at six sites per tooth at all teeth excluding third molars. Probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) measurements were performed using a conventional manual periodontal probe (North Carolina Probe, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). The presence or absence of supragingival biofilm (SB), bleeding on probing (BOP) and suppuration (SUP) were ascertained in all studied cases. In addition, for every patient, a set of full mouth dental radiographs was available for analysis. After initial clinical evaluation the subjects were categorized into three groups. Group I, periodontally healthy subjects (PH = 51) had no sites with PD and/or CAL > 3 mm and had no more than 10 % of sites with BOP. Group II, chronic periodontitis patients (CP = 74) presented at least 10% of teeth with PD and/or CAL \geq 5 mm, or at least 15% of teeth with PD and/or CAL \geq 4 mm. Group III, generalized aggressive periodontitis patients (GAgP = 38) showed \geq 30% of teeth with PD and/or CAL \geq 5 mm, or \geq 60% of teeth with PD and/or CAL \geq 4 mm. The subjects in this group were in the 30-39 years range. Regarding ethnic background, patients were defined (by self-reporting) as White, African-Brazilian, or others. Smoking habits were assessed and all individuals were classified as smokers, never-smokers and former smokers. Former smokers were defined as subjects who had stopped smoking for at least 2 years.

Isolation of Genomic DNA

Genomic DNA was isolated and purified from mouthwash samples as previously described (26). Briefly, the subjects were not allowed to clean their teeth or to eat 30 minutes before sampling. They rinsed out their mouths twice with 10 ml of 0.9 % sterile saline solution for 60 seconds. The genomic DNA was isolated from samples by using the QIAmp

DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Supernatants were collected and stored at -20 °C.

Determination of -308 (G/A) TNF- α Genotypes

For the genetic analysis, PCR was performed in a 50 μ l reaction volume containing approximately 100 ng of genomic DNA, 5 μ l of 10 X PCR buffer (100 mM Tris HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1.25 units of *Taq* polymerase (PROMEGA[®], Madison, WI, USA), and 0.2 pM of each oligonucleotide primer. The primers were synthesized as described by Wilson *et al.* (27) (Bio-Synthesis[®], Inc., Lewisville, TX, USA), and were: sense primer 5' -AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT- 3', and antisense primer 5' -TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG- 3'. The PCR program was carried out in a Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech-INC[®], High Point, NC, EUA), and included one step of 95 °C for 10 min, followed by 38 cycles of denaturing (94 °C for 1min), annealing (57 °C for 1min) and extension (72 °C for 1min). A 107 bp DNA fragment was expected as the amplified product. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Subsequently, a 20 μ l aliquot of the PCR product was digested with 5U of *Nco I* (PROMEGA[®]) at 37° C overnight and the generated DNA fragments were analysed by electrophoresis on a 2.5% agarose gel. Individuals homozygous for the -308 G allele should present two fragments of 87 bp and 20 bp, whereas individuals homozygous for the -308 A allele should present a fragment of 107 bp. Individuals heterozygous should display the three fragments.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the software Statistical Package for the Social Sciences SPSS (SPSS Inc[®]. Chicago, IL, USA), release 13.0. Full-mouth clinical

measurements were computed for each subject and then average across subjects within the groups. Differences on clinical parameters among groups were sought using Kruskal-Wallis and χ^2 tests. The Mann-Whitney test was utilized to evaluate significant differences between pairs of groups. The frequency of distribution of TNF- α alleles and genotypes were compared among groups using the χ^2 and Fisher's exact tests, and odds ratios with 95% confidence intervals were determined. In order to control for age and race, the data were stratified by these categories and analyzed by Kruskal-Wallis and χ^2 tests. Any difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Demographic and Clinical Features

The demographic and epidemiologic data of the 3 clinical groups are summarized in Table 1. PH and GAgP patients were significantly younger than CP individuals ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis and Man-Whitney tests). Regarding ethnicity, a greater percentage of White patients was observed in the PH group (81%), whereas the groups CP and GAgP presented a higher proportion of African Brazilians (22% and 14%, respectively) and individuals of mixed racial background (19% and 50%, respectively) ($p = 0.002$, χ^2 test). In general, most of the patients were non-smokers (78.5%) (data not shown). Nevertheless, a higher frequency of current and former smokers with chronic periodontitis was detected ($p < 0.001$, χ^2 test).

Table 2 shows the full-mouth clinical parameters of the subject population. Statistically significant differences among groups were observed for all parameters ($p < 0.01$; Kruskal-Wallis test). When pairs of groups were compared, no significant differences were found for number of missing teeth, BOP, SB, SUP, and CAL > 6 mm between the CP and GAgP groups ($p > 0.05$; Mann-Whitney test). In order to control for smoking and race, comparisons of clinical parameters among groups were carried out only in never-smokers

and White individuals. Even though, the differences among groups were statistically significant for all clinical measurements ($p < 0.001$; data no shown).

Frequency of the TNF- α (-308 G/A) alleles and genotypes

The allele distributions of the TNF- α (-308G/A) polymorphism among clinical groups are shown in Table 3. No differences were found between observed and expected distributions of genotypes for the control group. Therefore, the allele distribution was assumed to be in Hardy-Weinberg equilibrium. A high incidence of allele G was observed in all groups (PH = 72.5%, CP = 81%, GAgP = 81.6%). Likewise, the frequency of subjects carrying at least one copy of the -308G allele was greater than subjects carrying allele A. However, no significant differences in the distribution of these alleles were found among groups ($\chi^2 = 2.610$, $p > 0.05$ for allele frequency; $\chi^2 = 1.01$, $p = 0.604$ for allele G+ individuals and $\chi^2 = 2.12$, $p = 0.345$ for A+ individuals). When the control subjects were compared with the CP or GAgP patients, no significant differences between groups were observed for the allele frequency (PH vs. CP - OR= 0.616, 95 % CI= 0.34-1.12; PH vs. GAgP - OR= 0.596, 95 % CI= 0.29-1.23). Furthermore, no significant differences in the distribution of these alleles were found when only never-smoker and White subjects were included in the analyses (data not shown).

The frequencies of the TNF- α genotypes are depicted on Figure 1. The distributions of the three genotypes were similar among PH, CP and GAgP patients, and no significant differences among groups were observed ($\chi^2 = 2.547$, $p = 0.636$).

Discussion

Periodontal diseases are considered to be complex diseases. Among other features, complex diseases are typically polygenic (28, 29). Disease modifying genes associated with

susceptibility and severity of periodontitis have been proposed. Nevertheless, very little is known about which genes may be involved in these diseases (2). Polymorphisms within the TNF- α gene have been suggested as potential genetic risk markers for periodontitis. However, the allelic frequency of this polymorphic gene may vary among distinct ethnic groups, so that the application of such genetic markers as a tool for diagnosis and prognosis of periodontitis should be examined in different populations (2, 29). In the current study, we investigated the frequency of the TNF- α (-308 G/A) alleles and genotypes in Brazilians with different periodontal conditions. Our results showed that the carriage rate of the “rare” allele -308A was slightly higher in the control group (27.5%) compared to the diseased groups (CP = 19% and GAgP = 18.4%), but no significant differences among groups were found (Table 3). The frequency of the -308A allele varied widely in most of the studies carried out in different populations (range 3% - 32%) (3, 4, 20, 21, 23 – 25, 30 - 32). Interestingly, this SNP was rarely detected (2 – 3%) in Japanese subjects (30, 33). Despite these differences, our findings are in agreement with the majority of the literature data that failed to show an association of this polymorphism with susceptibility and/or severity of periodontal disease (3 – 5, 20,21,23-25, 30, 31).

Regarding the TNF- α genotypes, a similar distribution of G/G, G/A and A/A genotypes was observed among the studied groups as well (Fig. 1). Usually the TNF- α -308A allele is considered to be the marker of disease susceptibility due to the upregulatory effect of this allele on the cytokine production. Folwaczny *et al.* (24) and Sakellari *et al.* (4) reported low frequencies for the A/A genotype in periodontitis patients (2 – 4%), whereas this genotype was not detected in periodontally healthy subjects. Other studies did not find the A/A genotype neither in patients nor controls (21, 25, 33). Conversely, our data indicated that the A/A genotype tended to be more prevalent in the control group (11.6%) in relation to the CP (7.7%) and GAgP (5.6%) groups, although these differences were not significant.

Very few studies have reported some correlation between SNPs of the TNF- α gene and periodontitis. Among Caucasians, Galbraith *et al.* (32) found a significant greater frequency of the TNF- α -308G/G genotype in individuals with severe periodontitis (95%) compared to gingivitis patients (65%). However, these findings should be interpreted with caution since no significant differences in the prevalence of the G/G genotype were observed between periodontitis patients and the reference population (76%). In a Chinese population, Lin *et al.* (18) reported a significant association between the -308A allele and moderate-to-advanced periodontitis, whereas Qian *et al.* (19) found a significantly higher prevalence of the genotype G/G in severe periodontitis patients compared to controls. Although the most extensively studied SNP at the TNF- α locus is the G to A transition at the -308 position of the promoter region, other SNPs have been investigated (20, 30, 31, 33). Only Soga *et al.* (33) showed a significant association between TNF- α -1031, -863 and -857 SNPs and severe periodontitis in Japanese individuals.

The inconsistent results observed in the literature could be attributed to several factors related to the definition of disease and population heterogeneity (2, 29). Environmental and demographic confounding risk factors for periodontitis certainly play a role in the disease pathogenesis and should also be considered. Although differences in age, gender and smoking history were observed among the subject groups in the current study, the pattern of frequency distribution of alleles and genotypes did not change when the data were independently analyzed in subgroups of patients (data not shown).

Regarding ethnicity, subjects were asked to self-report themselves as White, African-Brazilian, or others. We observed a similar distribution of these groups to the distribution reported in the urban population of the city of Rio de Janeiro by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (34). However, no reliable criteria to define these groups are available due to the high racial miscegenation in this population (35). Despite that, the clinical

and genetic findings were similar when the data were analyzed only in subjects defined as White. In addition to the high heterogeneous population, the sample size in this study was small, thus careful interpretation of the data is necessary. Lack of association between different genotypes and clinical status may be due to small sample size, particularly for alleles of low prevalence. Nevertheless, we observed a quite elevated carriage rate for the rare allele -308A compared to other investigations (4, 21, 24, 25, 33).

Defining a subject population in relation to the type of periodontal disease may also contribute to significant differences among genetic studies. It is likely that overlapping of clinical phenotypes exist between different forms of periodontitis, regardless the diagnostic criteria used. Even though we used commonly accepted criteria to differentiate both periodontitis groups, comparing our findings with data from other studies is quite difficult given that basically each study had a particular classification system.

Finally, the genetic basis for complex diseases such as periodontitis may not be related to a single genetic variant, but may be influenced by multiple genes acting synergistically with environmental factors to increase or decrease the likelihood of developing a disease. The TNF cluster is located within the class III region of the MHC. This region exhibits a high degree of linkage disequilibrium with other polymorphic nearby genes involved in the inflammatory response (36). For instance, Fassmann *et al.* (23) suggested that combined genotypes composed of the TNF- α -308G/A and LT- α +252G/A gene polymorphisms may influence the susceptibility to chronic periodontitis. Thus, the analysis of a single genetic polymorphism might be meaningless for determining a genetic risk factor for periodontal diseases. Instead, combinations of different genotypes or haplotypes for possible gene-gene interactions should be evaluated in these studies.

Based on our results, the TNF- α (-308 G/A) polymorphism is not associated with increased susceptibility to or severity of periodontitis in this particular Brazilian population.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Carina Maciel da Silva, Department of Periodontology, for the support in this study. This work was supported in part by Program of Research Support for Groups of Excellence (PRONEX), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

References

- 1- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;**14**:9-11.
- 2- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32 Suppl 6**:159-79.
- 3- Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., Jr., Higginbottom, F. L. & Duff, G. W. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:72-77.
- 4- Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:765-70.
- 5- Babel, N., Cherepnev, G., Babel, D., Tropmann, A., Hammer, M., Volk, H.D., Reinke, P. Analysis of Tumor Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- β , Interleukin-10, IL-6, and Interferon - γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006;**77**:1-6.

- 6- de Souza RC, Colombo AP. Distribution of FcγRIIa and FcγRIIIb genotypes in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2006;**77**:1120-8.
- 7- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:438-42.
- 8- Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1β and tumor necrosis factor-α in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999; **70**:567-73.
- 9- Graves, D. T., Delima, A. J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T. & Cochran, D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol* 1998;**69**:1419-1425.
- 10- Delima AJ, Oates T, Assuma R, et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:233-40.
- 11- Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;**160**:403-9.
- 12- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994;**371**:508-10.

- 13- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:3195-9.
- 14- Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999;**66**:562-6.
- 15- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995;**182**:1259-64.
- 16- Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M. Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J Infect Dis* 1996;**174**:878-80.
- 17- Wilson, A. G., di Giovine, F. S. & Duff, G. W.. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* 1995;**45**:1-12.
- 18- Lin L, Pan YP, Yin LY. Study on the correlation of cytokine gene polymorphism with chronic periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2003;**12**:456-9.
- 19- Qian W, Zhang J, Zhang Y. [The relationship between tumor necrosis factor A-308 gene polymorphism and susceptibility of severe periodontitis in adults]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;**37**:126-8.
- 20- Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999;**34**:379-86.
- 21- Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; **36**: 183-186.

- 22- Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:28-34.
- 23- Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms 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 Periodontol Res* 2003;**38**:394-9.
- 24- Folwaczny, M., Glas, J., Torok, H. P., Mende, M. & Folwaczny, C.. Lack of association between the TNF alpha G -308 A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:449-453.
- 25- Donati M, Berglundh T, Hytonen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2005;**32**:474-9.
- 26- Laine ML, Farre MA, Crusius JB, van Winkelhoff AJ, Pena AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000;**71**:1315-8.
- 27- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;**1**:353.
- 28- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002;**3**(5):391-7.
- 29- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;**39**:91-117.

- 30- 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 Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001; **72**: 1554-1559.
- 31- Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998; **69**: 428-433.
- 32- Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 705-9.
- 33- Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003; **30**: 524-31.
- 34- Brazilian Institute of Geography and Statistics. Demographic Census 2003: Characteristics of the Population and Households (in Portuguese). Rio de Janeiro, Brazil.
- 35- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 177-82.
- 36- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; **177**: 557-60.

Table 1. Demographic parameters (mean \pm SD) of Periodontally Healthy (PH), Chronic Periodontitis (CP), and Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP) subjects selected from a Brazilian population.

Parameters	PH (N = 51)	CP (N = 74)	GAgP (N = 38)
Age * ‡	30 \pm 10	48 \pm 12	31 \pm 6
(%) Males	31	41	18
Race (%) †			
Whites	81	59	36
African Brazilians	8	22	14
Others	11	19	50
Smoking (%) †			
Never-smokers	88	61	100
Former-smokers	8	27	0
Current-smokers	4	12	0

* Refers to $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test, and ‡ Mann-Whitney test; † refers to $p < 0.01$, χ^2 test.

Table 2. Full-mouth clinical parameters (mean \pm SD) of Periodontally Healthy (PH), Chronic Periodontitis (CP), and Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP) subjects selected from a Brazilian population.

Parameters	PH (N = 51)	CP (N = 74)	GAgP (N = 38)
N of missing teeth ^{*†}	2.3 \pm 3.6	5.5 \pm 4.8	4.4 \pm 4.7
PD (mm) ^{*†‡}	1.7 \pm 0.3	2.7 \pm 0.9	3.3 \pm 0.9
CAL (mm) ^{*†}	1.8 \pm 0.3	3.6 \pm 1.5	3.8 \pm 1.1
<i>% sites with:</i>			
BOP ^{*†}	4.3 \pm 4.3	41.2 \pm 26.6	48.6 \pm 28.4
SB ^{*†}	13.4 \pm 16	46.3 \pm 30	37.4 \pm 29
SUP ^{*†}	0	0.6 \pm 1.6	2.3 \pm 4.9
PD \leq 4mm ^{*†‡}	100	88 \pm 16	75 \pm 20.3
PD 5-6mm ^{*†‡}	0	8.5 \pm 9.4	19 \pm 14
PD $>$ 6mm ^{*†‡}	0	3.5 \pm 8.5	6 \pm 8.5
CAL \leq 4mm ^{*†‡}	100	73 \pm 27	66 \pm 24
CAL 5-6mm ^{*†‡}	0	16 \pm 15	24 \pm 14
CAL $>$ 6mm ^{*†}	0	11 \pm 17	10 \pm 14

* Refers to $p < 0.01$ (Kruskal-Wallis test); † refers to $p < 0.01$ (Mann-Whitney between PH and CP, and PH and GAgP); ‡ refers to $p < 0.01$ (Mann-Whitney between CP and GAgP); PD = pocket depth; CAL = clinical attachment level; BOP = bleeding on probing; SB = supragingival biofilm; SUP = suppuration.

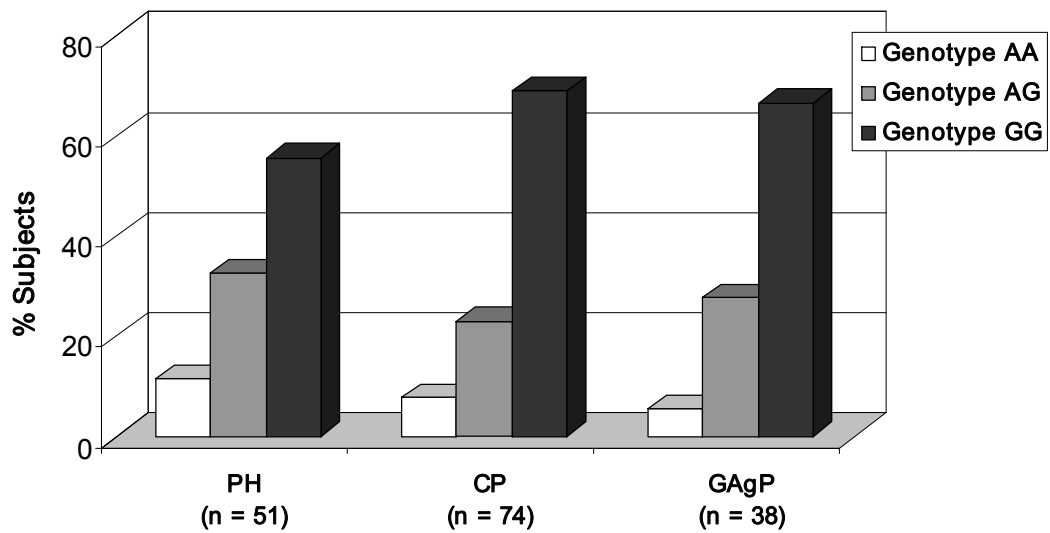
Table 3. Frequencies of alleles of polymorphisms in the TNF- α -308G/A gene in Periodontally Healthy (PH), Chronic Periodontitis (CP), and Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP) subjects selected from a Brazilian population.

	PH	CP	GAgP	PH vs. CP ^{##}	PH vs. GAgP ^{##}
	<i>n</i> = 51	<i>n</i> = 74	<i>n</i> = 38	OR (95%CI)	OR (95%CI)
<i>Allele frequency</i> ^{*†}					
TNF- α -308G	72.5 %	81 %	81.6 %	0.616 (0.34–1.12)	0.596 (0.29-1.23)
TNF- α -308A	27.5 %	19 %	18.4 %		
<i>Polymorphic allele positivity</i> [†]					
G+ ^{**}	88.4 %	92.3 %	94.4 %	1.5 (0.43-5.82)	4.5 (0.40-12.3)
A+ ^{††}	44.2 %	31 %	33.3 %	0.59 (0.25-1.25)	0.69 (0.25-1.58)

* Values represent the percentage in which the alleles appear of the total possible times ($2n$) that they may occur in each group (PH = 102; CP = 148; GAgP = 76); [†] $\chi^2 = 2.610$, $p > 0.05$; [†] Percentage of individuals who carry at least one copy of each polymorphic allele; ^{**} $\chi^2 = 1.01$, $p = 0.604$; ^{††} $\chi^2 = 2.12$, $p = 0.345$; ^{##} Not significant (Fisher's exact test).

Figure legend

Figure 1. Bar chart of the distribution of the TNF- α -308G/A genotypes in Periodontally Healthy (PH), Chronic Periodontitis (CP), and Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP) subjects selected from a Brazilian population. The bars represent the % of subjects with a particular genotype in each group. The shadings represent the different genotypes. No significant differences were observed among groups ($\chi^2 = 2.547, p = 0.636$).



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](#)