



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Flavia Martinez de Carvalho

**Mapeamento Genético do locus 1q 24.2 – 1q 31.3 em famílias
segregando periodontite agressiva**

Rio de Janeiro

2009

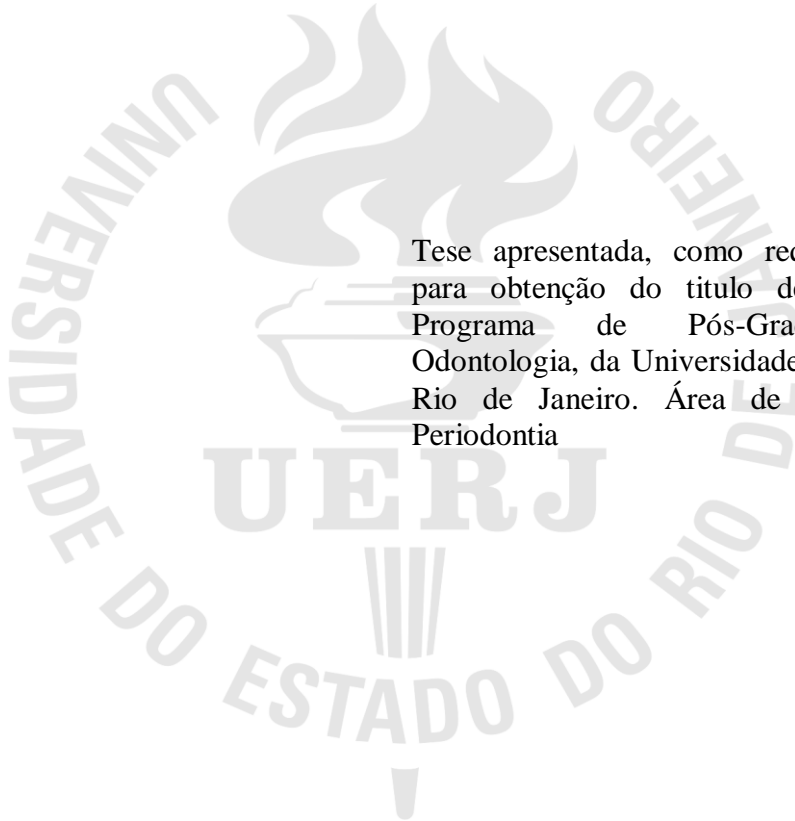
Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Flavia Martinez de Carvalho

**Mapeamento Genético do locus 1q 24.2 – 1q 31.3 em famílias segregando
periodontite agressiva**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

C331 Carvalho, Flavia Martinez de.
Mapeamento Genético do locus 1q 24.2 – 1q31.3 em famílias segregando periodontite agressiva / Flávia Martinez de Carvalho. – 2009. 105 f.

Orientador: Eduardo Muniz Barretto Tinoco.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Periodontite – Aspectos genéticos. 2. Mapeamento cromossômico. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Herança multifatorial. 5. Desequilíbrio de ligação. I. Tinoco, Eduardo Muniz Barretto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Flavia Martinez de Carvalho

**Mapeamento Genético do locus 1q 24.2 – 1q 31.3 em famílias segregando
periodontite agressiva**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia

Aprovada em 9 de outubro de 2009.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco
Faculdade de Odontologia da UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dra. Marilisa Lugon Ferreira Terezan
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dra. Maria Eliza Barbosa Ramos
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dra. Iêda Maria Orioli
Instituto de Biologia da UFRJ

Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira
School of Dental Medicine, University of Pittsburgh

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alexandre e Florinda, pelo amor, apoio e dedicação presentes em toda a minha vida.

A minha irmã, Gabriela, pelo carinho e compreensão.

Ao casal Nara e Paul Johnson pela acolhida calorosa durante meu estágio nos EUA.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me mantido firme e saudável para a conclusão de mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Aos pacientes que se dispuseram a participar deste estudo.

Ao meu orientador, Eduardo Tinoco, pela amizade, confiança, orientação exemplar e preocupação constante.

Ao meu orientador no exterior, Alex Vieira, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos preciosos e apoio financeiro fundamental para a realização deste estudo. A sua esposa, Adriana Modesto e filhos, pelo carinho e bons momentos compartilhados.

A CAPES, pela bolsa auxílio oferecida durante o estágio no exterior.

Aos meus colegas de laboratório, Wendy Carricato, Kathleen Deeley, Joe Ruff, Melissa Carp, Ariadne Letra e Renato Menezes, e a todos os funcionários da PITT, pelo carinho, paciência e apoio técnico fundamentais para a minha adaptação.

A Dra. Mary Louise Marazita por ter disponibilizado o laboratório e as professoras Manika Govil e Karen Cuenco para as análises estatísticas.

Aos novos AMIGOS Ariadne Letra, Renato Menezes e pequeno Lucas, pelos momentos de descontração, demonstrações diárias de amizade, horas de conversa e litros de café ao longo deste ano nos EUA.

A minha querida roommate e irmã adotiva Cecília Pereira Stabile, pela excelente companhia, cuidado e carinho neste nosso ano longe de casa. Tudo foi mais fácil contigo por perto, guria !!! Toda a minha admiração e amizade !!!

A toda a minha família, pelo amor e carinho tão importantes na minha vida.

Aos meus velhos e novos AMIGOS, pelo apoio e incentivo. Em especial, as minhas amigas Fernanda Brito e Flávia Pessanha, por estarem sempre ao meu lado e pelas horas de skype neste ano fora do país.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO, Denise Gomes da Silva, Márcio Falabela e Henrique Teixeira, e aos funcionários, pela ajuda e incentivo durante a fase de exame clínico dos pacientes.

Ao Coordenador da Pós-Graduação FO-UERJ, Prof. Ricardo Fischer, minha admiração e agradecimento especial por todos esses anos de convívio e aprendizado.

A todos os professores e funcionários da FO-UERJ que acompanham minha jornada desde a graduação, meu muito obrigada.

RESUMO

CARVALHO, Flavia Martinez de. **Mapeamento Genético do locus 1q 24.2 – 1q 31.3 em famílias segregando periodontite agressiva.** 2009. 105f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Um estudo sugere que o fenótipo da periodontite agressiva localizada está ligado a região 1q25. O objetivo do presente estudo foi aperfeiçoar o mapeamento genético da periodontite agressiva na região cromossômica supracitada em famílias clinicamente bem caracterizadas segregando a doença. A hipótese deste estudo é que variações genéticas localizadas no cromossomo 1 entre as regiões 1q 24.2 e 1q 31.3 contribuem para o fenótipo da periodontite agressiva. Como objetivos específicos, determinamos o modo de herança da periodontite agressiva através de análise de segregação, e verificamos a existência de ligação e/ou associação entre a região 1q 24.2-1q 31.3 e a periodontite agressiva. A análise de segregação foi executada no programa SEGREG do pacote SAGE versão 5.4.2 com base nos dados dos pedigrees das primeiras 74 famílias recrutadas neste estudo, totalizando 475 indivíduos (média de 6.4 indivíduos por família) de origem geográfica similar. Assumiu-se a herança Mendeliana como um locus autossômico com 2 alelos A e B, onde o alelo A estava associado ao fenótipo relevante. Cinco modos de transmissão (não homogêneo, Mendeliano homogêneo, homogêneo geral, semigeral, heterogêneo geral) foram testados assumindo que a prevalência da periodontite agressiva é de 1% sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram coletadas amostras de saliva de 54 das 74 famílias recrutadas, totalizando 371 amostras de saliva para a extração do DNA genômico. 21 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) foram selecionados dentro da região proposta e analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os genótipos foram obtidos pelo método TaqMan. A análise não paramétrica de ligação familiar foi executada com o Programa Merlin. As detecções de transmissão (associação) foram executadas com os programas FBAT e PLINK. O modo de herança mais adequado para cada teste de susceptibilidade dos alelos executado foi o modelo semigeral ($p=0,31$). Este modelo de transmissão sugere que os alelos de risco para a periodontite agressiva são transmitidos pelos pais heterozigotos, fornecendo suporte para a hipótese que variantes genéticas exercem um papel importante na patogênese da periodontite agressiva e que poucos loci com efeitos relativamente pequenos contribuem para a doença, independente da interação com fatores ambientais. Os resultados mostram uma associação estatisticamente significativa entre os SNPs rs1935881 (G>A) e rs1342913 (A>G) localizados no gene *FAM5C* e a periodontite agressiva ($p=0,03$). O sequenciamento das regiões codificantes de *FAM5C* não apresentaram mutação, mas foram encontradas duas mutações em íntrons do gene *FAM5C* próximas aos SNPs rs57694932 (A>G) e rs10494634 (A>T). Estas variantes não estão associadas a periodontite agressiva nesta população. Por outro lado, o haplótipo rs1935881-rs1342913 está associado a periodontite agressiva ($p=0,009$). Os resultados deste estudo suportam a hipótese de que o gene *FAM5C* contido na região 1q 24.2 a 1q 31.3 contribui para a etiopatogenia da periodontite agressiva e, portanto, pode ser sugerido como gene candidato.

Palavras-chave: Periodontite agressiva. Mapeamento genético. Análise de segregação. Polimorfismos genéticos. Estudo de ligação e associação.

ABSTRACT

It has been suggested that the localized aggressive periodontitis phenotype is linked to the region 1q25. The aim of this study was to fine map the chromosome interval suggested as containing a localized aggressive periodontitis locus in clinically well characterized group of families segregating aggressive periodontitis. The hypothesis of this study is that genetic variation located between 1q24.2 to 1q31.3 contributes to the phenotype of aggressive periodontitis. As specific aims, we evaluated the inheritance mode of aggressive periodontitis performing segregation analysis and, we tested the presence of linkage and or association between the target region of chromosome 1 and aggressive periodontitis. Segregation analysis was performed in pedigree data from the first 74 families, comprised of 475 individuals (average of 6.4 individuals per family) with similar geographic origin by the use of the SEGREG program of SAGE v.5.4.2. Mendelian inheritance was assumed to be through an autosomal locus with two alleles A and B, where the A allele was associated with the relevant phenotype. Five inheritance modes (homogeneous no transmission, homogeneous Mendelian transmission, homogeneous general transmission, semi-general transmission, heterogeneous general transmission) were tested assuming the prevalence of aggressive periodontitis as 1% and no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. Saliva samples were collected from 54 families, 371 individuals and DNA was extracted from this biological material. Twenty-one single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected and analyzed by standard polymerase chain reaction. The genotypes were obtained by the TaqMan method. The non-parametric analysis of familial linkage was performed with Merlin software. Analyses of transmission detection (association) were performed by FBAT and PLINK programs. The most parsimonious mode of inheritance in each susceptibility type tested was the semi-general transmission mode ($p=0,31$). This mode suggests an excess of risk alleles being transmitted from heterozygous parents. This result provides strong support for the hypothesis that genetic factors play a role in aggressive periodontitis and that a few loci, each with relatively small effects, contribute to aggressive periodontitis, with or without interaction with environmental factors. We found a statistically significant association between the SNPs rs1935881 (G>A) and rs1342913 (A>G) in the *FAM5C* gene and aggressive periodontitis ($p=0.03$). Sequence analysis of *FAM5C* coding regions did not disclose any mutations, but two variants in intronic regions of *FAM5C* gene: rs57694932 (A>G) and rs10494634 (A>T) were found. The two variants are not associated with aggressive periodontitis in this population. A stronger association could have been seen between aggressive periodontitis and the haplotypes rs1935881-rs1342913 ($p=0.009$). This study supports the hypothesis that *FAM5C* gene might contribute to aggressive periodontitis and then, could be suggested as a candidate gene.

Keywords: Aggressive periodontitis. Genetics mapping. Segregation analysis. Genetics polymorphisms. Linkage and association study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ilustração do protocolo para a coleta de saliva utilizando o coletor ORAGENE.....	34
Figura 2-	Resultados obtidos pelo método Taqman para o marcador rs1175111	38
Figura 3-	Gráfico de desequilíbrio de ligação ilustrando a região dos SNPs selecionados no cromossomo 1	41
Figura 4-	Representação esquemática do gene <i>FAM5C</i> e sua localização no genoma	44
Figura 5-	Foto do gel de agarose a 1%.....	46
Figura 6-	Visualização da região do gene <i>FAM5C</i> na base de dados UCSC Genome Bioinformatics.....	47
Figura 7-	Exemplo de heredograma de uma das famílias avaliadas	52
Figura 8-	Gráfico de desequilíbrio de ligação dos 14 primeiros SNPs selecionados	60
Figura 9-	Gráfico de desequilíbrio de ligação dos 21 SNPs selecionados	67
Figura 10-	Gráfico de comparação entre espécies da sequência de nucleotídeos do SNP rs1935881.....	72
Figura 11-	Gráfico de comparação entre espécies da sequência de nucleotídeos do SNP rs1342913.....	73
Figura 12-	Gráfico de desequilíbrio de ligação	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos inicialmente selecionados.....	37
Quadro 2-	Novos SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos inicialmente selecionados.....	40
Quadro 3-	Lista dos genes candidatos a periodontite descritos por Covani, Marconcini, Giacomelli, Sivozhelevov, Barone e Nicolini.....	42
Quadro 4-	Primers utilizados no sequenciamento dos éxons do gene <i>FAM5C</i>	45
Quadro 5-	Primers utilizados no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas do gene <i>FAM5C</i>	48
Quadro 6-	Novos SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos.....	49
Quadro 7-	Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs1935881 associado a periodontite agressiva e localizados no gene <i>FAM5C</i>	71
Quadro 8-	Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs1342913 associado a periodontite agressiva e localizados no gene <i>FAM5C</i>	71
Quadro 9-	Fenótipo e as variantes alélicas encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de <i>FAM5C</i>	74
Quadro 10-	Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs57694932.....	74
Quadro 11-	Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs10494634.....	75
Quadro 12-	Quatro SNPs que fizeram parte das análises adicionais posição no cromossomo região no gene e troca de bases dos polimorfismos.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Número de indivíduos por fenótipo e gênero nas 76 famílias com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probando) e média de idade.....	50
Tabela 2-	Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias e a variação de tamanho das famílias.....	50
Tabela 3-	Distribuição das subclassificações da periodontite agressiva entre os probandos e seus familiares nas 76 famílias.....	51
Tabela 4-	Número de indivíduos por fenótipo e gênero nas primeiras 74 famílias submetidas a análise de segregação com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probando).....	51
Tabela 5-	Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias submetidas a análise de segregação e a variação de tamanho dessas famílias.....	51
Tabela 6-	Distribuição das subclassificações da periodontite agressiva entre os probandos e seus familiares em cada uma das 74 famílias submetidas a análise de segregação.....	52
Tabela 7-	Número de indivíduos por fenótipo e sexo nas 54 famílias com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probando) e média de idade.....	53
Tabela 8-	Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias e a variação de tamanho das famílias.....	53
Tabela 9-	Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com periodontite agressiva.....	55
Tabela 10-	Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.....	61
Tabela 11-	Resultados da análise de ligação familiar.....	62
Tabela 12-	Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 14 primeiros SNPs selecionados na região de interesse 1q 31.1.....	63
Tabela 13-	Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 7 SNPs adicionais selecionados na região do gene <i>FAM5C</i>	64

Tabela 14-	Resultados do teste de Hardy-Weinberg dos 21 SNPs selecionados neste estudo.....	65
Tabela 15-	Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 21 SNPs selecionados no estudo.....	66
Tabela 16-	Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.....	67
Tabela 17-	Resultados dos haplótipos de 2 janelas (agrupando os marcadores de 2 em 2) de todos os SNPs genotipados.....	68
Tabela 18-	Resultados dos haplótipos de 3 janelas (agrupando os marcadores de 3 em 3) de todos os SNPs genotipados.....	68
Tabela 19-	Resultados dos haplótipos de 4 janelas (agrupando os marcadores de 4 em 4) de todos os SNPs genotipados.....	69
Tabela 20-	Resultados dos haplótipos de 5 janelas (agrupando os marcadores de 5 em 5) de todos os SNPs genotipados.....	69
Tabela 21-	Rank dos 30 primeiros genes candidatos na região de interesse 1q 24.2 a 1q 31.3.....	70
Tabela 22-	Rank dos genes candidatos na região de interesse 1q 31.1 a 1q 31.2.....	70
Tabela 23-	Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.....	77
Tabela 24-	Resultados dos haplótipos de 2 3 e 4 janelas dos 4 SNPs que fazem parte das análises adicionais.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontia
AIC	Índice de Akaike
BLAST	Basic local alignment search tool
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPH	Centro de Estudos do Polimorfismo Humano
DNA	Ácido desoxiribonucléico
FAM5C	Membro C da família com sequência de similaridade 5
FBAT	Family based association test
FcγR	Receptor Fc gama
FPR1	Receptor formilpeptídeo 1
GOLD	Graphical overview of linkage disequilibrium
HLA	Antígeno leucocitário humano
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1RN	Receptor de Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
INF- α	Interferon alfa
INF- δ	Interferon gama
LOD	Logarítmo de Odds
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PA	Periodontite agressiva
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento plaquetário
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UCSC	Universidade de Santa Cruz da Califórnia
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UNIGRANRIO	Universidade do Grande Rio
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Conceitos importantes em genética	19
1.2	Evidências da importância da genética na etiopatogenia da periodontite agressiva	22
1.3	Alguns exemplos de estudos de genes candidatos a periodontite agressiva	25
2	OBJETIVO	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	População estudada	29
3.2	Definição do fenótipo	30
3.2.1	<u>Definição dos casos de periodontite agressiva</u>	30
3.2.2	<u>Definição dos casos de periodontite crônica</u>	31
3.3	Análise de segregação	32
3.4	Coleta de material biológico	33
3.5	Extração do DNA	34
3.6	Quantificação e diluição do DNA	35
3.7	Seleção dos polimorfismos de um único nucleotídeo	36
3.8	Genotipagem	37
3.9	Análise do desequilíbrio de ligação	39
3.10	Análise de ligação familiar	39
3.11	Associação e análise dos haplótipos	40
3.12	Experimentos de bioinformática	42
3.13	Sequenciamento dos éxons do gene <i>FAM5C</i>	43
3.14	Sequenciamento das regiões conservadas de <i>FAM5C</i>	47
3.15	Análises adicionais	48
4	RESULTADOS	50

4.1	Caracterização da população analisada.....	50
4.2	Determinação do modo de herança.....	53
4.3	Desequilíbrio de ligação.....	60
4.4	Análise de ligação familiar.....	61
4.5	Associação e análise dos haplótipos.....	62
4.6	Experimentos de bioinformática.....	69
4.7	Sequenciamento dos éxons de <i>FAM5C</i>.....	73
4.8	Sequenciamento dos regiões conservadas de <i>FAM5C</i>.....	73
4.9	Genotipagem e análises adicionais.....	75
5	DISCUSSÃO.....	78
6	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE – Artigo: Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes.....	99
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ.....	105

INTRODUÇÃO

O termo periodontite é usado para descrever um grupo de doenças crônicas infecciosas multifatoriais caracterizado pela destruição progressiva das estruturas de suporte dos dentes. Enquanto aspectos da microflora patogênica e fatores de risco comportamentais e ambientais estão envolvidos na etiopatogenia da doença e bem relatados na literatura¹, evidências sugerem também um componente genético atuando na etiologia da periodontite² e interferindo no acometimento precoce, severidade e no risco individual em desenvolver a doença³.

Estudos epidemiológicos mostram que o risco a periodontite não é igual em todos os indivíduos. Løe, Anerud, Boysen e Morrison⁴ observaram, em um grupo de plantadores de chá do SriLanka com pobre higiene oral e sem acesso a tratamento dentário, que apenas alguns indivíduos desenvolveram a forma severa da doença enquanto outros permaneceram com a forma branda ou não desenvolveram a periodontite. Esta variação na expressão da periodontite pode ser explicada por diferenças nos níveis individuais de susceptibilidade a doença. Uma vez que a susceptibilidade do hospedeiro a doença pode ser definida em termos de variações genéticas, o foco atual de grande parte dos estudos em periodontia tem sido a identificação de genes polimórficos envolvidos com a doença como uma tentativa de, futuramente, melhorar a avaliação de risco individual a periodontite.

A evidência de susceptibilidade genética a periodontite tem como origem estudos em gêmeos⁵⁻⁶, estudos de ligação⁷ e análises de segregação em famílias com periodontite agressiva⁸⁻⁹ e estudos de associação entre polimorfismos em genes candidatos e a periodontite¹⁰⁻¹¹. Atualmente, um número expressivo de estudos sobre a genética na periodontite nos mostra que a presença de fatores de risco genéticos aumenta diretamente a probabilidade de desenvolvimento da periodontite e, a ausência destes fatores, reduz esta probabilidade¹².

As periodontites podem ser classificadas em periodontite crônica e periodontite agressiva (PA). A periodontite crônica, anteriormente chamada de periodontite do adulto, apresenta evolução lenta e atinge cerca de 30% da população adulta norte-americana¹³. A PA é uma forma mais rara da doença com progressão acelerada da doença em indivíduos mais jovens¹⁴. Os indivíduos acometidos por PA apresentam quantidade de placa bacteriana e cálculo aderidos sobre as superfícies dentárias inconsistentes com a grande destruição periodontal, elevada proporção dos microrganismos *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg), defeitos funcionais dos neutrófilos e hiperreatividade de macrófagos¹⁵. Segundo a classificação atual da Academia Americana de Periodontia (AAP), o termo PA inclui as antigas nomenclaturas designadas a doença, como: periodontite de início precoce, periodontite juvenil e periodontite de progressão rápida¹⁶. A PA pode ser clinicamente diagnosticada e subdividida em localizada e generalizada. A forma localizada tem início na puberdade, apresenta intensa resposta de anticorpos aos microrganismos e a destruição óssea limita-se aos primeiros molares e/ou incisivos com perda óssea vertical interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, sendo pelo menos um deles primeiro molar. Já a forma generalizada se estabelece anteriormente aos 35 anos de idade; os indivíduos acometidos apresentam uma fraca resposta de anticorpos aos agentes agressores, destruição óssea acentuada e perda de inserção interproximal em pelo menos três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos¹³. Um estudo longitudinal de 6 anos de acompanhamento mostrou que 35% dos casos de PA localizada parecem progredir para a forma generalizada da doença. Estes resultados sugerem que a principal diferença entre as formas localizada e generalizada da PA está no número e tipo de dentes acometidos já que ambas progridem de forma similar¹⁷.

A prevalência da PA varia entre diferentes etnias e países¹⁸. Estima-se que esta variação seja entre 0,1% e 15% entre Caucasianos, Hispânicos e Afro-Americanos^{14,19-20}. Em países industrializados varia de 0,1% a 0,3%, podendo chegar a 2% em outros países²¹. Os dados disponíveis na população brasileira indicam uma prevalência de 0,3% a 3,66%²²⁻²³. Também foi relatada a existência de agregação familiar²⁴⁻²⁶ e geográfica^{22,27-29}. Estudos populacionais caso-controle³⁰⁻³³ e estudos em famílias³⁴⁻³⁵ sugerem que, os polimorfismos genéticos em diferentes genes, parecem exercer uma forte influência na suscetibilidade a PA. Estes dados, em conjunto com a baixa média de idade dos indivíduos afetados, sugerem uma forte influência genética nesta condição.

Embora seja evidente que a PA é uma desordem genética rara, poucos estudos de ligação têm sido desenvolvidos para identificar um locus associado com a doença e nenhuma variante genética tem sido confirmada em diferentes grupos populacionais como responsável por esse fenótipo⁷. Genes candidatos para periodontite agressiva tem sido investigados utilizando-se diferentes abordagens e ferramentas de bioinformática e sugeridos como associados a doença^{3,36}, porém os resultados até o momento são muito diversos e conflitantes. A melhor evidência vem de um estudo genético de ligação em famílias exibindo o fenótipo da periodontite agressiva localizada, o qual indicou ligação

entre o fenótipo e o marcador D1S492 localizado no cromossomo 1q 31.1⁷. A análise dos haplótipos deste intervalo no braço longo do cromossomo 1 associado ao marcador supracitado, indicou a existência de um locus de susceptibilidade para a periodontite agressiva localizada de aproximadamente 26 milhões de pares de base entre os marcadores genéticos D1S196 e D1S533. Essa região do cromossomo 1 abrange 1q 24.2 e 1q 31.3. Sendo assim, o objetivo principal dessa tese foi aperfeiçoar o mapeamento genético da periodontite agressiva nesta região em famílias clinicamente bem caracterizadas segregando a periodontite agressiva.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Conceitos importantes em genética

O genoma humano é formado por mais de 3 bilhões de pares de bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina, Guanina) organizadas em 22 pares de cromossomos autossomos e 1 par de cromossomos sexuais (XX para mulheres e XY para homens). O código genético humano está contido nas sequências de nucleotídeos que compõem o ácido desoxiriboncléico (DNA). Um nucleotídeo é composto por 3 partes: uma base nitrogenada (Purinas – adenina e guanina ou Pirimidinas – timina e citosina), um açúcar tipo pentose e um grupo fosfato³⁷.

Os genes são sequências de nucleotídeos no DNA e consistem de duas partes: uma região promotora e uma região codificante. A maioria dos genes é interrompida por uma ou mais regiões não-codificantes (íntrons). Os íntrons estão alternados com éxons, os segmentos dos genes que, determinam a sequência de aminoácidos da proteína, bem como determinam as sequências flanqueadas que contém regiões não-traduzidas 5' e 3'³⁷. O gene é a unidade fundamental da hereditariedade, um segmento de cromossomo que corresponde a um código único com informação específica da sequência de aminoácidos para produzir as proteínas correspondentes. Atualmente, o projeto genoma humano estima a existência de 25.000 a 35.000 genes³⁸.

A composição genética de um organismo é chamada de genótipo e, o conjunto de características ou traços determinado por interações entre o genótipo e o meio ambiente é chamado de fenótipo. O fenótipo é qualquer característica ou traço observável de um genótipo: morfologia, desenvolvimento, bioquímica, propriedades fisiológicas ou comportamentais. As doenças podem ser controladas por um único gene (monogênicas), por poucos genes (oligogênicas) ou por muitos genes sofrendo interações ambientais variáveis (poligênicas)³⁷. O termo doença multifatorial complexa é utilizado para descrever condições como a periodontite, hipertensão, doença de Alzheimer e obesidade entre outras, nas quais as contribuições de diferentes genes e as contribuições ambientais são variáveis e ainda não completamente compreendidas.

Um outro grupo de definições importantes em genética refere-se a localização física das variantes genéticas, comumente referidas como mutações. Um locus (ou vários

loci) é uma posição fixada no cromossomo que deve ser ocupada por um gene ou por vários genes. As formas variantes de um gene que podem ocupar um locus específico são chamadas alelos. Os alelos podem ser comuns ou raros. O alelo tipo selvagem é um alelo considerado comum ou normal para o organismo; o oposto ocorre com o alelo mutante ou raro normalmente associado a modificações. O polimorfismo genético é a existência de diferentes alelos de um gene em uma população humana como resultado de mutações no DNA com uma frequência esperada na população de pelo menos 1%³⁹. Aproximadamente 1 em cada 1.000 pares de bases do genoma humano diferem em um dos dois cromossomos homólogos. Estudos que comparam o genoma de vários indivíduos dentro de uma população ou em diferentes populações indicam a existência de polimorfismos a cada poucas centenas de pares de bases⁴⁰⁻⁴¹. Existem vários tipos de polimorfismos no genoma. Vários polimorfismos são devido a variantes decorrentes de deleções, inserções, transições ou duplicações de um par de base a centenas ou milhares de pares de base de DNA. Os polimorfismos podem não estar associados a fenótipos de doenças conhecidas ou ser variantes raras e claramente associadas a doenças graves.

O tipo mais comum de polimorfismo genético é o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP). É uma forma variante de um par de base da sequência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma população dentro de um espectro considerado biologicamente normal¹⁰, podendo ocorrer tanto em regiões codificantes (éxons) como em regiões não codificantes (íntrons, regiões não traduzidas 5' e 3') ou ainda em regiões intergênicas sem função conhecida. Muitos SNPs que ocorrem nos genes não tem efeito na proteína codificada, enquanto um grande número de SNPs tem efeitos biológicos importantes no produto genético. Por exemplo, se a substituição do nucleotídeo ocorre na região codificadora de um gene, isto pode provocar uma substituição de um aminoácido que por sua vez pode resultar em uma proteína não-funcional (mutação não-sinônima) ou não mudar a sequência de aminoácidos de uma proteína (mutação sinônima). Existem 2 tipos de mutação não-sinônima: a mutação de sentido trocado que codifica para um aminoácido diferente e, a mutação sem sentido que codifica para um códon de parada, interrompendo a proteína antes do seu término.

Os polimorfismos são os elementos chave em pesquisa genética humana. Após a genotipagem de uma população, para um ou para vários polimorfismos, é possível calcular as frequências alélicas e genotípicas e observar a diferença das frequências entre os casos e controles. Quando um determinado alelo ou genótipo está associado a doença, estudos

funcionais podem ser conduzidos com o objetivo de pesquisar a função do polimorfismo na patogênese da doença. Por exemplo, a hipótese de que a forma alélica variante possa estar associada a função alterada de um gene em particular e conseqüentemente possa exercer algum papel na etiologia da PA pode ser analisada através das frequências desses polimorfismos em indivíduos afetados. Sendo assim, os polimorfismos têm sido utilizados como marcadores para localizar genes associados a doenças em estudos genéticos populacionais de ligação e associação¹².

Existe uma diferença importante entre a função que os genes desempenham nas doenças monogênicas (Mendelianas) e nas doenças poligênicas (multifatoriais complexas) como a periodontite. Nas desordens monogênicas, os genes são referidos como causais porque a presença de uma determinada mutação é suficiente para levar a doença. Os genes envolvidos em doenças complexas são chamados de genes susceptíveis porque os indivíduos que os possuem não necessariamente desenvolverão a doença, precisam estar expostos a fatores ambientais deletérios, como por exemplo: microrganismos, fumo, higiene oral precária. Cada gene fornece uma pequena contribuição, um risco relativo para o desenvolvimento da doença. Estes genes são considerados genes modificadores da doença⁴². É importante ressaltar que o número e o tipo de genes atuando na periodontite não necessariamente são os mesmos nas formas crônica e agressiva da doença e entre os diferentes grupos étnicos. Além disso, ocorrem importantes interações entre os genes e os fatores ambientais que podem alterar a função do gene no desenvolvimento da doença¹⁸.

Muitas doenças multifatoriais complexas – infarto do miocárdio, câncer, obesidade, doença de Alzheimer, periodontite – ocorrem em famílias. A agregação familiar pode ser explicada pelo fato de que os membros de uma mesma família compartilham sua informação genética e estão expostos aos mesmos fatores ambientais (interações gene-gene e gene-ambiente) por apresentar localização geográfica similar em uma proporção maior do que em indivíduos escolhidos aleatoriamente na população. Sendo assim, os parentes de um indivíduo afetado (probanda) possuem uma maior chance de ter as mesmas interações gene-gene e gene-ambiente que levaram o probanda a desenvolver a doença do que indivíduos não relacionados ao probanda³⁷.

1.2 Evidências da importância da genética na etiopatogenia da periodontite agressiva

Existe uma variedade imensa de métodos para demonstrar a base genética de uma doença. Alguns métodos, considerados mais gerais, não permitem associações diretas entre os genes e a doença, enquanto outros possibilitam a identificação de variantes genéticas que participam na etiopatogenia da doença. Resultados de estudos de agregação familiar, estudos em gêmeos, e de estudos genéticos tradicionais (análises de segregação, estudos de ligação e estudos de associação) são exemplos de análises genéticas que tem gerado hipóteses e ligações importantes entre a genética e a periodontite.

A agregação familiar de uma doença pode sugerir a etiologia genética da condição. Normalmente as famílias dividem fatores ambientais e comportamentais, além dos agentes infecciosos que também agrupam-se em famílias²⁶. Existem vários estudos na literatura sugerindo a agregação familiar na periodontite agressiva^{22,25,43}.

Os genes são transmitidos dos pais aos filhos de uma forma predizível e, é esperado que os genes segreguem-se nas famílias seguindo o padrão descrito nas Leis de Mendel⁴⁴. O método utilizado para estudar o modelo de transmissão de um traço ou de uma doença em famílias chama-se análise de segregação. Na análise de segregação, o padrão observado em uma doença é comparado com aqueles esperados sob vários modelos de herança com o objetivo de selecionar o modelo de herança mais adequado. É possível distinguir se a transmissão segue um padrão mendeliano ou outro modo de transmissão. O poder estatístico deste método depende do número e da composição das famílias, além da heterogeneidade da doença estudada. Este tipo de estudo não permite a identificação de um gene específico responsável pela doença².

Ao longo das últimas décadas, vários pesquisadores tem determinado o provável modo de herança da PA através de análises de segregação em famílias afetadas pela doença, analisando a estrutura dos pedigrees e a distribuição dos indivíduos exibindo o fenótipo em questão. A PA sugere um padrão de herança Mendeliano e, tanto os modos de transmissão autossômicos dominante^{9,45} e autossômico recessivo^{8,19,46-48} quanto o ligado ao sexo⁴⁹⁻⁵² tem sido propostos. O maior estudo de análise de segregação da periodontite agressiva foi desenvolvido por Marazita, Burmeister, Gunsolley, Koertge, Lake e Schenkein⁹ em 104 famílias de etnia Afro-Americana e Caucasiana, totalizando 631 indivíduos. Os autores concluíram que o modo de herança mais adequado nestas famílias foi o autossômico recessivo com penetrância de 70% entre os Afro-Americanos e de 73%

entre os Caucasianos. Como a maior parte dos estudos de análise de segregação relatados acima foram realizados em Afro-Americanos, é possível que outros modos de herança possam existir em diferentes populações¹⁸. Todos os resultados acima descritos sustentam a hipótese de um gene principal atuando na etiologia da periodontite agressiva .

Por outro lado, os estudos de ligação e os estudos de associação são utilizados para mapear alelos relacionados a doença em regiões específicas do cromossomo e descobrir como os alelos segregam-se durante a meiose. A análise de ligação familiar é o primeiro passo para localizar um gene específico e baseia-se no fato que os alelos de loci próximos tendem a segregar-se por diferentes gerações em uma mesma família¹⁸. Os estudos de ligação tem sido muito eficientes na identificação da predisposição genética de doenças monogênicas. Já em doenças multifatoriais complexas, os estudos de ligação não tem tido muito êxito por uma série de razões como número insuficiente de indivíduos analisados, heterogeneidade genética da doença, assim como diferentes parâmetros clínicos utilizados para a definição da doença⁵³. Um dos fatores limitantes é o fato das doenças multifatoriais complexas serem resultado de efeitos combinados de múltiplos genes com pequeno efeito individual⁵⁴. Felizmente, a disponibilidade de novas abordagens dos estudos de associação representam uma alternativa para esse problema⁵⁵. Poucos estudos de ligação familiar da PA tem sido realizados e os resultados disponíveis são conflitantes. Por exemplo, a ligação da PA localizada ao locus do grupo componente específico da proteína de ligação da vitamina D (Gc) no cromossomo 4 em uma população americana proveniente da região de Brandywine⁵⁶ não foi reproduzida em uma população diferente⁵⁷. A análise de ligação genética em 4 famílias segregando PA localizada mostrou que o marcador D1S492 no cromossomo 1 está em ligação com o fenótipo da forma localizada da doença⁷. Sendo assim, a análise de ligação é capaz de identificar a localização cromossômica do gene que tenha um efeito importante no aumento da susceptibilidade a doença na população estudada.

Os estudos de associação fornecem informações sobre o gene ou os genes pesquisados e o grau de associação dos mesmos com a doença alvo. Existem dois tipos de estudos de associação: estudos populacionais e estudos familiares⁵⁸. Nos estudos de associação com base populacional, a frequência dos alelos e dos genótipos é comparada entre os casos e os controles. Um resultado positivo de associação não necessariamente representa uma ligação biológica entre a doença e um alelo. Este resultado pode ser explicado pela interação entre vários componentes ambientais, causando um aumento da

frequência tanto do marcador como da doença em uma determinada população; pelo perfil étnico não corretamente pareado entre os casos e os controles, ou pela casualidade⁵⁹. Testes de associação familiar utilizam o fenótipo da doença e o genótipo obtido a partir dos marcadores selecionados para a análise, buscando a co-segregação familiar deles. Ambos os tipos de estudos de associação apresentados analisam se o alelo associado com a doença aparece mais frequentemente do que seria esperado ao acaso. Em doenças multifatoriais complexas (periodontite), os estudos de associação representam um meio alternativo para a localização de genes susceptíveis, principalmente porque os estudos de associação podem, algumas vezes, detectar pequenos efeitos de genes não detectados por estudos de ligação⁶⁰.

Os genes que potencialmente representam um papel na etiologia de uma alteração em particular são denominados candidatos aquela alteração. A maioria dos genes candidatos a PA foram originalmente sugeridos através de estudos de associação de polimorfismos em diversos genes relacionados a resposta imunológica do hospedeiro a doença, como por exemplo: interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), receptor Fc gama (Fc γ R), antígeno leucocitário humano (HLA), receptor de vitamina D (VDR) entre outros¹⁸. Os SNPs dentro de genes candidatos podem estar associados a mudanças na expressão, estrutura e função da proteína produzida pelo gene alvo, fato que pode levar a variações importantes na expressão do fenótipo⁶¹. Os estudos de associação em populações afetadas por PA utilizando SNPs em genes candidatos apresentam resultados conflitantes, variando principalmente com a etnia da população analisada. Essa variação sugere a existência de heterogeneidade genética na periodontite agressiva, informação consistente com o fato do fenótipo em questão apresentar etiologia multifatorial complexa, ou seja, resultar da interação entre diversos polimorfismos genéticos e fatores ambientais⁶². Análises de polimorfismos genéticos em larga escala, em uma mesma população através da técnica de varredura com chips, contendo de centenas a milhares de SNPs, representa um grande avanço dos estudos genéticos de doenças multifatoriais, mas ainda possui um custo elevado. A alternativa para essa limitação é a seleção de SNPs em regiões de genes candidatos ou em regiões cromossômicas previamente associadas ao fenótipo alvo⁵⁴.

1.3 Alguns exemplos de estudos de genes candidatos a periodontite agressiva

A IL-1 executa um papel importante na etiopatogenia da periodontite. A contribuição desta citocina para a resposta inflamatória do hospedeiro a doença depende do equilíbrio entre a interleucina-1 alfa (IL-1 α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o receptor da interleucina-1 (IL-1RN). As duas primeiras são moléculas próinflamatória funcionalmente bem similares e a última é uma molécula antiinflamatória que compete como receptor da IL-1 α e da IL-1 β ¹⁸. O gene da IL-1, localizado no cromossomo 2 (2q14), possui frequência elevada de polimorfismos diretamente relacionado com a super expressão desta família de citocinas e com uma variedade de doenças auto-imunes e inflamatórias, como a doença inflamatória de Bowel⁶³, osteoporose⁶⁴ e câncer gástrico em indivíduos com hipocloridria na presença do *H. Pylori*⁶⁵. Vários estudos associam o aumento da susceptibilidade a PA com os polimorfismos na IL-1 β +3954^{30,66-67}. Outros polimorfismos genéticos na IL-1, incluindo IL-1 α -889, IL-1RN, IL-1 α +4845 e IL-1 β -511, tem apresentado resultados de associação contraditórios com a PA em diferentes grupos étnicos⁶⁸⁻⁷⁰. Um estudo recente de Fiebig, Jepsen, Loos, Scholz, Schafer, Ruhling et al.⁷¹ não encontrou associação entre 10 SNPs no gene da IL-1 e a periodontite agressiva em uma população extensa de Caucasianos do Norte Europeu. Os resultados contraditórios dificultam conclusões definitivas sobre a associação do gene da IL-1 com a PA.

A IL-4 é uma citocina antiinflamatória com importantes funções moduladoras sobre as células B e macrófagos. O gene da IL-4 localiza-se no cromossomo 5 (5q31.1). Variantes no gene da IL-4 devem aumentar a severidade da PA por subregular a produção de IL-4³¹, mas outros estudos não encontraram associação entre polimorfismos no gene da IL-4 e o risco a PA em diferentes grupos étnicos⁷²⁻⁷³. A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina sintetizada em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios por células como macrófagos e neutrófilos. Variações individuais na habilidade para sintetizar e secretar a IL-6 parecem modular a predisposição para doenças inflamatórias como a aterosclerose e a artrite reumatóide⁷⁴⁻⁷⁵. Grande parte dessas variações individuais podem ser explicadas por polimorfismos no gene da IL-6 que localiza-se no cromossomo 7 (7p21)⁷⁶⁻⁷⁷. Nibali, Griffiths, Donos, Parkar, D'Aiuto, Tonetti et al.³² encontraram uma associação entre variantes polimórficas no gene da IL-6 e o aumento da susceptibilidade a PA e, recentemente publicaram uma associação moderada entre polimorfismos no gene da IL-6 e a PA⁷⁸.

O TNF α é uma potente citocina proinflamatória capaz de induzir destruição tecidual e reabsorção óssea. Muitos polimorfismos genéticos tem sido identificados na região promotora do gene desta citocina que localiza-se no cromossomo 6 (6p21.3)⁷⁹. Kinane, Hodge, Eskdale, Ellis e Gallagher⁸⁰ não encontraram ligação entre um polimorfismo no gene TNF α e a PA. Vários estudos posteriores também não confirmaram esta associação em diferentes populações⁸¹⁻⁸². Havemose-Poulsen, Sorensen, Stoltze, Bendtzen e Holmstrup⁸³ observaram que indivíduos com PA apresentam concentrações plasmáticas elevadas de TNF α , mas não existe comprovação que permita considerar os polimorfismos genéticos em TNF α como fatores de risco para a PA⁸⁴.

Os polimorfismos no gene VDR, localizado no cromossomo 12 (12q13.11), estão associados com parâmetros de homeostase óssea e com as doenças nas quais a perda óssea é um sinal clínico importante¹⁸. Uma significativa associação foi encontrada entre variantes polimórficas no éxon 9 (Taq1) do gene *VDR* e a periodontite agressiva localizada, mas a associação não se confirmou quando os indivíduos com PA generalizada foram incluídos na análise⁸⁵. Dois estudos na população chinesa também confirmaram a associação entre este polimorfismo e a PA⁸⁶⁻⁸⁷, mas os estudos existentes não são suficientes para sugerir os polimorfismos no gene *VDR* como fatores de risco para a PA. Os polimorfismos nos genes Fc γ R, receptores formilpeptídeo 1 (FPR1), antígenos HLA entre outros tem sido estudados como possíveis marcadores genéticos para a susceptibilidade elevada a PA⁸⁸⁻⁹⁰, mas sem resultados conclusivos. Recentemente, Maney, Emecen, Mills e Walters⁹¹ encontraram associação entre uma variante (348T>C) em FPR1 e a PA em Afro-Americanos. Os indivíduos homozigotos para esta variante (348T) possuem um risco maior de desenvolver a PA.

Suzuki, Ji, Numabe, Muramatsu, Gomi e Kanazashi¹¹ genotiparam 310 SNPs em 125 genes candidatos em uma população de 134 casos de PA e 125 controles. Eles obtiveram resultados estatisticamente significantes de associação entre a PA e vários SNPs em múltiplos genes, entre eles: *GNRH*, *PIK3R1*, *DPP4*, *FGL2* e *CALCR*. Esses resultados sugerem que determinados SNPs nesses genes são potenciais marcadores para a PA, mas estudos funcionais são necessários para comprovar o efeito dessas variantes polimórficas sobre a suscetibilidade a PA.

Considerando todas as evidências apresentadas nesta revisão da literatura, parece razoável assumir que a PA possui um componente genético importante atuando na etiopatogenia da doença. Entretanto, até o momento nenhum gene com efeito principal

tem sido identificado nas diferentes populações. Esses resultados refletem a heterogeneidade genética da doença.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Aperfeiçoar o mapeamento genético da PA na região cromossômica sugerida por Li, Xu, Hasturk, Kantarci, De Palma e Van Dyke⁷ em famílias clinicamente bem caracterizadas segregando a doença. A hipótese deste estudo é que o fenótipo da PA em famílias é derivado de uma mutação ou múltiplas mutações em um mesmo gene localizado entre 1q 24.2 a 1q 31.3.

2.2 Objetivos Específicos:

- determinar o modo de herança da PA através de análise de segregação;
- verificar a existência de ligação e/ou associação entre a região 1q 24.2-1q 31.3 e a PA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População estudada

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (projeto 940-CEP/HUPE) (Anexo A) e obteve licença da Universidade de Pittsburgh para a análise do material biológico coletado. Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento antes de serem examinados.

Um total de 76 probandos portadores de periodontite agressiva foram identificados e recrutados no Departamento de Periodontia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), ambas universidades situadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os familiares dos probandos foram posteriormente recrutados para um exame clínico visando o diagnóstico periodontal, totalizando 487 indivíduos. A fim de verificar a presença de perdas ósseas alveolares, foram realizadas radiografias periapicais completas ou panorâmicas. As seguintes informações foram coletadas sob a forma de anamnese pelo mesmo examinador: idade, etnia, sexo, grau de parentesco, hábitos de fumo, medicações em uso e doenças sistêmicas presentes. Fizeram parte dos critérios de exclusão antecedentes de doenças sistêmicas significantes como por exemplo: diabetes mellitus, câncer, doenças coronarianas; além de síndromes, fumo e gravidez.

Cálculos do poder estatístico foram feitos antes do término da coleta dos dados através do método paramétrico proposto por Ploughman e Boehenke⁹², utilizando-se a estrutura das 50 primeiras famílias recrutadas para o estudo. Com base na estrutura das famílias observadas, foram simuladas múltiplas replicações. A frequência da doença na população foi estabelecida como sendo de 1/1000²² e o modo dominante de herança com um nível de penetrância de 70%⁹. O tamanho amostral de 50 famílias nos permitiria um poder estatístico de 96% para obter um logaritmo de Odds (LOD) maior que 3,0. Na presença de heterogeneidade ($\alpha=75\%$), o poder estatístico para obter o LOD de 3,0 ainda mantém-se em 72%. Na presença de heterogeneidade ($\alpha=50\%$) o poder estatístico será de 25%.

Nos pacientes selecionados e seus familiares, foram realizados os seguintes exames clínicos periodontais, em 6 sítios por dente, de todos os dentes presentes na boca exceto terceiros molares, com sonda periodontal da marca HUFRIEDY modelo PCPUNC15:

- profundidade de bolsa: distância entre a margem gengival e a porção mais apical sondável.
- perda de inserção clínica : distância entre a junção amelo-cementária e a porção sondável mais apical.

O nível ósseo alveolar foi mensurado nas radiografias panorâmicas ou periapical completa com o auxílio de um negatoscópio e uma régua milimetrada. Entende-se por nível ósseo alveolar, a distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar. Se alguma restauração dentária estivesse presente na linha da junção amelo-cementária, a localização era então estimada.

3.2 Definição do fenótipo

O diagnóstico da periodontite foi feito baseado no Sistema de Classificação do Workshop Internacional realizado pela AAP em 1999¹⁶ e nos Consensos da mesma época para a classificação da periodontite crônica⁹³ e para a PA⁹⁴ com algumas modificações propostas por Susin e Albandar⁹⁵.

3.2.1 Definição dos casos de periodontite agressiva

Os casos de periodontite agressiva foram definidos como indivíduos com diagnóstico da doença anterior ou até os 35 anos e com os seguintes parâmetros clínicos e/ou radiográficos presentes:

Parâmetros Clínicos:

- Periodontite agressiva generalizada: 10 ou mais dentes com sítios interproximais com perda de inserção clínica e profundidade de bolsa maiores ou iguais a 4mm. Pelo menos 2 destes dentes deveriam ser

primeiros molares apresentando perda de inserção clínica maior ou igual a 5mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 4mm.

- Periodontite agressiva localizada: Menos de 10 dentes com sítios interproximais com perda de inserção clínica e profundidade de bolsa maiores ou iguais a 4mm. Pelo menos 2 destes dentes deveriam ser primeiros molares apresentando perda de inserção clínica maior ou igual a 5mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 4mm.
- Periodontite agressiva incipiente: Pelo menos 2 primeiros molares apresentando perda de inserção clínica maior ou igual a 4mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 3mm.

Parâmetros Radiográficos:

- Periodontite agressiva generalizada: 10 ou mais dentes com sítios interproximais com nível ósseo alveolar maior ou igual a 4mm. Pelo menos 2 destes dentes deveriam ser primeiros molares apresentando nível ósseo alveolar maior ou igual a 5mm.
- Periodontite agressiva localizada: Menos de 10 dentes com sítios interproximais com nível ósseo alveolar maior ou igual a 4mm. Pelo menos 2 destes dentes deveriam ser primeiros molares apresentando nível ósseo alveolar maior ou igual a 5mm.

Todos os parâmetros acima apresentados (nível de inserção clínica, profundidade de bolsa e nível ósseo alveolar) deveriam estar presentes no mesmo sítio interproximal para este ser considerado acometido pela doença. Caso os indivíduos totalmente edêntulos reportassem perda precoce de todos os dentes anteriormente aos 35 anos, sem uma razão óbvia presente como relato de trauma ou cáries, eles foram considerados acometidos por periodontite agressiva.

3.2.2 Definição dos casos de periodontite crônica

Os casos de periodontite crônica foram definidos como indivíduos com diagnóstico da doença posterior aos 35 anos e com os seguintes parâmetros clínicos e/ou radiográficos presentes:

- Parâmetros Clínicos:
 - Periodontite crônica severa: Pelo menos 2 dentes não adjacentes com sítios interproximais com perda de inserção clínica maior ou igual a 6mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 4mm.
 - Periodontite crônica moderada: Pelo menos 2 dentes não adjacentes com sítios interproximais com perda de inserção clínica maior ou igual a 5mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 4mm.
 - Periodontite crônica branda: Pelo menos 1 dente com sítios interproximais com perda de inserção clínica maior ou igual a 4mm e profundidade de bolsa maior ou igual a 4mm.
- Parâmetros Radiográficos:
 - Periodontite crônica severa: Pelo menos 2 dentes não adjacentes com nível ósseo alveolar maior ou igual a 6mm.
 - Periodontite crônica moderada: Pelo menos 2 dentes não adjacentes com nível ósseo alveolar maior ou igual a 5mm.
 - Periodontite crônica branda: Pelo menos 1 dente com nível ósseo alveolar maior ou igual a 4mm.

Todos os parâmetros acima apresentados (nível de inserção clínica, profundidade de bolsa e nível ósseo alveolar) deveriam estar presentes no mesmo sítio interproximal para este ser considerado acometido pela doença.

3.3 Análise de segregação

A análise de segregação foi executada no programa SEGREG do pacote SAGE versão 5.4.2 de 2008 com base nos dados dos pedigrees das primeiras 74 famílias recrutadas neste estudo, totalizando 475 indivíduos (média de 6,4 indivíduos por família). O objetivo da análise de segregação foi avaliar o modo de herança do fenótipo da periodontite agressiva nesta população. Assumiu-se a herança Mendeliana como um locus autossômico com 2 alelos A e B, onde o alelo A estava associado ao fenótipo relevante. A probabilidade para os dados das famílias foi calculada como uma função dos parâmetros de susceptibilidade genótipo-específico ($\beta_{AA}, \beta_{AB}, \beta_{BB}$), da frequência alélica (q) sob o

Equilíbrio de Hardy-Weinberg e da chance que os pais transmitissem o alelo A ($\tau_{AA}, \tau_{AB}, \tau_{BB}$)⁹⁶.

Cinco modos de transmissão (não homogêneo, Mendeliano homogêneo, homogêneo geral, semigeral, heterogêneo geral) foram testados assumindo que a prevalência da periodontite agressiva é de 1%²² sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Cada modo de herança foi testado para os seguintes tipos de susceptibilidade: 2 fatores de susceptibilidade, 2 fatores de susceptibilidade com efeito dominante ou recessivo, 3 fatores de susceptibilidade e 3 fatores de susceptibilidade com efeitos crescentes ou decrescentes. Os parâmetros de cada modo de herança foram estimados pelo método de probabilidade máxima, o qual fornece a probabilidade total (LN), o logaritmo de LN ($-2LN$) e o índice de Akaike (AIC). O AIC é $-2\ln+2k$, onde k é o número de parâmetros analisados. O modo de herança com o menor AIC foi considerado o mais adequado entre os modos igualmente prováveis. O teste de razão de probabilidade (LRT) foi utilizado para comparar cada modo de herança com o modo geral de herança ($p>0,05$). O modo geral de herança funciona com a hipótese alternativa. Em cada caso, o modo geral de herança possui a maioria dos parâmetros estimados considerando que o modo de herança mais restrito é o nulo. Portanto, em cada teste, rejeitou-se o modo mais restrito em favor do modo geral se o p-valor fosse $< 0,05$ ou não se rejeitou o modo mais restrito se o p-valor fosse $\geq 0,05$.

3.4 Coleta de material biológico

As amostras de saliva foram coletadas de 371 indivíduos distribuídos em 54 famílias (média de 6,9 indivíduos por família) como fonte de DNA genômico seguindo o protocolo do fabricante do coletor de saliva ORAGENE (ORAGENE, DNA Genotek Inc, Ontario, Canada) (Figura 1, próxima folha). Cada coletor contendo saliva foi lacrado e mantido em refrigerador até o envio para o Departamento de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Pittsburgh (EUA), onde foram executadas as etapas posteriores desse estudo. O fabricante recomenda manter os coletores em temperatura ambiente de 15⁰C a 30⁰C ou congelado sob temperatura inferior a -15⁰C. O DNA da saliva torna-se estável no interior do coletor por pelo menos 1 ano, mesmo que sob temperatura superior a 50⁰C. Esta estabilidade deve-se aos reagentes que inativam bactérias e nucleases

da saliva, minimizando a hidrólise química da molécula de DNA (Birnboim, DNA Genotek).

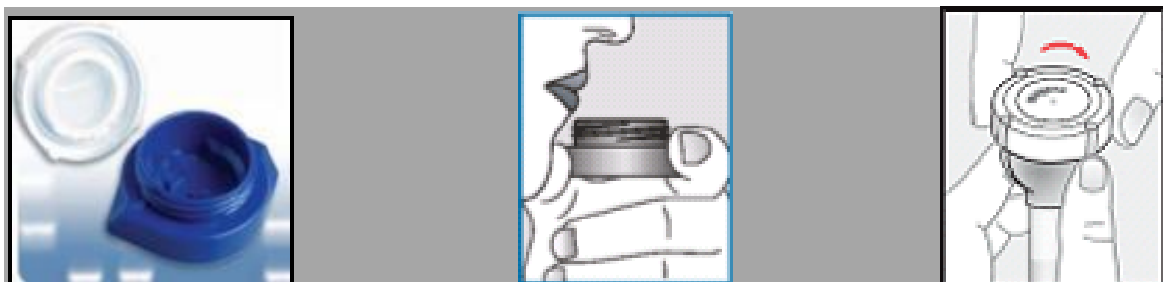


Figura 1 - Ilustração do protocolo para a coleta de saliva utilizando o coletor ORAGENE.

3.5 Extração do DNA

O protocolo de purificação do DNA a partir de 500 μ L de ORAGENE/saliva da ORAGENE (ORAGENE, DNA Genotek Inc, Ontario, Canada) foi seguido, conforme descrito abaixo:

- misturar por inversão o conteúdo ORAGENE/saliva no coletor por alguns segundos antes de incubá-lo em incubadora aquática a temperatura de 50⁰ C por no mínimo 1 hora;
- transferir 500 μ L de ORAGENE/saliva para um tubo de microcentrífuga esterilizado de 1.5mL (Eppendorf). O excedente da amostra foi congelado a -20⁰C.
- adicionar 20 μ L de ORAGENE purifier (OG-L2P, supplied) ao Eppendorf e manter no Vortex por 5 segundos;
- incubar no gelo por 10 minutos e em seguida centrifugar em temperatura ambiente por 5 minutos a 13,000 rpm (15,000 x g);
- transferir o sobrenadante para um novo Eppendorf, adicionar 500 μ L de etanol a 95 -100%, misturar 10 vezes por inversão e deixar a temperatura ambiente por 10 minutos para a completa precipitação da molécula de DNA;
- centrifugar em temperatura ambiente por 2 minutos a 13,000 rpm (15,000 x g);
- descartar o sobrenadante e deixar o Eppendorf aberto com o pellet em temperatura ambiente por 30 minutos para a total evaporação do etanol;

- adicionar 100 μL de TE (10mM Tris-HCl + 1mM EDTA, ph 8.0) para dissolver o pellet e manter no Vortex por 5 segundos;
- manter os tubos em temperatura ambiente por 1 dia e estocar a -20°C até a utilização do DNA nas etapas subseqüentes.

3.6 Quantificação e diluição do DNA

A concentração do DNA foi estimada pela quantificação absoluta em reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT PCR) e o protocolo sugerido pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) foi seguido, como descrito abaixo:

- quantidades de reagentes necessários por amostra: 5 μL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), 0,5 μL de 20X RnaseP Primer-Probe FAM Mix (Applied Biosystems, New Jersey, EUA) e 2,5 μL de água esterilizada. Esses reagentes compõem a solução que será posteriormente adicionada as amostras de DNA;
- organizar 2 μL de cada amostra de DNA a ser quantificada em placas de 96 poços e adicionar em cada poço 8 μL da solução acima descrita. Os últimos poços da última coluna da placa de 96 receberam 2 μL de: água esterilizada (controle negativo), SKW1STD, SKW2STD, SKW3STD e SKW5STD (amostras de referência ou controles positivos), respectivamente além dos 8 μL da solução anteriormente descrita. Volume total da reação em cada poço igual a 10 μL ;
- selar a placa com plástico adesivo e centrifugar em temperatura ambiente por 2 minutos a 3,000 rpm;
- posicionar a placa na termocicladora em tempo real (ABI PRISM[®] 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e ajustar o programa Sequence Detection system versão 2.2.2 (SDS 2.2.2, Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) para a realização da quantificação absoluta. O detector utilizado para a leitura foi o RUNX Fam TamRa.

Esta técnica amplifica e quantifica o DNA simultaneamente, ou seja, detecta e quantifica o número absoluto de cópias de uma seqüência específica de DNA contida na sonda de oligonucleotídeo DNA (Taq) que emite fluorescência quando hibridizada com a cadeia complementar da amostra de DNA. O protocolo segue os princípios gerais da PCR,

o DNA amplificado é quantificado de acordo com o produto acumulado após cada ciclo de amplificação na RT-PCR. Os dados gerados foram organizados em tabelas no Excel para a melhor visualização dos resultados.

A diluição do DNA concentrado em cada amostra foi realizada utilizando-se a fórmula $C1V1=C2V2$, onde C1 deve ser a quantidade de DNA fornecida na quantificação absoluta em uma concentração de 2ng/ μL , V1 representa o volume de DNA necessário para a diluição, C2 representa a concentração desejada do DNA diluído e V2 representa o volume final da diluição. O DNA foi diluído nas concentrações de 2ng/ μL e 20ng/ μL , o volume final da diluição foi de 100 μL e o meio utilizado para a diluição foi a água esterilizada. Tanto o DNA concentrado quanto as placas de diluição foram estocadas em temperatura de -20°C .

3.7 Seleção dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)

Tomando por base a região descrita por Li, Xu, Hasturk, Kantarci, DePalma e Van Dyke⁷ como apresentando um locus de susceptibilidade para a periodontite agressiva localizada, 14 SNPs (Quadro 1, próxima folha) foram inicialmente selecionados a partir dos dados do Projeto Internacional HAPMAP⁹⁷ e da base de dados da Universidade de Santa Cruz da Califórnia (UCSC) Genome Bioinformatics⁹⁸, e visualizados através do programa Haploview⁹⁹. Levou-se em consideração a distribuição dos haplótipos e a estrutura dos genes visando uma ótima cobertura da região a ser estudada, um menor número de SNPs e os SNPs mais informativos que se classificassem, de preferência, como: potencialmente funcionais por alterarem a sequência de aminoácidos da proteína final, por ocorrerem próximo a região promotora do gene e potencialmente influenciarem a expressão gênica, ou ainda que demonstrassem alterar a função ou expressão do gene.

SNP	Posição	Gene	Região	Troca de Bases
rs366839	187,825,289	----	----	A/G
rs463228	187,828,998	----	----	A/G
rs2208921	187,947,000	----	----	A/G
rs12132519	187,997,671	----	----	A/G
rs1935885	188,314,448	----	----	A/G
rs10800889	188,341,501	<i>FAM5C</i> *	íntron	A/G
rs1342913	188,387,648	<i>FAM5C</i> *	íntron	A/G
rs4633293	188,461,532	<i>FAM5C</i> *	íntron	A/G
rs12140456	188,479,488	<i>FAM5C</i> *	íntron	C/G
rs1377924	189,425,718	----	----	C/G
rs2061018	189,429,170	----	----	A/T
rs7526348	190,390,334	----	----	A/G
rs1175111	190,472,655	----	----	A/G
rs1175152	190,479,859	----	----	A/G

* membro C da família com sequência de similaridade 5 (*FAM5C*),. Adaptado de UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸

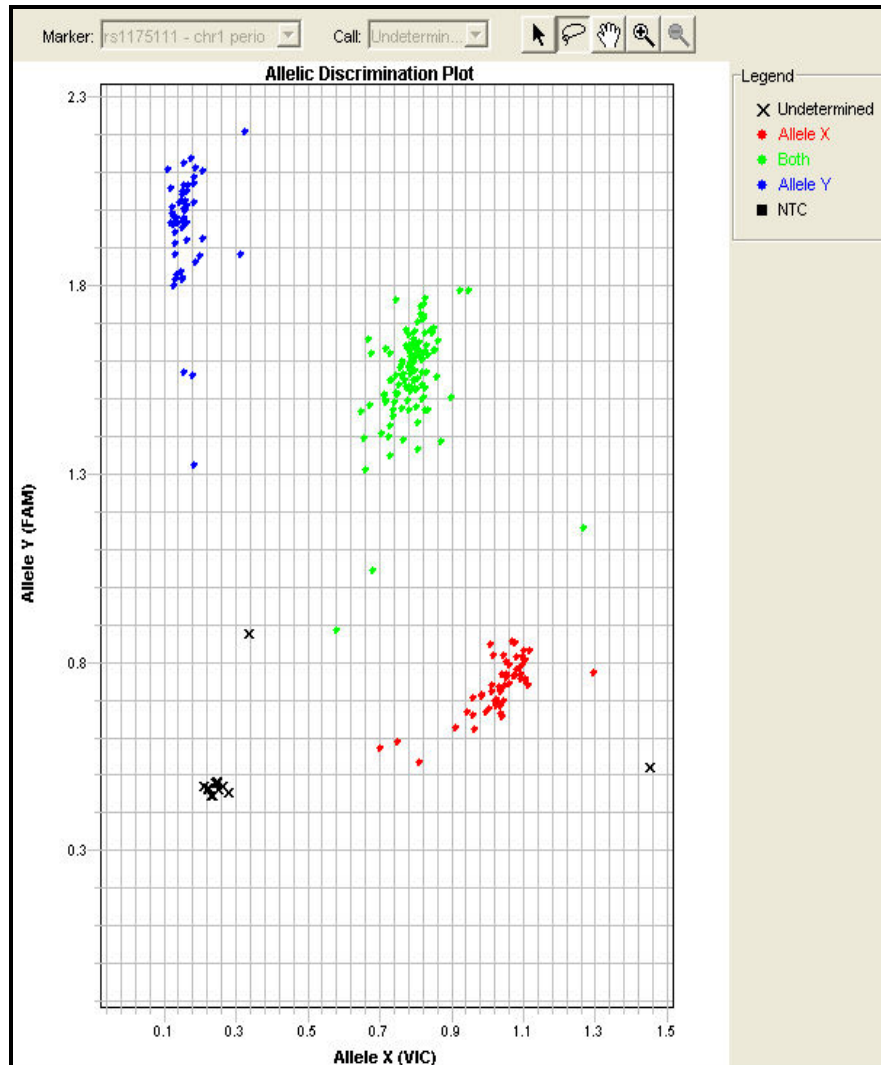
Quadro 1 - SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos inicialmente selecionados.

O programa Haploview⁹⁹ ligado ao HapMap gerou os gráficos de desequilíbrio de ligação entre os SNPs selecionados com o objetivo de visualizar a distribuição dos SNPs ao longo da área alvo e, desta forma, selecionar os SNPs mais representativos na região e que não estivessem em desequilíbrio de ligação entre si. Essa informação foi gerada com base nas populações do HapMap. Devido aos dados disponíveis serem derivados de populações de não-brasileiros, os genótipos gerados no nosso estudo servirão para uma primeira análise dos haplótipos na nossa população, o que, certamente, beneficiará futuros estudos.

3.8 Genotipagem

As amostras de DNA com concentração equivalente a 2ng/μL foram amplificadas através da PCR¹⁰⁰ em uma termocicladora PTC-225 Tetrad (Peltier Thermal Cycler). Após a amplificação inicial, os genótipos foram obtidos pelo método TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)¹⁰¹ realizado em volume total de 3μL/reação contendo 1 μL de DNA, 1,5μL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), 0.075μL de probe TaqMan (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,425 μ L de água estéril em uma termocicladora em tempo real (ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Figura 2).



* Indivíduos homocigotos para cada alelo são representados pela cor vermelha e azul, indivíduos heterocigotos são representados pela cor verde e os (x) foram desconsiderados.

Figura 2 - Resultados obtidos pelo método Taqman¹⁰¹ para o marcador rs1175111.

3.9 Análise do desequilíbrio de ligação

O padrão de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos testados foi calculado utilizando-se o programa Graphical Overview of Linkage Disequilibrium (GOLD). Este experimento tem a função de obter dados descritivos de desequilíbrio de ligação entre os marcadores ou SNPs selecionados com a idéia de facilitar a interpretação dos resultados dos estudos de associação. Esse programa gera um gráfico de desequilíbrio de ligação tendo como base os genótipos da população estudada obtidos na genotipagem dos polimorfismos acima descritos para o coeficiente de desequilíbrio padronizado de Lewontin (D') e para o coeficiente de correlação (r^2)¹⁰².

3.10 Análise de ligação familiar

A análise de ligação familiar não paramétrica foi executada pelo programa Merlin¹⁰³⁻¹⁰⁴ com base nos genótipos gerados pelos 14 primeiros SNPs selecionados assim como na localização física dos SNPs ao longo do cromossomo 1 (Quadro 1, na folha 36). O programa Rutgers Map Interpolator¹⁰⁵ foi utilizado para a conversão da posição física dos SNPs (pares de base) em posição de ligação (centiMorgan, cM). O centiMorgan (cM) é a unidade de frequência recombinante para mensurar a distância entre os marcadores dentro do cromossomo e estimar a ligação genética entre eles. O objetivo da análise de ligação familiar é seguir a herança de um traço ou doença através das gerações, buscando a transmissão consistente, através de marcadores polimórficos, de uma região cromossômica específica abrigando alelos doentes.

3.11 Associação e análise dos haplótipos

Os alelos de cada SNP e os haplótipos, dados obtidos na genotipagem, foram testados para associação com a periodontite agressiva com o uso do programa Family Based Association Test (FBAT)¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. A versão 1.05 do programa PLINK¹⁰⁸ também foi utilizado para os testes de associação. Nestas análises, os indivíduos foram considerados afetados ou não afetados para a periodontite agressiva. A associação foi considerada significativa para p-valores menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$).

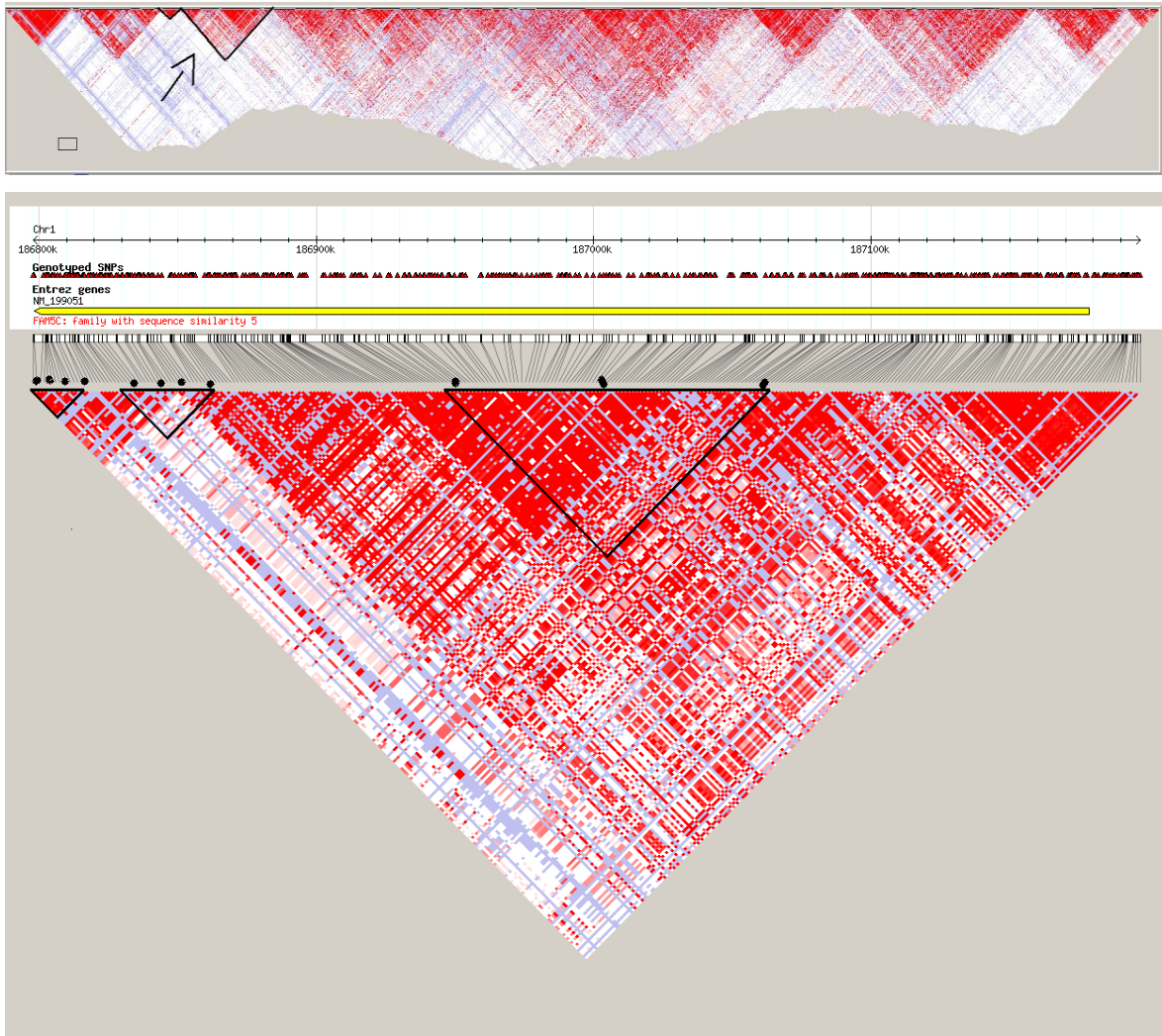
Os resultados iniciais do FBAT indicaram uma associação entre a periodontite agressiva e o SNP rs1342913 ($p=0,03$) localizado na região 1q 31.1, no íntron entre os éxons 6 e 7 do gene *FAM5C*, motivo que levou a seleção de mais 7 SNPs dentro do gene *FAM5C*. Os mesmos parâmetros abordados no tópico 3.7 foram utilizados para a escolha dos novos SNPs (Quadro 2, abaixo, e Figura 3, próxima folha).

SNP	Posição	Gene	Região	Troca de Bases
rs1935881	188,333,009	<i>FAM5C</i> *	3'	G/A
rs35296429	188,333,533	<i>FAM5C</i> *	3'	-/A
rs1053081	188,333,608	<i>FAM5C</i> *	3'	A/G
rs35481069	188,334,216	<i>FAM5C</i> *	éxon	G/T
rs34739035	188,334,578	<i>FAM5C</i> *	éxon	G/T
rs34098782	188,334,831	<i>FAM5C</i> *	éxon	C/T
rs61818811	188,713,220	<i>FAM5C</i> *	5'	A/C

* *FAM5C*, membro C da família com sequência de similaridade 5. Adaptado de UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸.

Quadro 2 - Novos SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos inicialmente selecionados.

Os novos SNPs foram genotipados conforme descrito no tópico 3.8. Os dados gerados na genotipagem foram incluídos na análise de associação do FBAT, conforme descrito acima neste tópico.



*A seta indica a região do gene *FAM5C*, ampliada na parte inferior da figura. Os polimorfismos estudados em *FAM5C* estão situados na posição específica do segmento do cromossomo que ocupam (rs1935881, rs35296429, rs1053081, rs35481069, rs34739035, rs34098782, rs10800889, rs1342913, rs4633293, rs12140456, rs61818811) e indicados pelos pontos pretos. Os triângulos pretos delimitam os SNPs mais próximos dentro dessa mesma região. A relação entre dois polimorfismos é representada pela intersecção entre dois quadrados e pode apresentar cores (ou intensidade de cor) variadas baseada no valor obtido para a relação. Vermelho indica $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$. Tons de vermelho/rosa indicam $D' < 1$ e $\text{LOD} \geq 2$. Branco indica $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$.

Figura 3 - Gráfico de desequilíbrio de ligação ilustrando a região dos SNPs selecionados no cromossomo 1.

3.12 Experimentos de bioinformática

Os resultados preliminares do FBAT indicaram uma associação entre a periodontite agressiva e 2 marcadores (SNPs) na região do gene *FAM5C*. Sendo assim, utilizamos um programa chamado ENDEAVOUR¹⁰⁹ que executa a priorização dos genes candidatos da região selecionada baseado em genes já descritos na literatura como associados a doença em questão. Seleciona-se a região cromossômica de interesse, fornece-se a lista de genes associados com a periodontite em humanos e o programa faz uma busca em várias bases de dados a fim de construir um modelo com informações funcionais, interações entre proteínas e dados sobre expressão e regulação gênica. Este modelo estabelece scores aos genes presentes na região e cria um rank dos genes com potencial de envolvimento com a doença.

Primeiramente, selecionamos a região do cromossomo 1 (165,770,752-192,424,848 pares de base) descrita por Li, Xu, Hasturk, Kantarci, DePalma e Van Dyke⁷ como associada ao fenótipo da periodontite agressiva localizada e fornecemos uma lista de 10 genes descritos por Covani, Marconcini, Giacomelli, Sivozhelevov, Barone e Nicolini³⁶ como apresentando evidência de envolvimento com a periodontite em humanos (Quadro 3). Em seguida, limitamos a região dos SNPs selecionados neste estudo (187,825,289-190,479,859 pares de base), mantendo como parâmetro a mesma lista de genes.

Gene	Nome Oficial
TNF	Fator de necrose tumoral
IL4R	Receptor de interleucina 4
IL6	Interleucina 6 (interferon, beta 2)
IL6R	Receptor da IL6
IL6ST	Transdutor de sinalização da IL6 (gp130, receptor M da oncostatina)
TRAF2	Receptor TNF associado ao fator 2
SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) homólogo ao oncogene viral (avian)
PIK3RI	Fosfonosítídeo 3 quinase, subunidade regulatória 1 (alfa)
RELA	Oncogene reticuloendoteliose viral homólogo A
IKBKB	Inibidor do gene polipeptídeo k light em células B, quinase beta

Quadro 3 - Lista dos genes candidatos a periodontite descritos por Covani, Marconcini, Giacomelli, Sivozhelevov, Barone e Nicolini³⁶.

Outro experimento de bioinformática realizado nos SNPs associados a periodontite agressiva neste estudo e, localizados no gene *FAM5C*, foi a análise de possíveis alterações de fatores de transcrição nos sítios de ligação do gene quando ocorre a alteração do nucleotídeo no SNP, ou seja, quando ocorre a mudança do alelo comum para o alelo raro. Esse experimento foi realizado através do programa TRANSFAC[®] 7.0¹¹⁰, inserindo-se a seqüência dos nucleotídeos de cada SNP individualmente. A alteração nos sítios de ligação pode resultar na mudança da seqüência de aminoácidos e alteração funcional da proteína final.

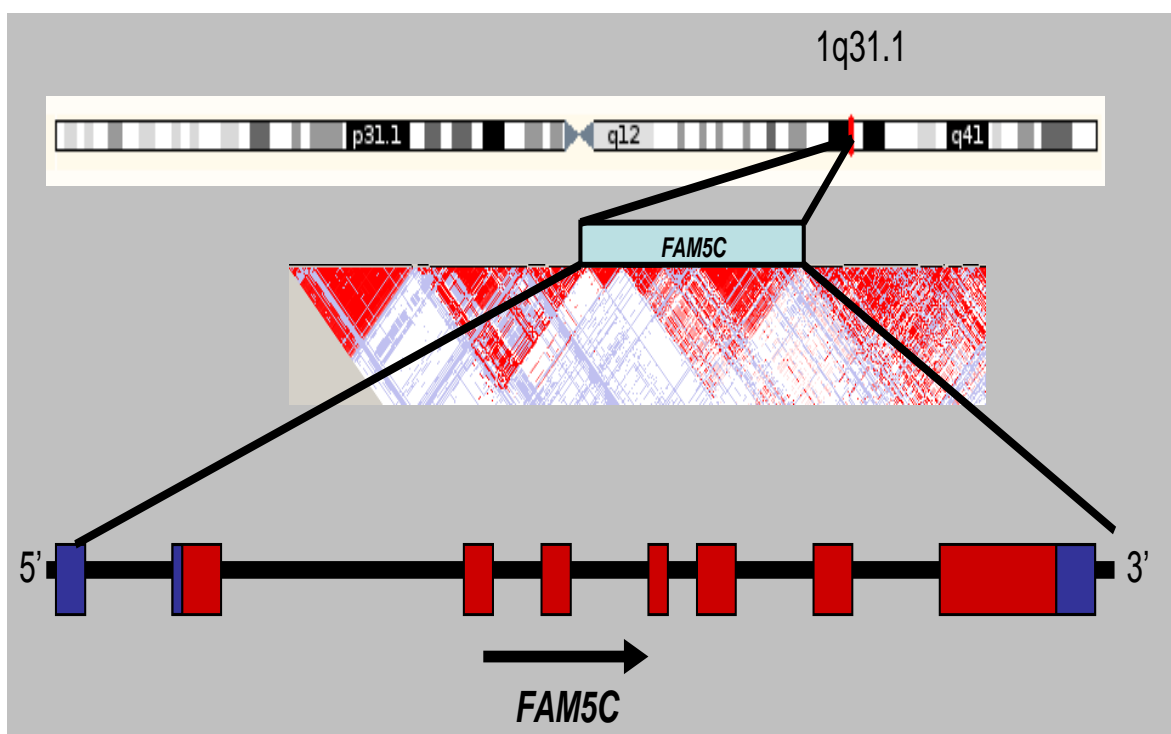
Por último, fizemos a comparação entre as seqüências de nucleotídeos dos 2 SNPs associados com a PA neste estudo (rs1342913, p=0,03; rs1935881, p=0,03) e as seqüências de nucleotídeos de diferentes espécies de seres vivos. Para isso utilizamos a função Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹¹¹.

3.13 Sequenciamento dos éxons do gene *FAM5C*

Visto que os resultados do FBAT indicaram uma associação entre a periodontite agressiva e os SNPs rs1342913 A/G (p=0,03) e rs1935881 G/A (p=0,03) localizados, respectivamente, no íntron da região 1q31.1 entre os éxons 6 e 7 e em 3' do gene *FAM5C*, decidiu-se fazer o sequenciamento dos éxons do gene *FAM5C* nos indivíduos com haplótipo homozigoto para o alelo mais transmitido de cada um dos dois marcadores (SNPs) associados com a PA nesta população e que não tivessem nenhum grau de parentesco entre eles. Dessa forma, foram selecionados 9 indivíduos afetados pela periodontite agressiva e 2 indivíduos sadios (controles), além de uma amostra de um indivíduo caucasiano sadio (controle) do Centro de Estudos do Polimorfismo Humano (CEPH, Paris, França), total de 12 amostras.

O objetivo do sequenciamento do gene *FAM5C* foi buscar mutações nas seqüências que, normalmente, codificam a proteína final (éxons) dos indivíduos que possuem o haplótipo associado com a periodontite agressiva nesta população. A hipótese é que esse haplótipo nos pacientes afetados pela periodontite agressiva pode “carregar” a mutação ou mutações de risco para a doença.

As sequências dos nucleotídeos dos éxons de *FAM5C* foram obtidas na base de dados do Ensembl Genome Browser¹¹² e transferidas para o programa Primer3¹¹³, utilizado para desenhar os primers representativos de cada éxon (Quadro 4, próxima folha). O gene *FAM5C* possui 8 éxons. O último éxon, por ser muito extenso, foi subdividido em 6 partes a fim de construir primers com produtos variando de 200 a 500 pares de bases (Figura 4). Desta forma, obtivemos 13 pares de primers. Foram utilizados os primers da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, EUA) para amplificar a região dos éxons de *FAM5C* das amostras de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), como explicado a seguir neste tópico.



*Representação do cromossomo 1 (topo). No meio, o gráfico de desequilíbrio de ligação da região 1q31 incluindo o gene *FAM5C*. Abaixo, a representação esquemática do gene *FAM5C*: as caixas representam os éxons, as linhas conectando as caixas são os íntrons. As caixas azuis representam as regiões não traduzidas e as caixas vermelhas as regiões codificantes. A seta horizontal indica a direção do gene.

Figura 4 - Representação esquemática do gene *FAM5C* e sua localização no genoma.

EXON	SENTIDO DO PRIMER	SEQUENCIA DO PRIMER	CONDIÇÕES DA PCR
1	Forward	5'- ATTCTGCTTCTTGCCTTGG -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'-AATGAAATACTTCAACAAAACAGAGC -3'	
2	Forward	5'- GCCACCTCAACACCTTAACTG -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- ATTGCTTTCCCTTTGCTTCA-3'	
3	Forward	5'- GACCCAGCTACCAAGTGAA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- GGCACAAATAGGTTCAAAGAGC -3'	
4	Forward	5'- AGACCTTTCACCTGCAGATAA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TGATAATTTTAGCGTAAACTCATTCTT -3'	
5	Forward	5'- CAGTGAACCAAAAAGGACATTG -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TGGAAAAGAAATCACGACTGG -3'	
6	Forward	5'- TGTTAATTCTTTGTTTGTCTTCAA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- AAAAAGGACAAATTAGCCATTTCAA -3'	
7	Forward	5'- AGTGTGAATTTTGACATTTTCAG -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- CTCACTTTTTTCGGCAATAAACTT-3'	
8(1)	Forward	5'- TGTAGATTCGTTCTGTTTTGTATTC -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TGGACTCGGCGAACTTCAG -3'	
8(2)	Forward	5'- ACACCGGCTACATGCTCAG -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- CAAATCTGTAAAGAGAGACCCAAA -3'	
8(3)	Forward	5'- CAAGTCAAGTCTGGTCCATATGAT -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- GGACCATTGGACTTGATGC -3'	
8(4)	Forward	5'- TTTTGAGACAGTACACATCTACCTGA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- GACCAGGTGGGGAGAGTTTA-3'	
8(5)	Forward	5'- TGCAGCTGGACTACCCCTAT-3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- CATGTGTGTAAATTGCCATCC-3'	
8(6)	Forward	5'- AGCACAACCCAAAATCTTGAA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- AAGGAATCCCACAGCATTTC -3'	

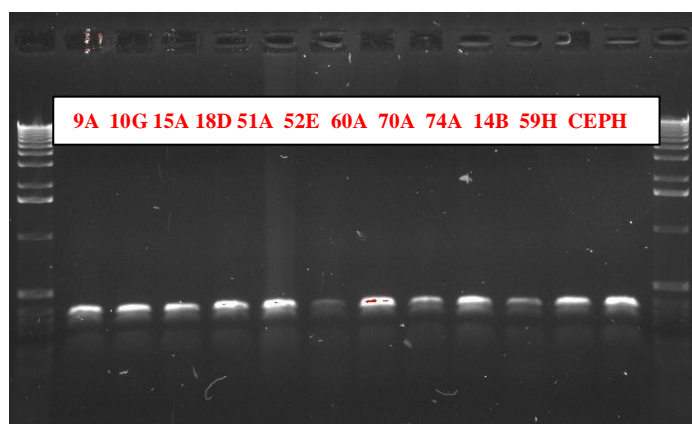
* “forward” e “reverse” representam o sentido do primer.

Quadro 4 - Primers utilizados no sequenciamento dos éxons do gene *FAM5C*.

Os primers liofilizados foram diluídos em água esterelizada para a concentração de 20 μ M. As reações de PCR foram otimizadas para os primers e as amostras de DNA com concentração equivalente a 20ng/ μ L puderam, então, ser amplificadas através da reação em cadeia da polimerase. Reagentes utilizados:

- biolase Mix: 125 μ L de 10X Buffer contendo cloreto de magnésio, 100 μ L de dNTP mix (2,5mM cada) e 393,75 μ L de água esterilizada. Adicionar 6,25 μ L de Taq (5U/ μ L) ao Biolase Mix;
- preparar a solução: 12,75 μ L de Biolase Mix, 0,4 μ L do primer reverse, 0,4 μ L do primer forward e 9,45 μ L de água esterilizada. Esta quantidade é suficiente para uma amostra de DNA;
- distribuir 2 μ L de cada amostra de DNA em uma placa de 96 poços e adicionar 23 μ L da solução acima, volume total da reação 25 μ L;
- o seguinte programa de temperaturas para o PCR foi utilizado na termocicladora: 94⁰C por 5 minutos; 35 ciclos de 94⁰C por 30 segundos + 60⁰C por 30 segundos + 72⁰C por 30 segundos; 72⁰C por 7 minutos.

Foram utilizados 5 μ L de cada amostra coradas com 1 μ L de Dye para a eletroforese no gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio com o objetivo de visualizar as bandas de DNA sobre a luz ultravioleta e confirmar se as amostras tinham sido amplificadas. A eletroforese foi executada a 110V por 60 minutos e o padrão de peso molecular (ladder) de 1Kb foi utilizado como parâmetro para a verificação do peso molecular da banda produzida (Figura 5).



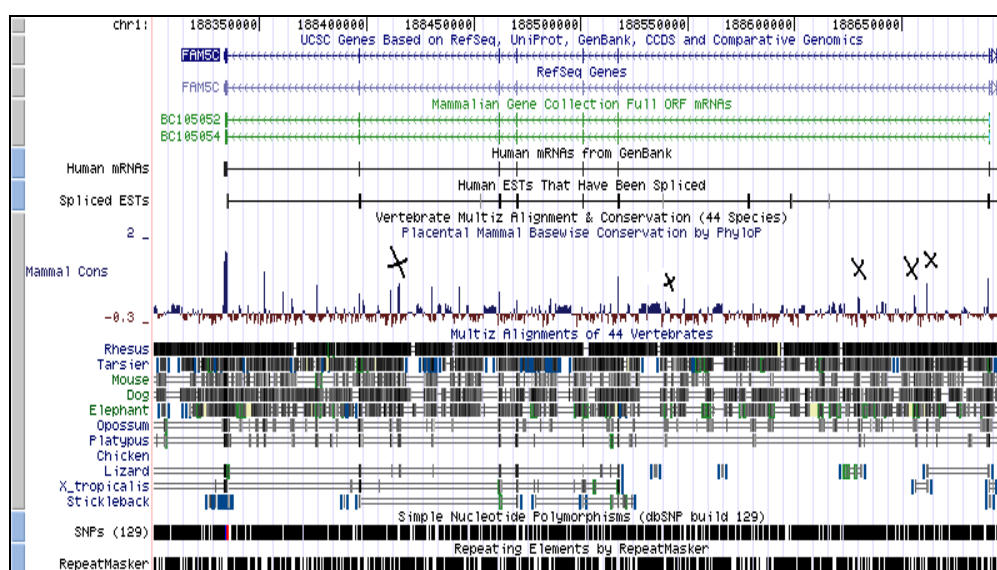
*Nas extremidades da figura observamos o padrão de peso molecular de 1Kb e entre eles as bandas produzidas pelas amostras de DNA utilizadas: 9A, 10G, 15A, 18D, 51A, 52E, 60A, 70A, 74A, 14B, 59H e CEPH.

Figura 5 - Foto do gel de agarose a 1%.

Uma quota de cada amostra (1 μ L) com 0,2 μ L de cada primer e 4,84 μ L de água esterelizada (volume total de 6 μ L) foi enviada, em placas de 96 poços, para o serviço de sequenciamento genético da Universidade de Pittsburgh (Genomics and Proteomics Core Laboratories) para a realização do sequenciamento. Os resultados foram interpretados com o auxílio do programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA).

3.14 Sequenciamento das regiões conservadas do gene *FAM5C*

A falta de resultados do sequenciamento dos éxons de *FAM5C* nos motivou a sequenciar regiões intrônicas do mesmo gene que apresentassem picos de conservação entre diferentes espécies de seres vivos, sob a hipótese de que esses locais poderiam “conservar” informações relevantes do gene. O objetivo foi buscar mutações nestas sequências conservadas dos indivíduos que possuem o haplótipo associado com a periodontite agressiva nesta população e descrito no tópico anterior. A hipótese é que esse haplótipo nos pacientes afetados pela periodontite agressiva pode “carregar” a mutação para a doença. Utilizamos a base de dados UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸ com a finalidade de visualizar e localizar os picos de conservação nos íntrons do gene *FAM5C* (Figura 6). As sequências de nucleotídeos dos SNPs mais próximos a esses picos de conservação foram utilizados na construção dos primers.



*As marcações (X) indicam as regiões dos picos de conservação nos íntrons do gene *FAM5C*.

Figura 6 - Visualização da região do gene *FAM5C* na base de dados UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸.

As sequências dos nucleotídeos das regiões íntrônicas de *FAM5C* foram obtidas na base de dados do Ensembl Genome Browser¹¹² e transferidas para o programa Primer3¹¹³ para desenhar os primers representativos de cada região conservada dentro dos íntrons. Foram selecionadas 5 regiões, resultando em 5 pares de primers (Quadro 5). Foram utilizados os primers da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, EUA) para amplificar as regiões de interesse das amostras de DNA através de PCR, como explicado no tópico anterior.

EXON	PRIMER DIRECTION	PRIMER SEQUENCE	PCR CONDITIONS
1-2	Forward	5'-TTTGTCAAAGCGTTCCTAT -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- GGAAACTAATCTCTACTTCATCCTG -3'	
1-2	Forward	5'- AGAATTTATTATAGTTCTCTGCCATGT-3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TTTTGAACAGCATCTGAAACATT -3'	
1-2	Forward	5'- AAAAAGTACCCTCAGTGCAACC -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- GCTTAATCCTGATGAGCTTGG -3'	
3-4	Forward	5'- CACAAGACACAGCTGCATGA-3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TCACAGTTGTTTGAGAATTTTACGA -3'	
6-7	Forward	5'- CATTGAGCCACTACCCATAA -3'	94°C por 5 minutos, 35 ciclos (94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg), 72°C por 7 minutos
	Reverse	5'- TTGAGAACCCCAAAAGACTG-3'	

Quadro 5 - Primers utilizados no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas do gene *FAM5C*.

3.15 Análises adicionais

Foram encontradas variantes em duas das cinco regiões intrônicas conservadas de *FAM5C*, conforme apresentado no tópico Resultados. Decidiu-se genotipar toda a população para os 2 SNPs relacionados a essas variantes (Quadro 6, próxima folha). Os genótipos obtidos desses novos SNPs em *FAM5C* foram analisados juntamente com os 2

SNPs rs 1935881 e rs 1342913, anteriormente associados com o fenótipo da periodontite agressiva nesta população ($p=0,03$, $p=0,03$), com o auxílio dos programas FBAT e GOLD com o objetivo de verificar associação entre o genótipo e o fenótipo e desequilíbrio de ligação, respectivamente.

SNP	Posicao	Gene	Regiao	Troca de Bases
rs57694932	188,705,935	<i>FAM5C</i>	intron	AG
rs10494634	188,706,091	<i>FAM5C</i>	intron	AT

* *FAM5C*, membro C da família com sequência de similaridade 5. Adaptado de UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸.

Quadro 6 - Novos SNPs, posição no cromossomo, região no gene e troca de bases dos polimorfismos.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população analisada

As características clínicas, radiográficas e estrutura familiar da população total estudada encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Número de indivíduos por fenótipo e gênero nas 76 famílias com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probando) e média de idade.

Características Familiais	n (%)
Afetados	151 (31%)
Probandos	76
Masculino	29
Feminino	47
Média de idade dos probandos (variação)	30 anos (16-54 anos)
Familiares	75
Masculino	20
Feminino	55
Não afetados	263 (54%)
Masculino	118
Feminino	145
Desconhecido	73 (15%)
Masculino	52
Feminino	21
Total	487 (100%)

Tabela 2 - Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias e a variação de tamanho das famílias.

Número de afetados/família	Número de famílias	Variação de tamanho das famílias
1	27	3-10
2	27	3-10
3	13	4-13
4	7	6-17
5	2	9-15
Total	76	3-17

Tabela 3 - Distribuição das subclassificações da periodontite agressiva entre os probandos e seus familiares nas 76 famílias.

Número de famílias	PA Incipiente	PA Localizada	PA generalizada
9	X	X	X
1	X	X	
7		X	X
3	X		X
0	X		
14		X	
42			X

As Tabelas 4,5 e 6 caracterizam a população submetida a análise de segregação, cujo resultado está descrito no próximo tópico dos resultados (4.2).

Tabela 4 - Número de indivíduos por fenótipo e gênero nas primeiras 74 famílias submetidas a análise de segregação com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probando).

Fenótipo e Gênero	Número de Indivíduos
Afetados	
Masculino	55
Feminino	97
Não Afetados	
Masculino	162
Feminino	161
Total	475

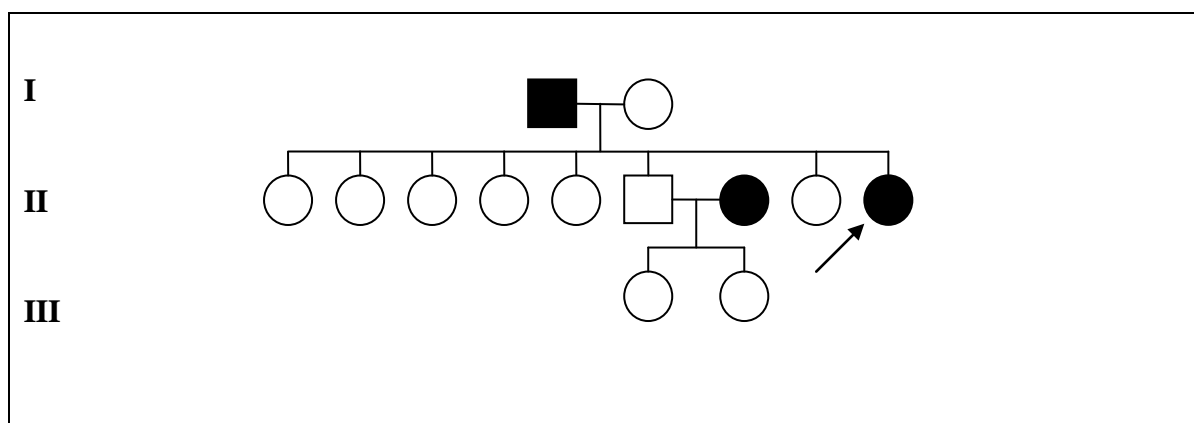
Tabela 5 - Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias submetidas a análise de segregação e a variação de tamanho dessas famílias.

Número de afetados/família	Número de famílias	Variação de tamanho das famílias
1	26	3-10
2	26	3-10
3	13	4-13
4	7	6-17
5	2	9-15
Total	74	3-17

Tabela 6 - Distribuição das subclassificações da periodontite agressiva entre os probandos e seus familiares em cada uma das 74 famílias submetidas a análise de segregação.

Número de famílias	P. Agressiva Incipiente	P. Agressiva Localizada	P. Agressiva generalizada
9	X	X	X
1	X	X	
6		X	X
3	X		X
0	X		
13		X	
42			X

A Figura 7 apresenta o heredograma de uma das famílias avaliadas. No heredograma utilizou-se o critério afetado ou não-afetado pela periodontite agressiva, visto que esse será o critério adotado nas análises genéticas subsequentes.



*Os quadrados representam o sexo masculino e os círculos o sexo feminino. A cor preta representa os portadores de periodontite agressiva e a branca os não afetados por periodontite agressiva. A seta indica o primeiro indivíduo diagnosticado com periodontite agressiva na família (probando). Os algarismos I, II e III indicam a geração da família.

Figura 7 – Exemplo de heredograma de uma das famílias avaliadas.

As Tabelas 7 e 8 (próxima folha) apresentam as características clínicas, radiográficas e estrutura familiar da subpopulação de 54 famílias e 371 indivíduos que tiveram amostras de saliva coletadas e que, portanto, foram genotipadas e submetidas as análises genéticas posteriormente relatadas nesta tese.

Tabela 7 - Número de indivíduos por fenótipo e sexo nas 54 famílias com pelo menos um afetado por periodontite agressiva (probandos) e média de idade.

Características Familiais	n (%)
Afetados	116 (31,3%)
Probandos	54
Masculino	17
Feminino	37
Média de idade dos probandos (variação)	31,1 anos(16-40anos)
Familiares	62
Masculino	17
Feminino	45
Não afetados	193 (52%)
Masculino	89
Feminino	104
Desconhecido	62 (16,7%)
Masculino	35
Feminino	27
Total	371 (100%)

Tabela 8 - Distribuição dos indivíduos com periodontite agressiva nas famílias e a variação de tamanho das famílias.

Número de afetados/família	Número de famílias	Variação de tamanho das famílias
1	18	3-10
2	20	3-10
3	8	4-13
4	6	6-17
5	2	9-15
Total	54	3-17

4.2 Determinação do modo de herança

Os resultados da análise de segregação estão sumarizados na Tabela 9 (subdividida nas folhas 54 a 58). Na Tabela 9, os modelos “Homogêneo de não transmissão” ,

“Mendeliano homogêneo”, “Homogêneo geral” e “Semigeral” são sempre comparados ao modelo “Heterogêneo geral”, visto na última coluna. Também considera-se que a susceptibilidade dos alelos pode ser dominante, recessiva, decrescer de um alelo para os outros ou aumentar de um alelo para os outros. O modelo que apresentar o menor AIC e valor de p maior que 0,05 é eleito o modelo de herança mais adequado. Neste caso, o modelo semigeral mostrou-se sempre o mais adequado.

Comparado ao modelo heterogêneo geral, o modelo de não transmissão, que indica nenhuma contribuição genética a periodontite agressiva, foi rejeitado pela análise de segregação ($p \leq 0,02$ em todos os testes). Os modelos que incorporaram transmissão homogênea ou heterogênea, ou seja, a presença de um gene principal com possíveis efeitos poligênicos adicionais, também não adequaram-se a população avaliada. Estes modelos Mendelianos foram rejeitados quando comparados ao modelo heterogêneo geral de transmissão ($p \leq 0,02$ em todos os testes). O modo de herança mais adequado para cada teste de susceptibilidade dos alelos executado foi o modelo semigeral, principalmente quando considerou-se 3 fatores de susceptibilidade com efeitos decrescentes ($p=0,31$). Este modelo de transmissão sugere que os alelos de risco para a periodontite agressiva são transmitidos pelos pais heterozigotos e que poucos loci com efeitos relativamente pequenos contribuem para a doença, independente da interação com fatores ambientais.

Tabela 9 - Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com periodontite agressiva (continua).

Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigeral	Heterogêneo geral
	Com 2 susceptibilidades	Com 2 susceptibilidades	Com 2 susceptibilidades	Com 2 susceptibilidades	Com 2 susceptibilidades
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	-	1	1	1	1
$\tau(AB)$	-	0,5	0,5	1	0,5
$\tau(BB)$	-	0	1	0	1
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-222,60	-222,60	-231,49	-231,49	-237,40
LN	111,30	111,30	115,74	115,74	118,70
LRC	14,79	14,79	5,90	5,90	-
p	0,02	0,01	0,015	0,05	-
No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-216,60	-216,60	-225,49	-225,49	-229,40

Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigeral	Heterogêneo geral
	Com 2 susceptibilidades dominante	Com 2 susceptibilidades dominante	Com 2 susceptibilidades dominante	Com 2 susceptibilidades dominante	Com 2 susceptibilidades dominante
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	-	1	1	1	1
$\tau(AB)$	-	0.5	0.5	1	0.5

Tabela 9 - Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com periodontite agressiva (continuação).

τ (BB)	-	0	1	0	1
β (AA)	1	1	1	1	1
β (AB)	0	0	0	0	0
β (BB)	0	0	0	0	0
-2LN	-222,60	-222,60	-231,49	-231,49	-237,40
LN	111,30	111,30	115,74	115,74	118,70
LRC	14,79	14,79	5,90	5,90	-
p	0,002	0,001	0,015	0,052	-
No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-216,60	-216,60	-225,49	-225,49	-229,40
Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigerál	Heterogêneo geral
	Com 2 susceptibilidades recessivo	Com 2 susceptibilidades recessivo	Com 2 susceptibilidades recessivo	Com 2 susceptibilidades recessivo	Com 2 susceptibilidades recessivo
Parâmetros					
q	1	1	1	1	1
τ (AA)	-	1	0,91	1	1
τ (AB)	-	0,5	1	0,92	0,92
τ (BB)	-	0	0,60	0	0
β (AA)	1	1	1	1	1
β (AB)	0	0	0	0	0
β (BB)	0	0	0	0	0

Tabela 9 - Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com periodontite agressiva (continuação).

-2LN	-75,65	-258,76	-303,70	-332,65	-337,55
LN	37,82	129,38	151,85	166,32	168,77
LRC	261,8	78,78	33,84	4,90	-
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,086	-
No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-69,65	-252,76	-293,70	-324,65	-329,55
Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigerai	Heterogêneo geral
	Com 3 susceptibilidades	Com 3 susceptibilidades	Com 3 susceptibilidades	Com 3 susceptibilidades	Com 3 susceptibilidades
Parâmetros					
q	1	1	1	1	1
τ (AA)	-	1	1	1	1
τ (AB)	-	0,5	0,5	1	1
τ (BB)	-	0	0,99	0	0
β (AA)	1	1	1	1	1
β (AB)	0	0	0	0	0
β (BB)	0	0	0	0	0
-2LN	-226,49	-237,83	-244,10	-248,98	-254,68
LN	113,24	118,91	122,05	124,49	127,34
LRC	28,19	16,85	10,58	5,70	-

Tabela 9 - Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com periodontite agressiva (continuação).

p	0,0001	0,0001	0,001	0,058	-
No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-218,49	-229,83	-234,10	-240,98	-246,68
Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigeral	Heterogêneo geral
	Com 3 susceptibilidades decrescentes	Com 3 susceptibilidades decrescentes	Com 3 susceptibilidades decrescentes	Com 3 susceptibilidades decrescentes	Com 3 susceptibilidades decrescentes
Parâmetros					
q	0	0	0	0	0
$\tau(AA)$	-	1	0,20	1	1
$\tau(AB)$	-	0,5	0	0	0
$\tau(BB)$	-	0	0,17	0	0
$\beta(AA)$	0	0	0	0	0
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	1	1	1	1	1
-2LN	-131,20	-252,53	-226,81	-336,49	-338,79
LN	65,60	126,26	113,40	168,24	169,38
LRC	207,5	86,26	111,9	2,303	-
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,31	-

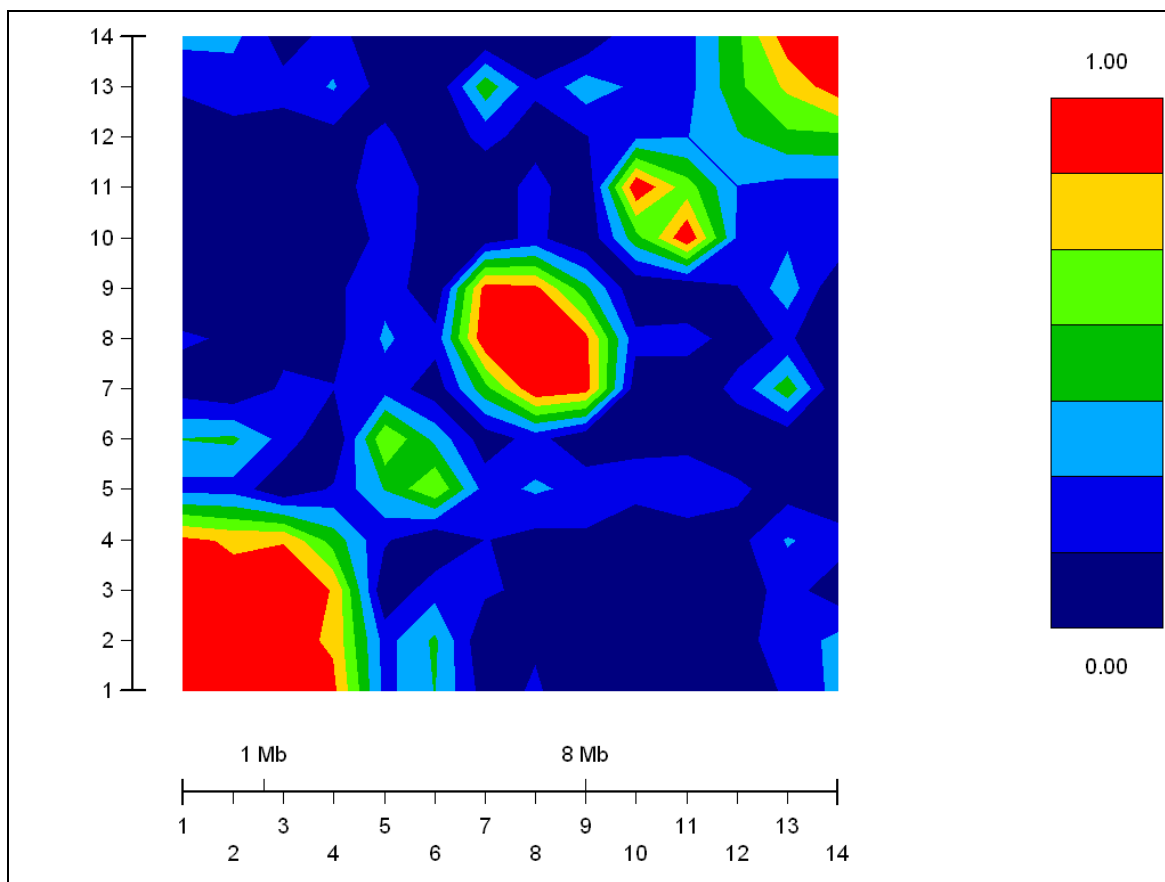
Tabela 9 - Parâmetros estimados e modelos de análise de segregação de famílias com peridontite agressiva (conclusão).

No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-123,20	-244,53	-214,81	-328,49	-330,79
Modelos	Homogêneo de não transmissão	Mendeliano Homogêneo	Homogêneo geral	Semigeral	Heterogêneo geral
Parâmetros	Com 3 susceptibilidades crescentes	Com 3 susceptibilidades crescentes	Com 3 susceptibilidades crescentes	Com 3 susceptibilidades crescentes	Com 3 susceptibilidades crescentes
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	-	1	1	1	1
$\tau(AB)$	-	0,5	0,5	1	1
$\tau(BB)$	-	0	0,42	0	0
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-222,24	-591,32	-242,59	-874,01	-878,88
LN	111,12	295,66	121,29	437,00	439,44
LRC	656,6	287,5	636,2	4,87	-
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,087	-
No. parâmetros estimados	3	3	1	2	-
AIC	-214,24	-583,32	-232,59	-866,01	-870,88

q, frequência genética; $\tau(AA)$, $\tau(AB)$, $\tau(BB)$, probabilidades de transmissão; $\beta(AA)$, $\beta(AB)$, $\beta(BB)$, valor baseline para os alelos AA, AB, BB; -2LN, log probabilidade; LN, probabilidade; LRC, critério de probabilidade; AIC, índice Akaike.

4.3 Desequilíbrio de ligação

A Figura 8 e Tabela 10 (próxima folha) resumizam os resultados de desequilíbrio de ligação dos 14 primeiros SNPs utilizados neste estudo obtidos a partir da utilização do programa GOLD¹⁰². Podemos observar que existem alguns SNPs em desequilíbrio de ligação, ou seja, transmitindo a mesma informação genética nesta população.



*A escala de cores indica os valores de D' , sendo 1.00 (cor vermelha) indicativo de desequilíbrio de ligação completo e a cor azul escura (0.00) indicativa de ausência de desequilíbrio de ligação entre os marcadores. Os números de 1 a 14 representam os marcadores (SNPs) em ordem crescente de posição física no cromossomo.

Figura 8 - Gráfico de desequilíbrio de ligação dos 14 primeiros SNPs selecionados.

Tabela 10 - Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.

SNP	rs366839	rs463228	rs2208921	rs12132519	rs1935885	rs10800889	rs1342913	rs4633293	rs12140456	rs1377924	rs2061018	rs7526348	rs1175111	rs1175152
rs366839	1	0.957	0.515	0.356	0.043	0.126	0.004	0.012	0.001	0	0.002	0.004	0.014	0.051
rs463228	0.957	1	0.466	0.316	0.040	0.147	0	0.008	0	0	0.002	0.006	0.024	0.056
rs2208921	0.515	0.466	1	0.644	0	0.041	0.016	0.006	0.005	0.006	0.001	0.005	0.030	0.004
rs12132519	0.356	0.316	0.644	1	0.019	0	0.013	0.005	0.008	0	0.005	0.008	0.058	0.023
rs1935885	0.043	0.040	0	0.019	1	0.253	0.041	0.037	0.055	0.025	0.033	0.016	0.003	0
rs10800889	0.126	0.147	0.041	0.013	0.253	1	0.002	0.032	0	0.009	0.01	0.002	0.001	0
rs1342913	0.004	0	0.016	0.013	0.041	0.002	1	0.301	0.805	0.002	0	0.02	0.107	0
rs4633293	0.012	0.008	0.006	0.005	0.037	0.032	0.301	1	0.296	0.021	0.032	0.006	0.025	0
rs12140456	0.001	0	0.005	0.008	0.055	0	0.805	0.296	1	0.021	0.032	0.006	0.025	0
rs1377924	0	0	0.006	0	0.025	0.009	0.002	0.021	0.021	1	0.076	0.056	0.068	0.068
rs2061018	0.002	0.002	0.001	0.005	0.033	0.01	0	0.032	0	0.076	1	0.08	0.043	0.056
rs7526348	0.004	0.006	0.005	0.008	0.016	0.002	0.02	0.006	0.006	0.08	0.08	1	0.262	0.265
rs1175111	0.014	0.024	0.030	0.058	0.003	0.001	0.107	0.025	0.025	0.056	0.056	0.262	1	0.679
rs1175152	0.051	0.056	0.004	0.023	0	0	0	0	0	0.068	0.056	0.262	0.679	1

*Os valores numéricos acima da linha diagonal representam o coeficiente de correlação (r^2); os valores numéricos abaixo da linha diagonal representam o coeficiente de desequilíbrio (D'). Os marcadores (SNPs) encontram-se em ordem crescente de posição física no cromossomo.

4.4 Análise de ligação familiar

A Tabela 11 (a seguir) apresenta os resultados da análise de ligação familiar utilizando o modelo não paramétrico. Podemos observar que os marcadores analisados não encontram-se em ligação, ou seja, não existe transmissão consistente dos alelos de risco dos marcadores polimórficos dentro da região cromossômica proposta neste estudo para esta população, levando-se em consideração que os valores de LOD para cada marcador são baixos (entre -0,01 e 0,06) comparados aos valores extremos (entre -1,64 e 7,71).

Tabela 11 - Resultados da análise de ligação familiar.

	Pos	Z	pvalor 1	delta	LOD	pvalor
	min	-4.96	1	-0.188	-1.64	1
	max	9.6	0	0.707	7.71	0
rs366839	42.129	-0.17	0.6	-0.061	-0.01	0.6
rs463228	42.130	-0.17	0.6	-0.061	-0.01	0.6
rs2208921	42.168	-0.09	0.5	-0.031	0	0.5
rs12132519	42.184	-0.06	0.5	-0.021	0	0.5
rs1935885	42.284	-0.07	0.5	-0.024	0	0.5
rs10800889	42.293	-0.1	0.5	-0.033	0	0.5
rs1342913	42.307	0.28	0.4	0.085	0.02	0.4
rs4633293	42.331	0.43	0.3	0.134	0.06	0.3
rs12140456	42.337	0.43	0.3	0.134	0.06	0.3
rs1377924	42.630	0.28	0.4	0.099	0.03	0.4
rs2061018	42.632	0.43	0.3	0.151	0.06	0.3
rs7526348	42.906	0.11	0.5	0.038	0	0.4
rs1175111	42.927	0.1	0.5	0.035	0	0.5
rs1175152	42.929	0.1	0.5	0.034	0	0.5

*O programa Merlin utiliza o modelo linear porposto por Kong e Cox ¹¹⁴ para avaliar a evidência de ligação (delta, LOD e pvalor). Este modelo é capaz de identificar pequenas variações na transmissão de alelos nas famílias afetadas por traços complexos. Pos indica a posição dos marcadores em cM; Z, pvalor 1, delta, LOD são parâmetros utilizados pelo programa Merlin na análise de ligação não paramétrica. A caixa cinza indica os valores extremos para cada um dos parâmetros. Um valor de LOD positivo indica presença de ligação, ou seja, excesso de alelos em comum entre os indivíduos afetados; um valor de LOD negativo indica ausência de ligação, ou seja, a quantidade de alelos em comum entre os indivíduos afetados é menor do que o esperado.

4.5 Associação e análise dos haplótipos

A Tabela 12 (a seguir) apresenta os resultados de associação entre os genótipos da população avaliada para os 14 primeiros SNPs selecionados. Uma associação foi observada entre o SNP rs1342913 ($p=0,03$) localizado na região 1q 31.1 correspondente ao íntron entre os éxons 6 e 7 do gene *FAM5C* e a periodontite agressiva. Podemos observar que o alelo A é mais frequente nesta população ($f = 0,656$) e também menos transmitido nestas famílias ($S-E(S) = -6,200$ e $Z = -2,119$) do que o alelo G que apresenta valores positivos para $S-E(S)$ e Z , porém apresenta menor frequência ($f=0,344$).

Tabela 12 - Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 14 primeiros SNPs selecionados na região de interesse (1q31.1).

SNP	Alelo	Frequência Alélica (<i>f</i>)*	S-E(S)*	Var (S)*	Z*	p-valor*
rs366839	A	0,552	2,800	7,430	1,027	0,30
	G	0,448	-2,800	7,430	-1,027	0,30
rs463228	A	0,465	-2,533	7,452	-0,928	0,35
	G	0,535	2,533	7,452	0,928	0,35
rs2208921	A	0,415	1,417	6,952	0,537	0,59
	G	0,585	-1,417	6,952	-0,537	0,59
rs12132519	A	0,616	0,133	6,241	-0,053	0,95
	G	0,384	-0,133	6,241	0,053	0,95
rs1935885	A	0,397	0,250	4,938	0,113	0,91
	G	0,603	-0,250	4,938	-0,113	0,91
rs10800889	A	0,508	2,267	5,920	0,932	0,35
	G	0,492	-2,267	5,920	-0,932	0,35
rs1342913	A	0,656	-6,200	8,563	-2,119	0,03
	G	0,344	6,200	8,563	2,119	0,03
rs4633293	A	0,410	2,333	9,111	0,773	0,43
	G	0,590	-2,333	9,111	-0,773	0,43
rs12140456	C	0,339	2,300	9,354	0,752	0,45
	G	0,661	-2,300	9,354	-0,752	0,45
rs1377924	C	0,561	0,167	10,794	0,051	0,95
	G	0,439	-0,167	10,794	-0,051	0,95
rs2061018	A	0,452	2,667	10,767	0,813	0,41
	T	0,548	-2,667	10,767	-0,813	0,41
rs7526348	A	0,504	0,700	6,296	0,279	0,78
	G	0,496	-0,700	6,296	-0,279	0,78
rs1175111	A	0,487	-0,917	8,259	-0,319	0,74
	G	0,513	0,917	8,259	0,319	0,74
rs1175152	A	0,425	2,333	8,518	0,799	0,42
	G	0,575	-2,333	8,518	-0,799	0,42

* *f*, S-E(S), Var(S), Z e p são parâmetros utilizados pelo programa FBAT^{106,107} para calcular associação. Em cinza o SNP associado a periodontite agressiva.

Sendo assim mais 7 SNPs foram selecionados na região correspondente ao gene *FAM5C* seguindo os parâmetros de seleção descritos no tópico 3.7 do Material e métodos. Os resultados da análise de associação para esses SNPs adicionais estão na Tabela 13 (a seguir). Todos os 21 SNPs analisados neste estudo estavam sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 14, na folha 64). Os únicos 2 SNPs cujas frequências alélicas e demais parâmetros apresentados na Tabela 13 puderam ser estimados nesta população foram rs1935881 e rs1053081 sendo que somente o primeiro demonstrou associação com o fenótipo da periodontite agressiva ($p=0,03$). O alelo A de rs1935881 apresenta-se como o mais frequente ($f=0,813$) e o mais transmitido nestas famílias por demonstrar valores positivos para S-E(S) e Z enquanto o alelo G é o menos frequente ($f=0,187$) e o menos transmitido nestas famílias por demonstrar valores negativos para S-E(S) e Z. Os resultados do PLINK¹⁰⁸ confirmaram a associação encontrada entre a periodontite

agressiva e os marcadores rs1935881 (OR=0,50 95% CI 0,15-1,66 p=0,07) e rs1342913 (OR=3,2 95% CI 1,17-8,73 p=0,03) (Tabela 15, na folha 65).

Tabela 13 - Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 7 SNPs adicionais selecionados na região do gene *FAM5C*.

SNP	Alelo	Frequência Alélica (f)*	S-E(S)*	Var (S)*	Z*	p-valor*
rs1935881	G	0,187	-5,417	5,980	2,215	0,03
	A	0,813	5,417	5,980	2,215	0,03
rs35296429	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-
rs1053081	A	0,989	1,000	1,000	1,000	0,32
	G	0,011	-1,000	1,000	1,000	0,32
rs35481069	G	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-
rs34739035	G	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-
rs34098782	C	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	-	-
rs61818811	A	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-

* f, S-E(S), Var(S), Z e p são parâmetros utilizados pelo programa FBAT^{106,107} para calcular associação. Em cinza o SNP associado a periodontite agressiva

Tabela 14 - Resultados do teste de Hardy-Weinberg dos 21 SNPs selecionados neste estudo.

SNP	Status de PA	Alelo raro	Alelo comum	Heterozigotidade observada	Heterozigotidade esperada	p valor
rs366839	Todos	G	A	0.47	0.47	1
	Afetados	G	A	0.58	0.48	0.63
	Não afetados	G	A	0.38	0.46	0.42
rs463228	Todos	A	G	0.48	0.48	1
	Afetados	A	G	0.60	0.48	0.38
	Não afetados	A	G	0.38	0.48	0.26
rs2208921	Todos	A	G	0.49	0.50	1
	Afetados	A	G	0.53	0.50	1
	Não afetados	A	G	0.45	0.50	0.72
rs12132519	Todos	G	A	0.51	0.49	1
	Afetados	G	A	0.35	0.47	0.34
	Não afetados	G	A	0.61	0.49	0.44
rs1935885	Todos	A	G	0.31	0.44	0.03
	Afetados	A	G	0.20	0.38	0.05
	Não afetados	A	G	0.39	0.47	0.45
rs1935881	Todos	G	A	0.31	0.33	0.67
	Afetados	G	A	0.40	0.32	0.55
	Não afetados	G	A	0.26	0.35	0.14
rs35296429	Todos	-	A	0	0	1
	Afetados	-	A	0	0	1
	Não afetados	-	A	0	0	1
rs1053081	Todos	G	A	0.02	0.02	1
	Afetados	G	A	0	0	1
	Não afetados	G	A	0.03	0.03	1
rs35481069	Todos	G	T	0.02	0.02	1
	Afetados	G	T	0	0	1
	Não afetados	G	T	0.03	0.03	1
rs34739035	Todos	G	T	0.02	0.02	1
	Afetados	G	T	0	0	1
	Não afetados	G	T	0.03	0.03	1
rs34098782	Todos	-	C	0	0	1
	Afetados	-	C	0	0	1
	Não afetados	-	C	0	0	1
rs10800889	Todos	A	G	0.38	0.50	0.09
	Afetados	A	G	0.40	0.50	0.39
	Não afetados	A	G	0.38	0.50	0.26
rs1342913	Todos	G	A	0.40	0.42	0.73
	Afetados	G	A	0.53	0.43	0.61
	Não afetados	G	A	0.31	0.41	0.19
rs4633293	Todos	A	G	0.38	0.49	0.16
	Afetados	A	G	0.30	0.46	0.15
	Não afetados	A	G	0.45	0.50	0.72
rs12140456	Todos	C	G	0.41	0.42	1
	Afetados	C	G	0.50	0.42	0.62
	Não afetados	C	G	0.37	0.43	0.41
rs61818811	Todos	A	C	0.02	0.02	1
	Afetados	A	C	0	0	1
	Não afetados	A	C	0.03	0.03	1
rs1377924	Todos	G	C	0.53	0.49	0.78
	Afetados	G	C	0.35	0.47	0.34
	Não afetados	G	C	0.63	0.50	0.27
rs2061018	Todos	A	T	0.51	0.49	1
	Afetados	A	T	0.29	0.47	0.14
	Não afetados	A	T	0.62	0.50	0.28
rs7526348	Todos	A	G	0.51	0.50	1
	Afetados	A	G	0.68	0.49	0.18
	Não afetados	A	G	0.39	0.50	0.28
rs1175111	Todos	G	A	0.55	0.50	0.58
	Afetados	G	A	0.65	0.49	0.35
	Não afetados	G	A	0.50	0.50	1
rs1175152	Todos	A	G	0.51	0.49	1
	Afetados	A	G	0.65	0.49	0.35
	Não afetados	A	G	0.43	0.50	0.48

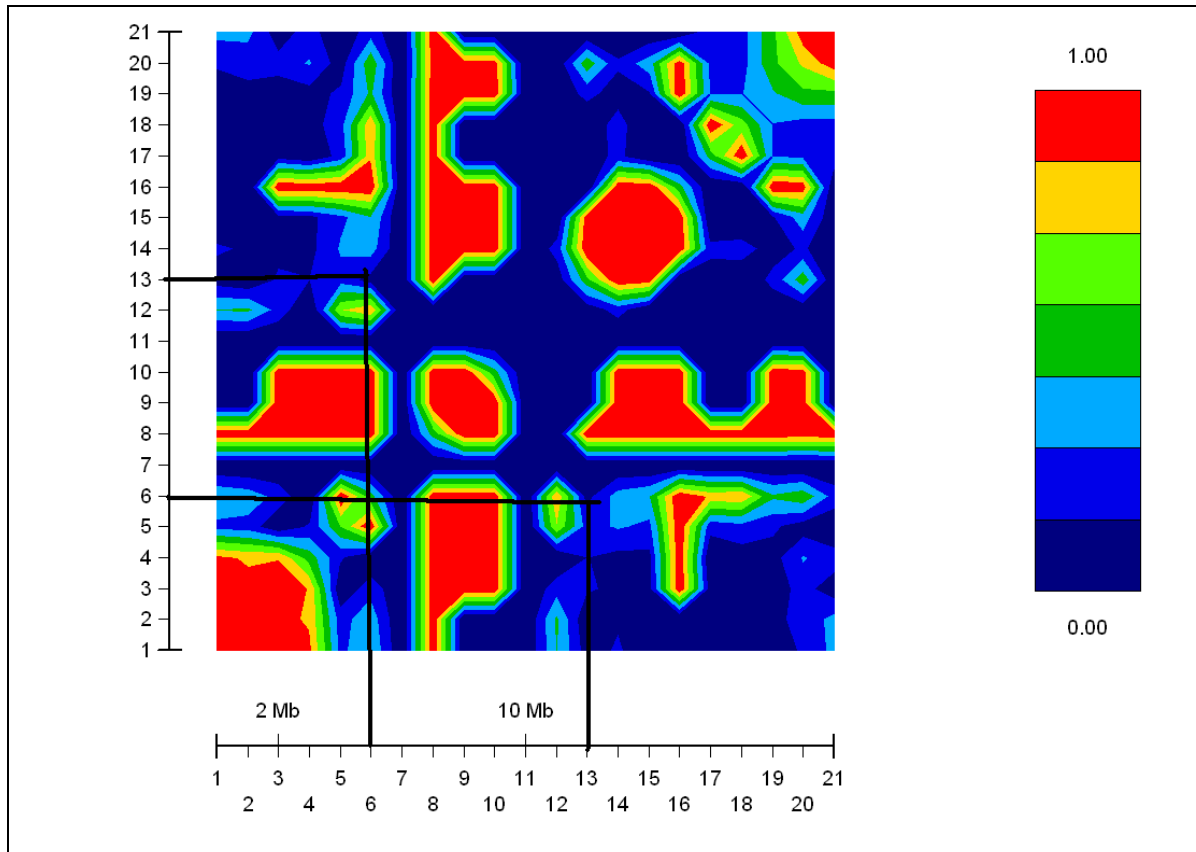
* $p \geq 0.05$ consistente com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dados gerados pelo programa PLINK¹⁰⁸. As caixas cinza indicam os alelos mais transmitidos dos 2 SNPs associados com a periodontite agressiva.

Tabela 15 - Resultados de associação entre a periodontite agressiva nas famílias avaliadas e o genótipo obtido a partir dos 21 SNPs selecionados no estudo.

SNP	Posição	Alelo raro	Alelo comum	OR (95% CI)	p valor
rs366839	187,825,289	G	A	2 (0.68-5.85)	0.84
rs463228	187,828,998	A	G	2 (0.60-6.64)	1
rs2208921	187,947,000	A	G	0.875 (0.32-2.41)	0.55
rs12132519	187,997,671	G	A	0.55 (0.19-1.66)	1
rs1935885	188,314,448	A	G	0.54 (3.75-0.53)	0.24
rs1935881	188,333,009	G	A	0.50 (0.15-1.66)	0.07
rs35296429	188,333,533	-	A	-	-
rs1053081	188,333,608	G	A	0.33 (0.03-3.21)	0.32
rs35481069	188,334,216	G	T	-	-
rs34739035	188,334,578	G	T	-	-
rs34098782	188,334,831	-	C	-	-
rs10800889	188,341,501	A	G	1.75 (0.51-5.98)	0.18
rs1342913	188,387,648	G	A	3.2 (1.17-8.73)	0.03
rs4633293	188,461,532	A	G	1 (0.43-2.31)	0.84
rs12140456	188,479,488	C	G	1.22 (0.51-2.95)	0.58
rs61818811	188,713,220	A	C	-	-
rs1377924	189,425,718	G	C	0.93 (0.45-1.93)	1
rs2061018	189,429,170	A	T	1.15 (0.55-2.42)	0.60
rs7526348	190,390,334	A	G	0.89 (0.34-2.30)	0.43
rs1175111	190,472,655	G	A	0.5 (0.17-1.46)	0.83
rs1175152	190,479,859	A	G	0.78 (0.29-2.09)	0.81

* Resultados obtidos com o programa PLINK¹⁰⁸. As caixas cinza indicam os alelos mais transmitidos dos 2 SNPs com p valor significante.

O programa GOLD¹⁰² foi utilizado novamente para a análise de desequilíbrio de ligação de todos os SNPs utilizados neste estudo; os resultados encontram-se na Figura 9 e Tabela 16 (a seguir). Podemos observar que existem alguns SNPs em desequilíbrio de ligação. Contudo os SNPs associados com a periodontite agressiva nesta população (rs1935881 rs1342913) representados na Figura 9 pelos números 6 e 13 respectivamente não estão em desequilíbrio de ligação. Sendo assim eles são responsáveis pela transmissão de informação genética variada. Os valores dos coeficientes de correlação ($r^2 = 0,001$) e desequilíbrio ($D' = 0,096$) entre estes 2 SNPs apresentados na Tabela 16 comprovam numericamente a imagem gerada pelo programa GOLD¹⁰² (Figura 9).



*A escala de cores indica os valores de D' sendo 1.00 (cor vermelha) indicativo de desequilíbrio de ligação completo e a cor azul escura (0.00) indicativa de ausência de desequilíbrio de ligação entre os marcadores. Os números de 1 a 21 representam os marcadores (SNPs) em ordem crescente de posição física no cromossomo. Os números 6 e 13 indicam os SNPs rs1935881 e rs1342913 respectivamente.

Figura 9 - Gráfico de desequilíbrio de ligação dos 21 SNPs selecionados.

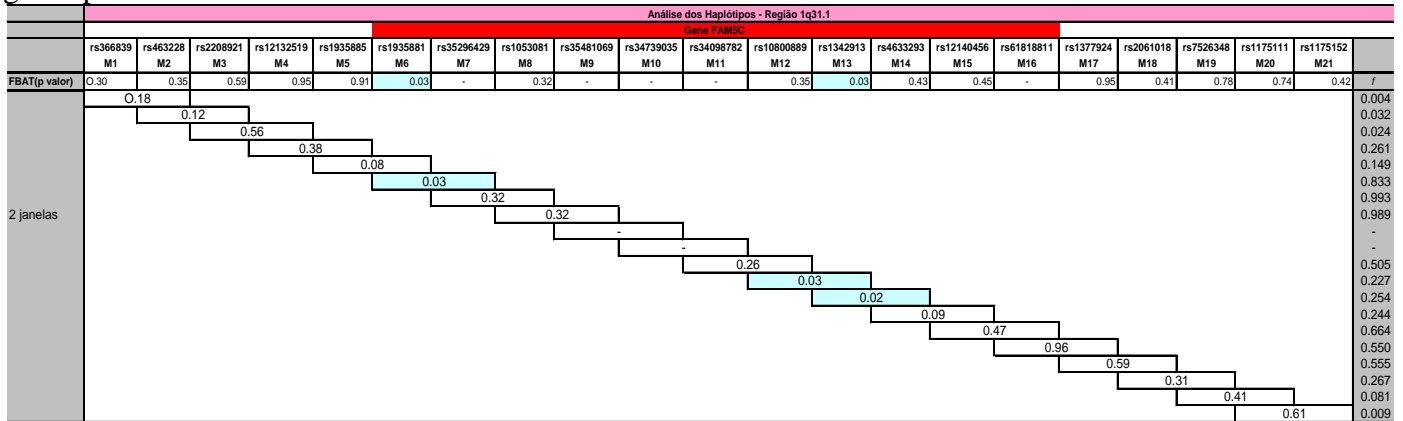
Tabela 16 - Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.

SNP	rs366839	rs463228	rs2208921	rs12132519	rs1935885	rs1935881	rs35296429	rs1053081	rs55481069	rs34739035	rs34098782	rs10800889	rs1342913	rs4633293	rs12140456	rs61818811	rs1377924	rs2061018	rs7526348	rs1175111	rs1175152
rs366839	1	0.957	0.515	0.356	0.043	0.033	0	0.017	0	0	0	0.126	0.004	0.012	0.001	0	0	0.002	0.004	0.014	0.051
rs463228	1	1	0.466	0.316	0.04	0.023	0	0.015	0	0	0.147	0	0.008	0	0	0	0.002	0.006	0.024	0.056	
rs2208921	1	0.93	1	0.644	0	0.018	0	0.012	0.012	0.012	0	0.041	0.016	0.006	0.005	0.012	0.006	0.001	0.005	0.03	0.004
rs12132519	0.908	0.829	0.855	1	0.019	0	0	0.015	0.014	0.014	0	0	0.013	0.005	0.008	0.014	0	0.005	0.008	0.058	0.023
rs1935885	0.242	0.233	0.02	0.167	1	0.13	0	0.02	0.02	0.02	0	0.253	0.041	0.037	0.055	0.02	0.025	0.033	0.016	0.003	0
rs1935881	0.446	0.383	0.237	0.016	1	1	0	0.002	0.036	0.036	0	0.18	0.001	0.045	0.021	0.036	0.144	0.166	0.047	0.075	0.01
rs35296429	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rs1053081	1	1	0.997	0.999	1	1	0	1	0	0	0	0	0.025	0.008	0.022	0	0.013	0.014	0.012	0.01	0.013
rs35481069	0	0	1	0.999	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0.012	0.023	1	0	0	0.012	0.01	0
rs34739035	0	0	1	0.999	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0.012	0.023	1	0	0	0.012	0.01	0
rs34098782	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rs10800889	0.439	0.462	0.234	0	0.719	0.865	0	0	0	0	0	0	0.002	0.032	0	0	0.009	0.01	0.002	0.001	0
rs1342913	0.073	0.004	0.174	0.148	0.228	0.096	0	1	0	0	0	0.063	0	0.301	0.805	0	0.002	0	0.02	0.107	0
rs4633293	0.164	0.125	0.092	0.098	0.309	0.363	0	1	0.998	0.998	0	0.201	1	0	0.296	0.012	0.021	0.032	0.006	0.025	0
rs12140456	0.04	0.032	0.098	0.112	0.246	0.434	0	1	1	1	0	0.02	0.944	0.909	0	0.023	0	0	0.01	0.059	0
rs61818811	0	0	1	0.999	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0.998	1	0	0	0	0.012	0.01	0
rs1377924	0.014	0.011	0.093	0.01	0.202	0.838	0	1	0	0	0	0.107	0.069	0.184	0.024	0	0	1	0.076	0.056	0.068
rs2061018	0.059	0.068	0.029	0.079	0.233	0.846	0	1	0	0	0	0.102	0.034	0.207	0.007	0	1	0	0.08	0.043	0.056
rs7526348	0.087	0.108	0.072	0.093	0.171	0.454	0	1	0.998	0.998	0	0.053	0.187	0.079	0.138	0.998	0.276	0.283	0	0.262	0.265
rs1175111	0.158	0.192	0.199	0.303	0.076	0.548	0	0.97	0.969	0.969	0	0.027	0.531	0.17	0.374	0.969	0.261	0.237	0.543	0	0.679
rs1175152	0.334	0.333	0.067	0.209	0.022	0.229	0	0.999	0	0	0	0.005	0.021	0.005	0.016	0	0.266	0.236	0.547	0.949	0

*Os valores numéricos acima da linha diagonal representam o coeficiente de correlação (r^2); os valores numéricos abaixo da linha diagonal representam o coeficiente de desequilíbrio (D'). Os marcadores (SNPs) encontram-se em ordem crescente de posição física no cromossomo. Os valores marcados em cinza escuro representam r^2 e D' entre os SNPs associados com a periodontite agressiva na população avaliada.

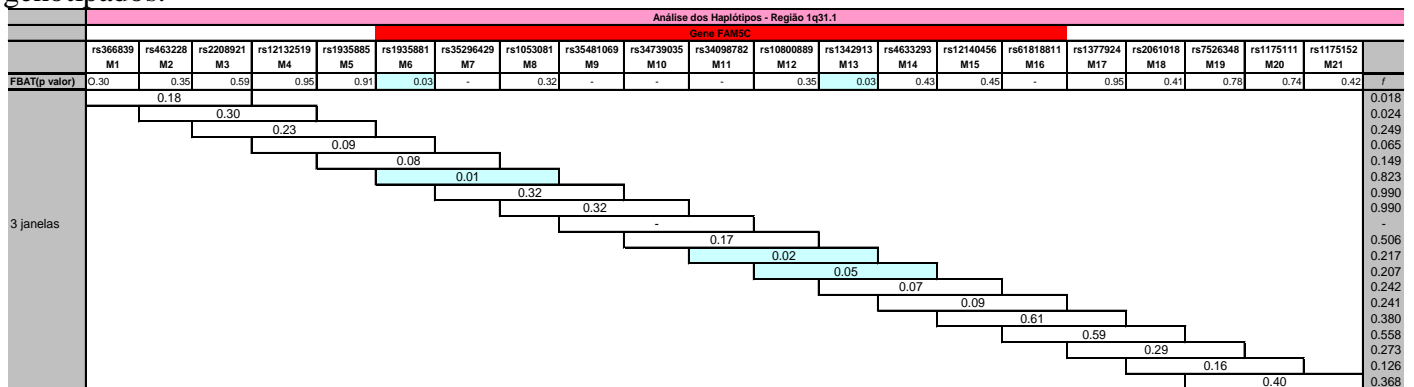
A análise dos haplótipos de todos os SNPs genotipados está apresentada nas Tabelas 17 a 20 (em sequência). Podemos observar que os haplótipos com p valor significantes ($p \leq 0,05$) estão sempre relacionados aos alelos dos 2 SNPs na região do gene *FAM5C* e associados com a periodontite agressiva nesta população.

Tabela 17 - Resultados dos haplótipos de 2 janelas (agrupando os marcadores de 2 em 2) de todos os SNPs genotipados.



f representa a frequência dos haplótipos nesta população; M1 a M21 indica a ordem crescente dos SNPs de acordo com a posição física no cromossomo; as caixas de cor verde indicam p valores $\leq 0,05$ e a barra vermelha indica os SNPs dentro do gene *FAM5C*

Tabela 18 - Resultados dos haplótipos de 3 janelas (agrupando os marcadores de 3 em 3) de todos os SNPs genotipados.



f representa a frequência dos haplótipos nesta população; M1 a M21 indica a ordem crescente dos SNPs de acordo com a posição física no cromossomo; as caixas de cor verde indicam p valores $\leq 0,05$ e a barra vermelha indica os SNPs dentro do gene *FAM5C*

Tabela 19 - Resultados dos haplótipos de 4 janelas (agrupando os marcadores de 4 em 4) de todos os SNPs genotipados.

Análise dos Haplótipos - Região 1q31.1																					
Gene FAM5C																					
	rs366839	rs463228	rs2208921	rs12132519	rs1935885	rs1935881	rs35296429	rs1053081	rs35481069	rs34739035	rs34098782	rs10800889	rs1342913	rs4633293	rs12140456	rs61818811	rs1377924	rs2061018	rs7526348	rs1175111	rs1175152
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
FBAT(p valor)	0.30	0.35	0.59	0.95	0.91	0.03	-	0.32	-	-	-	0.35	0.03	0.43	0.45	-	0.95	0.41	0.78	0.74	0.42
4 janelas																					

f representa a frequência dos haplótipos nesta população; M1 a M21 indica a ordem crescente dos SNPs de acordo com a posição física no cromossomo; as caixas de cor verde indicam p valores $\leq 0,05$ e a barra vermelha indica os SNPs dentro do gene *FAM5C*

Tabela 20 - Resultados dos haplótipos de 5 janelas (agrupando os marcadores de 5 em 5) de todos os SNPs genotipados.

Análise dos Haplótipos - Região 1q31.1																					
Gene FAM5C																					
	rs366839	rs463228	rs2208921	rs12132519	rs1935885	rs1935881	rs35296429	rs1053081	rs35481069	rs34739035	rs34098782	rs10800889	rs1342913	rs4633293	rs12140456	rs61818811	rs1377924	rs2061018	rs7526348	rs1175111	rs1175152
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21
FBAT(p valor)	0.30	0.35	0.59	0.95	0.91	0.03	-	0.32	-	-	-	0.35	0.03	0.43	0.45	-	0.95	0.41	0.78	0.74	0.42
5 janelas																					

f representa a frequência dos haplótipos nesta população; M1 a M21 indica a ordem crescente dos SNPs de acordo com a posição física no cromossomo; as caixas de cor verde indicam p valores $\leq 0,05$ e a barra vermelha indica os SNPs dentro do gene *FAM5C*

4.6 Experimentos de bioinformática

O primeiro experimento de bioinformática realizado foi a priorização dos genes candidatos na região de interesse como associada a periodontite agressiva localizada em uma população americana⁷ e confirmada neste estudo como associada a periodontite agressiva nesta população. O programa listou um total de 88 genes potencialmente envolvidos com a periodontite em humanos apresentando o nosso gene candidato (*FAM5C*) na décima quarta posição. Os resultados obtidos nesta análise com o auxílio do programa ENDEAVOUR¹⁰⁹ estão sumarizados na Tabela 21 (próxima folha). Em seguida

limitamos a região acima a região dos SNPs selecionados neste estudo (Chr1:187825289-190479859) e mantivemos os mesmos parâmetros utilizados na análise anterior. Desta maneira, gene *FAM5C* foi listado em primeiro lugar (Tabela 22).

Tabela 21 - Rank dos 30 primeiros genes candidatos na região de interesse 1q 24.2 a 1q 31.3.

	Gene	Código Identificador	Q-valor	P-valor
1	LAMC1	ENSG00000135862	1.71E-04	0.012939759
2	HMCN1	ENSG00000143341	0.002337155	0.058802416
3	SERPINC1	ENSG00000117601	0.002887984	0.066441256
4	LAMC2	ENSG00000058085	0.005084864	0.092048951
5	DHX9	ENSG00000135829	0.006560559	0.106573158
6	DARS2	ENSG00000117593	0.00962429	0.132768428
7	GLUL	ENSG00000135821	0.012335513	0.153002724
8	CACNA1E	ENSG00000198216	0.018711264	0.153894173
9	TNN	ENSG00000120332	0.016950405	0.183336277
10	TPR	ENSG00000047410	0.017281268	0.18535812
11	PLA2G4A	ENSG00000116711	0.017873584	0.188934316
12	PRG4	ENSG00000116690	0.018354507	0.191798513
13	ASTN1	ENSG00000152092	0.018383129	0.191967896
14	FAM5C	ENSG00000162670	0.01988257	0.200679246
15	LHX4	ENSG00000121454	0.020477186	0.20405009
16	FAM5B	ENSG00000198797	0.029710971	0.204086435
17	TOR3A	ENSG00000186283	0.029710971	0.204086435
18	PTGS2	ENSG00000073756	0.02203818	0.21269107
19	NPHS2	ENSG00000116218	0.023344996	0.219709623
20	TNR	ENSG00000116147	0.023979115	0.22304945
21	C1orf25	ENSG00000121486	0.023993248	0.223123416
22	KLHL20	ENSG00000076321	0.026675431	0.236810467
23	MR1	ENSG00000153029	0.028000995	0.243335149
24	C1orf27	ENSG00000157181	0.029022383	0.24826337
25	NPL	ENSG00000135838	0.029072398	0.248502559
26	QSCN6	ENSG00000116260	0.029223926	0.249226025
27	FAM20B	ENSG00000116199	0.029308798	0.249630459
28	RGS8	ENSG00000135824	0.029716278	0.251564488
29	IVNS1ABP	ENSG00000116679	0.030168834	0.253697684
30	RGS13	ENSG00000127074	0.030372863	0.254654402

*Valor deQ e valor de P são parâmetros utilizados pelo programa ENDEAVOUR¹⁰⁹.

Tabela 22 - Rank dos genes candidatos na região de interesse 1q 31.1 a 1q31.2.

	Gene	Código Identificador	Q-valor	P-valor
1	FAM5C	ENSG00000162670	0.02491375	0.227897869
2	-	ENSG00000207059	0.125	0.386479085
3	RGS13	ENSG00000127074	0.044263733	0.416620722
4	RGS1	ENSG00000090104	0.106541667	0.628945741
5	-	ENSG00000198708	0.361111111	0.84987051
6	RGS18	ENSG00000150681	0.476157407	0.94166678

*Valor deQ e valor de P são parâmetros utilizados pelo programa ENDEAVOUR¹⁰⁹

A próxima análise foi a verificação de possíveis alterações nos sítios de ligação dos 2 SNPs associados a periodontite agressiva (rs1935881 rs1342913) e localizados no gene *FAM5C* quando ocorre a mudança do alelo comum para o alelo raro. Os dados obtidos com o programa TRANSFAC[®] 7.0 Public 2005 podem ser visualizados nos Quadros 7 e 8.

CTTCCCTTTCTACATTCTAGGAACCAATAATCAGCACACTCGGCACAATTAT alelo ancestral			
seq(0.. 59) cttccctttctacattctaggaaccaataatcagcacactcggcacaattat			
Segmentos:			
<u>3.6.1.0</u>	7	16	====TEC1==
<u>3.4.1.0</u>	14	23	====HSTF==
<u>1.1.3.0</u>	20	29	<u>=C/EBPalp=</u>
<u>3.1.2.2</u>	26	35	<u>===Oct-1==</u>
<u>1.3.1.2</u>	31	40	====USF====
<u>3.1.2.1</u>	46	55	====Pit-1==
CTTCCCTTTCTACATTCTAGGAACCAATAATCAGCACACTCGGCACAATTAT alelo mutante			
seq(0.. 59) cttccctttctacattctaggaaccagtaatcagcacactcggcacaattat			
Segmentos:			
<u>3.6.1.0</u>	7	16	====TEC1==
<u>3.4.1.0</u>	14	23	====HSTF==
<u>1.3.1.2</u>	31	40	====USF====
<u>3.1.2.1</u>	46	55	====Pit-1==

**TEC1 HSTF C/EBPalp Oct-1 USF e Pit-1* são os fatores de transcrição presentes nos sítios de ligação do SNP rs1935881 na presença do alelo ancestral. Na presença do alelo mutante os fatores de transcrição *C/EBPalp e Oct-1* desaparecem.

Quadro 7 - Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs1935881 associado a periodontite agressiva e localizados no gene *FAM5C*.

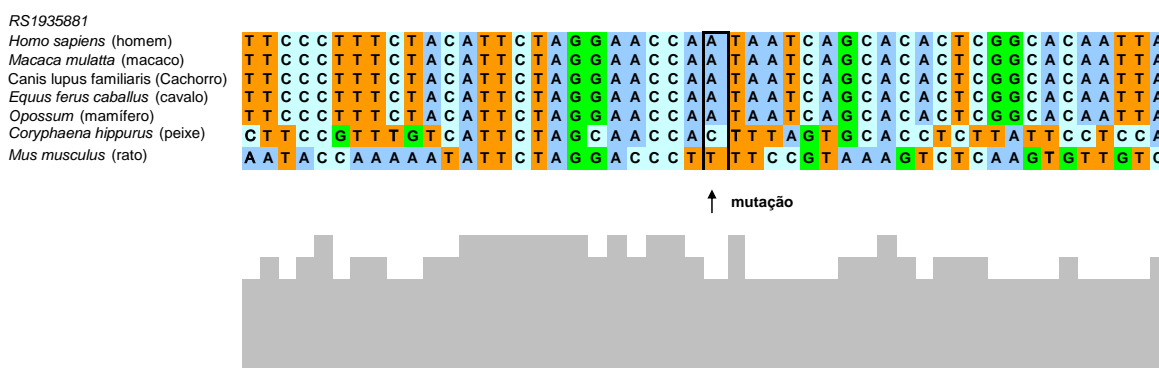
GCCTAAAATCAAAAAACTGGAGAAAAATGACGTGACACTGATCTCCAAGCA alelo ancestral			
seq(0.. 59) gcctaaaatcaaaaaactggagaaaaatgacgtgacactgatctccaagca			
Segmentos:			
<u>2.3.1.0</u>	18	27	<u>====Sp1====</u>
<u>1.1.1.6</u>	24	37	====ATF====
<u>2.3.3.0</u>	25	34	<u>=CPE bind=</u>
<u>1.1.2.0</u>	28	37	====CREB==
<u>1.1.3.0</u>	44	53	<u>=C/EBPalp=</u>
GCCTAAAATCAAAAAACTGGAGAAAAATAATGACGTGACACTGATCTCCAAGCA alelo mutante			
seq(0.. 59) gcctaaaatcaaaaaactggagaaaaatgacgtgacactgatctccaagca			
Segmentos:			
<u>1.1.3.0</u>	23	32	<u>=C/EBPalp=</u>
<u>1.1.1.6</u>	24	33	<u>==CRE-BP1=</u>
<u>2.3.3.0</u>	24	33	<u>=CPE bind=</u>
<u>9.9.51</u>	24	33	====ATF====
<u>1.1.2.0</u>	28	37	====CREB==
<u>1.1.3.0</u>	44	53	<u>=C/EBPalp=</u>

**Sp1 ATF CPE bind CREB e C/EBPalp* são os fatores de transcrição presentes nos sítios de ligação do SNP rs1342913 na presença do alelo ancestral. Na presença do alelo mutante surge um fator de transcrição adicional *C/EBPalp* e um novo fator de transcrição chamado *CRE-BP1*. O fator de transcrição *Sp1* desaparece na presença do alelo mutante.

Quadro 8 - Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs1342913 associado a periodontite agressiva e localizados no gene *FAM5C*.

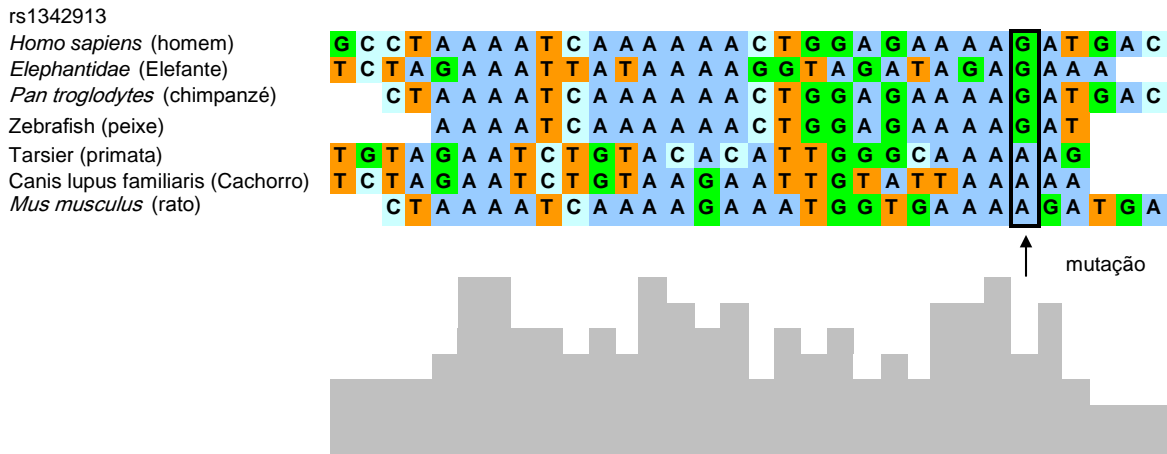
Podemos observar que em ambos os SNPs ocorrem modificações de alguns fatores de transcrição nos sítios de ligação quando ocorre a mudança do alelo ancestral para o alelo mutante. No caso do SNP rs 1935881 (A>G) quando o alelo mutante G substitui o alelo ancestral A os 2 fatores de transcrição a seguir desaparecem dos sítios de ligação deste SNP: *C/EBPalp* e *Oct-1*. *C/EBPalp* é um gene localizado no cromossomo 19 (19q13.1) em humanos e codifica uma proteína com o mesmo nome. Esta proteína interage com as proteínas quinases CDK2 e CDK4 inibindo o desenvolvimento e função das mesmas¹¹⁵. *Oct-1* cujo nome oficial é POU2F1 é um gene localizado no cromossomo 1 (1q22-q23) em humanos e codifica uma proteína com o mesmo nome. Com relação ao SNP rs1342913 (G>A), observamos as seguintes mudanças: na presença do alelo ancestral G surge o fator de transcrição *Sp1* e na presença do alelo mutante A surgem os fatores *CRE-BP1* e *C/EBPalp*. *Sp1* é um gene localizado no cromossomo 12 (12q13.1) em humanos codifica uma proteína com o mesmo nome e parece relacionado a vários tipos de carcinomas¹¹⁵. *CRE-BP1* cujo nome oficial é ATF2 localiza-se no cromossomo 2 (2q32) em humanos e codifica uma proteína com o mesmo nome e também parece relacionado a vários tipos de carcinomas¹¹⁵.

Em seguida fizemos a comparação entre a sequência de nucleotídeos dos 2 SNPs associados a periodontite agressiva neste estudo em humanos e a sequência de nucleotídeos em diferentes espécies de seres vivos buscando regiões conservadas entre as espécies (Figura 10 e Figura 11, a seguir). A sequência de nucleotídeos de ambos os SNPs próximo a região variante apresenta-se bem conservada nesta análise comparativa entre espécies de seres vivos.



*Cada nucleotídeo está representado por uma cor diferente. A barra cinza representa a conservação entre as espécies em cada sítio.

Figura 10 - Gráfico de comparação entre espécies da sequência de nucleotídeos do SNP rs1935881.



*Cada nucleotídeo está representado por uma cor diferente. A barra cinza representa a conservação entre as espécies em cada sítio.

Figura 11 - Gráfico de comparação entre espécies da sequência de nucleotídeos do SNP rs1342913.

4.7 Sequenciamento dos éxons de *FAM5C*

Não foram encontradas mutações nas sequências dos éxons de *FAM5C* nos indivíduos homocigotos para o haplótipo associado com a periodontite agressiva nesta população, não confirmando nossa hipótese que esse haplótipo nos pacientes afetados pela periodontite agressiva pudesse “carregar” mutações de risco para a doença nesta população.

4.8 Sequenciamento das regiões conservadas de *FAM5C*

Foram encontradas duas mutações em duas diferentes regiões intrônicas conservadas de *FAM5C* nos indivíduos homocigotos para o haplótipo associado com a periodontite agressiva nesta população. Cada uma dessas mutações está representada por um SNP: rs57694932 (A>G) e rs10494634 (A>T) ambos localizados na região 1q 31.1.

O Quadro 9 (próxima folha) apresenta o fenótipo e os genótipos encontrados no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C* de cada indivíduo selecionado para o sequenciamento do gene *FAM5C*. Podemos observar que os indivíduos

sadios apresentam uma ou duas cópias do alelo ancestral enquanto os indivíduos afetados pela PA apresentam, com maior frequência, uma ou duas cópias do alelo mutante.

ID	IDADE	FENÓTIPO	GENÓTIPO rs57694932 (A/G)	GENÓTIPO rs10494634 (A/T)
9A	36	PA Generalizada	AG	AA
10G	36	PA Generalizada	AG	AT
15A	26	PA Generalizada	AA	AT
18D	34	PA Generalizada	GG	AA
51A	40	PA Generalizada	AA	TT
52E	28	PA Localizada	AA	AT
60A	31	PA Generalizada	AG	AT
70A	32	PA Generalizada	AG	AA
74A	32	PA Localizada	AG	AA
14B	60	Sadio	AG	AT
59H	34	Sadio	AG	AA
CEPH	-	Sadio	AA	AA

*ID identificação do indivíduo; CEPH amostra controle do CEPH; PA periodontite agressiva. Em cinza os genótipos formados por 2 alelos mutantes.

Quadro 9 - Fenótipo e as variantes alélicas encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C*

A próxima análise foi a verificação de possíveis alterações de fatores de transcrição nos sítios de ligação dos 2 SNPs acima que contém as variantes encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C* quando ocorre a mudança do alelo comum para o alelo raro. Os dados obtidos com o programa TRANSFAC[®] 7.0¹¹⁰ podem ser visualizados no Quadro 10 e no Quadro 11 (a seguir).

CTTTTAAAATTAAACAAATGCAACAGTCCAGAAAAGTTAATAAAAAAAGCTTAATCCTGAT alelo ancestral				
seq(0..	59)	cttttaaattaacaaatgcaacagtccagaaaagttaataaaaaaagcttaatcctga	
Segmentos:				
1.1.3.0	8	17	===C/EBP==	
CTTTTAAAATTAAACAAATGCAACAGTCCAGGAAAGTTAATAAAAAAAGCTTAATCCTGAT alelo mutante				
seq(0..	59)	cttttaaattaacaaatgcaacagtccagaaaagttaataaaaaaagcttaatcctga	
Segmentos:				
1.1.3.0	8	17	===C/EBP==	
9.9.428	29	38		===ISGF-3=

*C/EBPé o fator de transcrição presentes nos sítios de ligação do SNP rs57694932 na presença do alelo ancestral. Na presença do alelo mutante surge um fator de transcrição adicional ISGF-3.

Quadro 10 - Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs57694932.

CATTATGAGAGAATAATTCTTACATGGCAG A GAACTATAATAAATTCTAATGTAATGTTTC			alelo ancestral
seq(0.. 59) cattatgagagaataattctttacatggcagagaactataataaattctaatgtaatgttc			
Segmentos:			
<u>1.1.3.0</u>	47	56	=C/EBPalp=
<u>2.1.1.1</u>	51	60	====GR==
CATTATGAGAGAATAATTCTTACATGGCAG T GAACTATAATAAATTCTAATGTAATGTTTC			alelo mutante
seq(0.. 59) cattatgagagaataattctttacatggcagtgactataataaattctaatgtaatgttc			
Segments:			
<u>9.9.539</u>	20	29	====NF-1==
<u>1.1.3.0</u>	47	56	=C/EBPalp=
<u>2.1.1.1</u>	51	60	====GR==

**C/EBPalp* e *GR* são os fatores de transcrição presentes nos sítios de ligação do SNP rs10494634 na presença do alelo ancestral. Na presença do alelo mutante surge um fator de transcrição adicional *NF-1*.

Quadro 11 - Prováveis alterações nos sítios de ligação do SNP rs10494634.

Podemos observar que em ambos os SNPs ocorrem modificações de alguns fatores de transcrição nos sítios de ligação quando ocorre a mudança do alelo ancestral para o alelo mutante. No caso do SNP rs57694932 (A>G) quando o alelo mutante G substitui o alelo ancestral A o fator de transcrição *ISGF-3* aparece dos sítios de ligação deste SNP. *ISGF-3* é um gene localizado no cromossomo 2 (2q32.2) em humanos e codifica uma proteína com o mesmo nome. Esta proteína é membro da família *STAT* que em resposta a diversas citocinas e fatores de crescimento sofrem fosforilação e translocam-se para o núcleo onde passam a atuar como fatores de transcrição. Esta proteína pode ser ativada por vários ligantes entre eles o interferon alfa (INF- α) interferon gama (INF- δ) fator de crescimento plaquetário (PDGF) e Il-6. Esta proteína media a expressão de vários genes fato importante para a viabilidade celular em resposta a estímulos diferentes de células e organismos patogênicos¹¹⁵

Com relação ao SNP rs10494634 (A>T) na presença do alelo mutante T observamos o surgimento do fator de transcrição *NF-1* que codifica uma proteína com o mesmo nome e localiza-se no cromossomo 17 (17q11.2) em humanos. Mutações neste gene parecem relacionadas ao neurofibromatose tipo 1 e leucemia mielomonocítica¹¹⁵ e com doenças cardíacas congênicas¹¹⁶.

4.9 Genotipagem e análises adicionais

Optou-se por genotipar toda a população para os 2 SNPs relacionados a essas mutações encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C*. Os genótipos obtidos desses novos SNPs em *FAM5C* foram analisados juntamente com os

2 SNPs rs 1935881 e rs 1342913 anteriormente associados com o fenótipo da periodontite agressiva ($p=0,03$ $p=0,03$). A descrição dos 4 SNPs analisados encontra-se no Quadro 12.

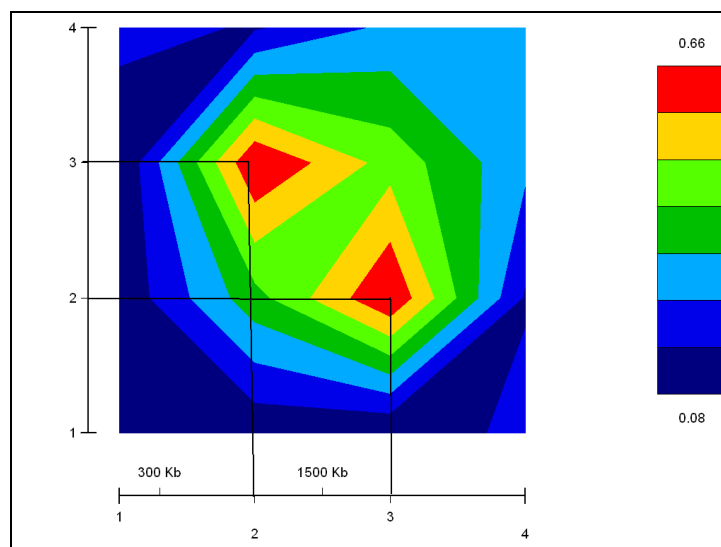
SNP	Posição	Gene	Região	Troca de Bases
rs1342913	188387648	<i>FAM5C</i> *	intron	AG
rs1935881	188333009	<i>FAM5C</i> *	3'	GA
rs57694932	188705935	<i>FAM5C</i> *	intron	AG
rs10494634	188706091	<i>FAM5C</i> *	intron	AT

* *FAM5C*, membro C da família com sequência de similaridade 5. Adaptado de UCSC Genome Bioinformatics⁹⁸.

Quadro 12 - Quatro SNPs que fizeram parte das análises adicionais posição no cromossomo região no gene e troca de bases dos polimorfismos.

Os resultados de desequilíbrio de ligação encontram-se na Figura 12 e Tabela 23 (a seguir) e os resultados de associação e análise dos haplótipos na Tabela 24 (a seguir). Podemos observar que os SNPs rs1935881 e rs57694932 apresentam uma tendência ao desequilíbrio de ligação ($D'=0,655$). Valores de $D' \geq 0,9$ indicam desequilíbrio de ligação. Por outro lado os 2 SNPs relacionados as variantes encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C* (rs57694932 e rs10494634) não estão associados a periodontite agressiva nesta população por apresentarem pvalores maiores que 005 ($p=0,36$ e $p=0,94$), respectivamente (Tabela 24). Ainda na Tabela 24 podemos observar que os haplótipos com p significantes ($p \leq 0,05$) estão sempre relacionados aos alelos dos 2 SNPs (M1 e M2) associados anteriormente a periodontite agressiva nesta população. Quando os SNPs M3 e M4 são incluídos nos haplótipos os valores de p continuam significativos ($p \leq 0,05$) porém menos significativos se comparados ao valor de p de 0,009 do haplótipo M1+M2.

Desta forma uma das mutações encontradas no sequenciamento das regiões intrônicas conservadas de *FAM5C* representada pelo SNP rs57694932, embora não associada a PA, está em fraco desequilíbrio de ligação com o SNP rs1935881 associado a PA. Tendo em vista os resultados apresentados, podemos sugerir que o gene *FAM5C* é um gene candidato a periodontite agressiva por possuir marcadores associados a periodontite agressiva nesta população.



*A escala de cores indica os valores de D' sendo 0,66 (cor vermelha) indicativo de desequilíbrio de ligação incompleto e a cor azul escura (0,08) indicativa de ausência de desequilíbrio de ligação entre os marcadores. Os números de 1 a 4 representam os marcadores (SNPs) em ordem crescente de posição física no cromossomo.

Figura 12 - Gráfico de desequilíbrio de ligação.

Tabela 23 - Resultados da análise de desequilíbrio de ligação.

SNP	rs1935881	rs13422913	rs57694932	rs10494634
rs1935881	-	0.001	0.004	0.029
rs1342913	0.096	-	0.183	0.019
rs57694932	0.075	0.655	-	0.004
rs10494634	0.191	0.149	0.261	-

*Os valores numéricos acima da linha diagonal representam r^2 e abaixo da linha diagonal representam D' . Os marcadores (SNPs) encontram-se em ordem crescente de posição física no cromossomo. Os valores marcados em cinza escuro representam r^2 (0,183) e D' (0,655) entre os SNPs em desequilíbrio de ligação parcial nesta análise.

Tabela 24 - Resultados dos haplótipos de 2, 3 e 4 janelas dos 4 SNPs que fazem parte das análises adicionais.

Análise dos Haplótipos - Região 1q31.1					
FAM5C	rs1935881	rs1342913	rs57694932	rs10494634	
	M1	M2	M3	M4	
FBAT (p valor)	0.03	0.03	0.36	0.94	<i>f</i>
2 janelas	0.009				0.326
	0.03				0.647
	0.07				0.009
3 janelas	0.02				0.109
	0.05				0.107
4 janelas	0.08				0.110

f representa a frequência dos haplótipos; M1 a M4 indica a ordem crescente dos SNPs de acordo com a posição física no cromossomo; as caixas de cor verde indicam $p \leq 0,05$

5 DISCUSSÃO

A PA é um tipo de doença periodontal pouco frequente apresentando características clínicas como rápida perda de inserção clínica e grande destruição óssea com início precoce. Embora fatores microbiológicos ambientais comportamentais e doenças sistêmicas são sugeridos na literatura como fatores de risco para a periodontite agressiva o perfil genético individual é um fator relevante na resposta sistêmica do hospedeiro a doença^{18,117}. Até o momento um grande número de variantes polimórficas tem sido associadas com a PA, mas nenhuma variante específica foi identificada como responsável pelo aumento da susceptibilidade individual a doença¹². Estudos de associação e de ligação são as ferramentas mais utilizadas na pesquisa genética de doenças multifatoriais como a periodontite na pesquisa por regiões cromossômicas específicas que contenham genes que contribuam para a doença. Um estudo de ligação sugeriu que o fenótipo da PA localizada está ligado ao marcador D1S492 (LOD=3,48 e frequência de recombinação $\theta=0$) e localizado no cromossomo 1q31.1 (187,726,800-187,927,057 pares de base)⁷. A análise dos haplótipos deste intervalo indicou um locus de susceptibilidade para a PA localizada no cromossomo 1 (1q24.2-1q31.3) com intervalo de aproximadamente 26 milhões de pares de base e 160 genes. Este resultado positivo de ligação sugere que o fenótipo da periodontite agressiva localizada é influenciado por uma ou muitas mutações em um gene localizado neste intervalo. Tendo como base este intervalo cromossômico ligado a periodontite agressiva localizada foi possível identificar SNPs nesta região em bancos de dados genômicos. O objetivo deste estudo foi aperfeiçoar o mapeamento genético desta região cromossômica em famílias clinicamente bem caracterizadas segregando a PA. Neste estudo nós descrevemos análises genéticas com o objetivo de identificar variantes relacionadas ao aumento da susceptibilidade a PA.

O resultado da nossa análise de segregação indicou um modelo atípico (semigeral) não mendeliano que sugere transmissão excessiva por pais heterozigotos. O modelo de “não transmissão” que indicaria ausência de contribuição genética a PA foi rejeitado assim como os modelos de transmissão homogêneo e heterogêneo condizentes com a presença de um gene principal com possíveis efeitos poligênicos adicionais. O modelo de transmissão semigeral sugere que os alelos de risco para a PA são excessivamente transmitidos pelos pais heterozigotos sustentando a hipótese que variantes genéticas exercem um papel importante na patogênese da PA e que poucos loci com efeitos

pequenos a moderados contribuem para a doença independente da interação com fatores ambientais. Isso condiz com o fato da periodontite ser uma doença complexa multifatorial com provável interação entre vários genes e/ou fatores ambientais na susceptibilidade individual a doença. Análises de segregação anteriores^{9,46,52} sugerem modelos mendelianos de herança ou seja defendem a idéia de um gene principal atuando na etiologia da periodontite agressiva; contudo, essa suposta variante principal responsável pelo aumento da susceptibilidade a PA ainda não foi encontrada em nenhuma população¹⁸.

A busca pela origem genética de qualquer condição através de técnicas de mapeamento genético começa com a definição do fenótipo. A classificação inapropriada dos indivíduos afetados pode enfraquecer a habilidade de se detectar loci relevantes¹¹⁸⁻¹¹⁹. Sendo assim a população participante deste estudo foi bem caracterizada clínica e radiograficamente seguindo a classificação das doenças periodontais preconizada em 1999 pela AAP¹⁶. Outra iniciativa importante durante o planejamento de um estudo científico é determinar o tamanho amostral ideal para que o efeito esperado seja detectado. Em estudos genéticos este procedimento é fundamental visto os altos custos envolvidos na genotipagem dos indivíduos e ainda porque os resultados podem ser interpretados de forma errônea caso o tamanho da amostra utilizada não seja suficiente para se detectar alguma associação¹²⁰.

Os estudos de associação são uma importante ferramenta para a identificação de variantes genéticas que predisõem a doenças complexas¹²¹ e podem ser realizados testando famílias de indivíduos afetados ou testando indivíduos não relacionados entre si (casos e controles). O objetivo é verificar se um determinado alelo do gene candidato está associado a doença e permitir a identificação de genes que possam estar contribuindo para o fenótipo. Uma importante vantagem dos estudos de associação é a possibilidade de identificação de genes refratários a estudos de ligação devido a heterogeneidade genética e/ou penetrância reduzida.

Os estudos caso-controle são os mais frequentemente utilizados por permitirem o recrutamento de um maior número de indivíduos afetados isoladamente sem a necessidade de incluir seus familiares (afetados ou não) na amostra. A principal desvantagem é que os resultados podem ser influenciados pela estratificação da população por serem baseados na diferenciação da frequência alélica entre casos e controles e portanto sujeitos as questões de heterogeneidade populacional¹²². Spielman, Vandesteen e Page¹²³ sugeriram a utilização de famílias para a análise de associação com o objetivo de evitar resultados falso positivo dos estudos caso-controle quando o grupo controle não está

apropriadamente pareado aos casos. A frequência de quais alelos são transmitidos e não transmitidos aos filhos afetados é comparada com a expectativa de uma herança Mendeliana de 50%. A população brasileira pode ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo devido a ocorrência de cruzamentos étnicos entre pessoas de diferentes origens tais como colonizadores europeus, escravos africanos e índios americanos¹²⁴, fato que torna a seleção de um grupo controle adequado extremamente difícil. A utilização de estrutura familiar elimina esse viés de seleção.

Muitas doenças apresentam modos de herança complexos devido a diversos graus de exposição a fatores ambientais e/ou devido a diferenças na susceptibilidade a vários genes. Geralmente não é possível distinguir se esses dois fatores atuam de forma independente ou combinados¹²⁵. As tentativas para localização de genes envolvidos em doenças complexas com um modo de herança multifatorial complexo (poligênico) tem utilizado ambos os testes de ligação e associação. Quando existe um locus principal contribuindo para o aumento da susceptibilidade a doença o modelo paramétrico de análise de ligação utilizando famílias, tríades ou pares de irmãos afetados parece bem eficaz. Entretanto se existem vários genes com efeito pequeno a moderado envolvidos com a doença o tamanho amostral necessário para este tipo de estudo torna-se demasiadamente elevado. Isto acontece porque existe uma redução do compartilhamento excessivo de alelos em genes com efeito pequeno a moderado. Métodos não paramétricos de análise de ligação tem sido desenvolvidos para adequar-se as doenças complexas. As invés de buscar a transmissão de um gene hipoteticamente causador da doença o método não paramétrico examina quais regiões do genoma de parentes afetados são idênticas por descendência¹²⁶.

A busca por associação alélica é uma alternativa quando estuda-se doenças complexas. O objetivo é verificar se indivíduos afetados compartilham o mesmo alelo de um determinado marcador independentemente ou seja analisa o compartilhamento excessivo de alelos específicos em indivíduos derivados de uma população específica e afetados pela doença¹²⁵. Nosso estudo encontrou evidência estatística de associação entre os SNPs rs1935881 e rs1342913 situados no gene *FAM5C* e a PA nesta população composta por famílias brasileiras. Como este estudo de associação foi feito em famílias os resultados positivos de associação são robustos tanto com relação ao viés resultante de estratificação da população quanto por mistura de etnias¹²⁷. Nenhum resultado positivo de ligação foi encontrado entre a PA e os marcadores genotipados nesta população ou seja nenhum marcador foi compartilhado por todos os indivíduos afetados e não compartilhado por indivíduos saudáveis. A escolha pelo método não paramétrico na análise de ligação está

relacionada com o resultado obtido na análise de segregação que indicou modo de herança poligênico da PA nesta população compatível com o fato da doença ser reconhecida na literatura como multifatorial complexa¹⁸. Segundo Risch e Merikangas¹²⁸ quando existe a hipótese de vários genes de efeito pequeno a moderado atuando na etiologia de uma doença complexa o tamanho amostral necessário para resultados positivos de ligação torna-se inviável. Sendo assim podemos especular que talvez o poder estatístico do nosso estudo não seja suficiente para a análise de ligação. Nestes casos a busca por associação torna-se mais apropriada. Embora existam poucos dados publicados sobre a associação de polimorfismos genéticos no gene *FAM5C* com doenças em humanos a associação parece biologicamente plausível.

O gene *FAM5C* (Identificação do gene 339479)¹¹⁵ está localizado no cromossomo 1q31.1 é composto por 8 éxons e codifica uma proteína homônima composta por 766 aminoácidos. *FAM5C* foi originalmente identificada no cérebro de ratos como uma proteína influenciada pela proteína óssea morfogenética e pelo ácido retinóico¹²⁹. *FAM5C* está localizada na mitocôndria e a super expressão desta molécula leva ao aumento da migração e invasão de células pituitárias não-tumorogênicas¹³⁰. A mitocôndria tem a capacidade de ativar diversos mecanismos moduladores de proliferação celular além de promover a apoptose¹³¹. *FAM5C* também está relacionada com um fenótipo relevante de alterações celulares no músculo liso associado com a formação e vulnerabilidade de placas ateroscleróticas¹³²⁻¹³³. Existem alelos de *FAM5C* associados com a susceptibilidade aumentada a enfarto do miocárdio¹³⁴. Os resultados obtidos na priorização dos genes candidatos a periodontite com o auxílio do programa ENDEAVOUR¹⁰⁹ destacou o gene *FAM5C* como um dos principais genes candidatos a periodontite na região de interesse. O ENDEAVOUR¹⁰⁹ baseia-se na similaridade entre os genes candidatos ou genes contidos na região de interesse e os modelos contruídos a partir de uma lista de genes envolvidos no mecanismo biológico de interesse¹³⁵. Além da validação feita por Aerst, Lambrechts, Maity, VanLoo, Coessens, Desmet et al.¹³⁶, outras publicações confirmaram a eficiência do ENDEAVOUR¹⁰⁹ na identificação de novos genes candidatos¹³⁷⁻¹³⁸. O resultado do ENDEAVOUR¹⁰⁹ nos motivou a realizar outros experimentos de bioinformática buscando relacionar o gene candidato *FAM5C* e a periodontite agressiva, assim como a realização do sequenciamento de *FAM5C* nos indivíduos homozigotos para o haplótipo associado a PA, esperando q esses indivíduos pudessem “carregar” a mutação de risco para a doença .

Há mais de 20 anos tornou-se óbvio que a regulação dos genes a nível de transcrição é um dos pontos cruciais no entendimento de como a informação

geneticamente estocada é processada para determinar os mecanismos biológicos observados nas doenças. Vários métodos de identificação dos sítios de ligação dos genes e seus fatores de transcrição tem sido desenvolvidos. O TRANSFAC 7.0¹¹⁰ é uma base de dados que coleta e provê informação sobre os sítios de ligação dos genes e seus fatores de transcrição visando gerar um mapa regulatório para todo o genoma¹³⁹. Os fatores de transcrição desempenham uma função importante na regulação e expressão gênica além de fornecer informação estrutural sobre os genes¹⁴⁰. O TRANSFAC 7.0¹¹⁰ foi utilizado para observar alterações de possíveis fatores de transcrição nos sítios de ligação dos dois marcadores associados com a PA (rs1935881 e rs1342913) neste estudo quando ocorre a mudança de bases do alelo comum para o alelo raro. Este tipo de experimento de bioinformática foi realizado com o objetivo de esclarecer possíveis funções destas variantes na etiologia da PA.

A sequência do marcador rs1935881 com o alelo comum (A) parecer abrigar uma sequência secundária que serve como sítio de ligação para dois fatores de transcrição: *C/EBPalp* e *Oct-1*. A sequência com o alelo raro (G) destrói ambos os sítios de ligação. Visto que o alelo comum (A) é o mais transmitido nesta população, ambos os fatores de transcrição parecem desempenhar funções regulatórias importantes no gene *FAM5C* que podem ajudar na compreensão dos mecanismos biológicos relacionados a resposta do hospedeiro a periodontite agressiva. *C/EBPalp* é um gene localizado no cromossomo 19 (19q13.1) em humanos e codifica uma proteína com o mesmo nome. Esta proteína interage com as proteínas quinase *CDK2* e *CDK4* inibindo o desenvolvimento e função delas. *CDK2* codifica inibidores dos genes *CDK4* e *CDK6* que são responsáveis pela proliferação celular e supressão de células tumorais¹¹⁵. O gene *Oct-1* cujo nome oficial é *POU2F1* é um gene localizado no cromossomo 1 (1q22-1q23) em humanos. Kang, Gemberling, Nakamura, Whithy, Honda, Fairbrother et al.¹⁴¹ demonstrou que a proteína codificada por *Oct-1* é fosforilada *in vivo* em resposta ao estresse oxidativo e genotoxicidade. Com relação ao marcador rs1342913 a sequência com o alelo raro (alelo G), considerado o alelo ancestral na base de dados da UCSC⁹⁸, e o mais transmitido nesta população, parece criar um sítio de ligação para *Sp1*. *Sp1* é um gene localizado no cromossomo 12 (12q13.1) em humanos e codifica uma proteína relacionada a diversos tipos de carcinomas¹¹⁵. *CRE-BP1 (ATF2)* é um gene localizado no cromossomo 2 (2q32) em humanos e também codifica uma proteína relacionada a carcinomas¹¹⁵.

Após o sequenciamento de regiões codificantes (exons) e não-codificantes (íntrons) do gene *FAM5C* foram encontradas duas mutações: rs57694932 (A>G) e

rs10494634 (A>T) ambas localizadas em íntron e, portanto, não responsáveis por alterações estruturais dos produtos genéticos. Entretanto essas mutações podem ter efeitos regulatórios na expressão do gene *FAM5C*. Podemos observar fatores de transcrição diferentes nas predições de afinidade com os sítios de ligação de ambos os SNPs quando ocorre a troca do alelo comum pelo alelo raro na sequência de nucleotídeos. No caso do SNP rs57694932 (A>G) quando o alelo raro G substitui o alelo comum A surge o fator de transcrição *ISGF-3* no sítio de ligação. *ISGF-3* é um gene localizado no cromossomo 2 (2q32.2) em humanos e codifica uma proteína membro da família de proteínas *STAT* que em resposta a várias citocinas e fatores de crescimento sofrem fosforilação e translocação dentro no núcleo local onde atua como fator de transcrição. Esta proteína pode ser ativada por vários ligantes incluindo INF- α , INF- δ , PDGF e a IL-6. Esta proteína também participa da expressão de vários genes um ponto importante para a viabilidade celular em resposta a vários estímulos celulares e patogênicos¹¹⁵. Em relação ao SNP rs10494634 (A>T) quando o alelo raro T substitui o alelo comum A na sequência de nucleotídeos podemos observar um fator de transcrição adicional: *NF-1* localizado no cromossomo 17 (17q11.2) em humanos. Mutações nesse gene estão relacionadas com a neurofibromatose do tipo 1 e com a leucemia mielomonocítica¹¹⁵ além de doenças cardíacas congênitas¹¹⁶. Apesar dessas duas mutações encontradas no sequenciamento do gene *FAM5C* não estarem associadas com a periodontite agressiva, existe um fraco a moderado desequilíbrio de ligação entre a variante rs57694932 e o SNP rs1342913 previamente associado com a periodontite agressiva neste estudo. Podemos sugerir que o gene *FAM5C* contribui para a etiologia da periodontite agressiva baseado no fato de que existe associação entre marcadores genéticos no gene e a periodontite agressiva nesta população e que os prováveis fatores de transcrição presentes nos sítios de ligação destes marcadores genéticos tem mecanismos biológicos muito próximos ao observado na resposta imuno-inflamatória do hospedeiro a periodontite.

Este estudo em famílias encontrou associação entre os SNPs rs1935881 (G>A) e rs1342913 (A>G) localizados no gene *FAM5C* e a PA. Esta associação positiva pode ser devido tanto aos efeitos diretos dos SNPs quanto os SNPs podem estar associação com uma variante desconhecida na mesma região que leva a doença. Além disso, as sequências de nucleotídeos desses dois SNPs próximo as variantes polimórficas apresentam-se bem conservadas na análise comparativa entre diferentes espécies de seres vivos. Sendo assim, podemos especular, que se o SNP está em uma sequência relativamente bem conservada, uma variação poderia alterar alguma função do gene ainda não identificada¹⁴² Estudos

funcionais são necessários para revelar o mecanismo subjacente as associações observadas neste estudo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que:

- a) o modo de herança mais adequado para cada teste de susceptibilidade dos alelos foi o modelo semigeral principalmente quando considerou-se 3 fatores de susceptibilidade com efeitos decrescentes ($p=0,31$). Este modelo de transmissão sugere que existe um excesso na transmissão dos alelos de risco para a PA pelos pais heterozigotos fornecendo suporte para a hipótese que variantes genéticas exercem um papel importante na patogênese da PA e que poucos loci com efeitos relativamente pequenos contribuem para a doença independente da interação com fatores ambientais;
- b) os SNPs analisados não encontram-se em ligação ou seja não existe evidência estatística de que os alelos causadores de doença estejam fisicamente próximos dos marcadores genéticos utilizados nesse estudo dentro da região cromossômica avaliada na população;
- c) foi encontrada associação entre os seguintes SNPs e a PA: rs1342913 ($p=0,03$) localizado na região 1q31.1 no íntron 6 e 7 do gene *FAM5C* e rs1935881 ($p=0,03$) localizado na região 1q31.1 na terminação 3' do gene *FAM5C*. Ambos os SNPs associados com a periodontite agressiva nesta população (rs1935881 rs1342913) não estão em desequilíbrio de ligação entre si sugerindo que eles contem informação genética independente. Ainda os haplótipos com valor de p significantes ($p \leq 0,05$) estão sempre relacionados com os alelos desses dois SNPs;
- d) foram encontradas duas mutações em duas regiões intrônicas conservadas em *FAM5C* nos indivíduos que possuem o haplótipo associado com a PA nesta população. Cada uma dessas variantes está relacionada a um SNP: rs57694932 (A>G) e rs10494634 (A>T) ambos localizados na região 1q31.1. Esses dois SNPs não estão associados a PA nesta população, mas os SNPs rs1935881 e rs57694932 apresentam um fraco a moderado desequilíbrio de ligação ($D'=0,655$);
- e) podemos sugerir que o gene *FAM5C* contribui para a etiologia da PA baseado no fato de que existe associação entre marcadores genéticos no gene e a doença nesta população.

REFERÊNCIAS

1. Borrell LN, Papapanou PN Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6): 132-58.
2. Kinane DF, Hart TC Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev in Oral Bio and Med* 2003; 14: 430-49.
3. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D`Aiuto F et al. Funtional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 84 (Suppl 12): 1149-53.
4. Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid moderate and no loss of attachment in Sri Lanka laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13:431-45.
5. Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;62: 293-9.
6. Corey LA, Nance WE, Hofstede P. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol* 1993; 64: 1205.
7. Li Y, Xu L, Hasturk H, Kantarci A, DePalma SR, Van Dyke TE. Localized aggressive periodontitis is linked to human chromosome 1q25. *Hum Genet* 2004; 114: 291-297.
8. Beaty TH, Boughman JA, Yang P. Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Hum Genet* 1987; 40: 443.
9. Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65: 623-30.
10. Kornman KS, Crane A, Wang HY The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 72.
11. Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 887-92.

12. 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.
13. Tonetti MS, Mombelli A. Early-Onset periodontitis. *Ann Periodontology* 1999; 4: 39-53.
14. Albandar JM, Brown LJ, Genco RJ, Loe H Clinical classification of periodontitis in adolescents and young adults. *J Clin Periodontol.* 1997; 68: 545-55.
15. Herrmann JM, Kantarci A, Long H, Bernardo J, Hasturk H, Wray Jr LV et al. Simultaneous measurements of cytoplasmatic CA²⁺ responses and intracellular pH in neutrophils of localized aggressive periodontitis (LAP) patients. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 612-9.
16. Armitage GC Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
17. Brown LJ, Albandar JM, Brunelle JA, Loe H. Early-onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years. *J Periodontol* 1996; 67 (Suppl 10): 968-75.
18. Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2007; 43: 133-59.
19. Saxen L. Prevalence of juvenile periodontitis in Finland. *J Clin Periodontol* 1980; 7 (Suppl 3): 177-86.
20. Neely AL Prevalence of juvenile periodontitis in a circumpubertal population. *J Clin Periodontol* 1992; 19 (Suppl 6): 367-72.
21. Albandar JM, Muranga MB, Rams TE Prevalence of aggressive periodontitis in school attendees in Uganda. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (Suppl 9): 823-31.
22. Tinoco EM, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NM et al. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *Eur J Oral Sci* 1997; 105 (Suppl 1): 9-14.
23. Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AO. Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraiba. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16 (Suppl 2): 163-8.

24. Schenkein HA, Van Dyke TE Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol 2000* 1994; 6: 7-25.
25. Novak MJ, Novak KF Early-onset periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3: 45-58.
26. Tinoco EM, Sivakumar M, Preus HR The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 99-105.
27. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* 2002; 29: 153-76.
28. Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahlen G, Kilian M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (Suppl 6): 1576-8.
29. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 2001; 80 (Suppl 6): 1580-3.
30. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ Association of interleukin-1 gene polymorphism with early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 682-9.
31. Gonzales JR, Mann M, Stelzig J, Bodeker RH, Meyle J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34 (Suppl 6): 473-9.
32. Nibali L, Griffiths GS, Donos N, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti MS et al. Association between interleukin-6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008 35 (Suppl 3): 193-8.
33. Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang H, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *J Periodontal Res* 2009; 44 (Suppl 3): 418-24.

34. Nibali L, Donos N, Brett PM, Parkar M, Ellinas T, Llorente M et al. A familial analysis of aggressive periodontitis – clinical and genetic findings. *J Periodontal Res* 2008 43 (Suppl 6): 627-34.
35. Ren XY, Xu L, Meng HX, Zhao HS, Lu RF, Chen ZB et al. Family-based association analysis of S100A8 genetic polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2009; 44: 184-92.
36. Covani U, Marconcini S, Giacomelli L, Sivozhelevov V, Barone A, Nicolini C. Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79 (Suppl 10): 1974-83.
37. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF In: Thompson & Thompson *Genética Médica*. Elsevier Editora 2007; 7 Ed.
38. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304.
39. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genetics* 2000; 58: 250-64.
40. Kwok P, Deng Q, Zakeri H, Taylor SL, Nickerson DA Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 1996; 31: 123-36.
41. Nickerson DA, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengard JH et al. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res* 2000; 10: 1531-45.
42. Hart TC, Marazita ML, Wright JT. The impact of molecular genetics on oral health paradigms. *Critical Rev in Oral Bio and Med* 2000; 11: 26-56.
43. Van der Velden U, Abbas F, Armand S, de Graaff J, Timmerman MF, Van der Weijden GA et al. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 683-90.
44. Monaghan F, Corcos A. On the origins of the Mendelian laws. *J Hered* 1984;75: 67-9.
45. Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol* 1992; 19 (Suppl 4): 233-9.

46. Saxen L, Nevanlinna HR Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genet* 1984; 25: 332-5.
47. Long JC, Nance WE, Waring P. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genetic Epidemiol* 1987; 4: 13.
48. Boughman JA, Beaty TH, Yang P, Goodman SB, Wooten RK, Suzuki JB. Problems of genetic model testing in early onset periodontitis. *J Periodontol* 1988; 59 (Suppl 5): 332-7.
49. Melnick M, Shields ED, Bixler D Periodontosis: a phenotypic and genetic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 32-41.
50. Page RC, Vandesteen GE, Ebersole JL, Williams BL, Dixon IL, Altman LC Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1985; 56 (Suppl 10): 602-10.
51. Spektor MD, Vandesteen GE, Page RC Clinical studies of one family manifesting rapidly progressive juvenile and prepubertal periodontitis. *J Periodontol* 1985; 56 (Suppl 2): 93-101.
52. Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Diehl SR. Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1992; 63 (Suppl 3): 169-73.
53. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002; 298: 2345-9.
54. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 391-7.
55. Zhao H. Family-based association studies. *Stat Meth Med Res* 2000; 9: 563-87.
56. Boughman JA, Halloran SL, Roulston D. An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986; 6: 341.
57. Hart TC, Marazita ML, McCanna KM, Schenkein HA, Diehl SR. Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. *Hum Genet* 1993; 91: 416-22.

58. Hodge SE Linkage analysis versus association analysis: distinguishing between two models that explain disease-marker associations. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 367-84.
59. Cantor RM, Rotter JI Analysis of genetic data: methods and interpretation. In: King RA, Rotter, JI, Motulsky AG. *The genetic basis of common diseases*. Nova York: Oxford University Press; 1992
60. Hodge SE What associations analysis can and cannot tell us about the genetics of complex disease. *Am J Med Genet* 1994;54: 318-23.
61. Cantor CR, Nelson MR. Haplotyping in biomedicine-practical challenges. *Nat Biotechnol* 2005; 23 (Suppl 1): 21-2.
62. Takashiba S, Naruishi K Gene polymorphism in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 2006; 40: 94-106.
63. Mwantembe O, Gaillard MC, Barkhuizen M, Pillay V, Berry SD, Dewar JB et al. Ethnic differences in allelic associations of the interleukin-1 gene cluster in South African patients with inflammatory bowel disease (IBD) and in control individuals. *Immunogenetics* 2001; 52 (Suppl 3-4): 249-54.
64. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1—receptor antagonist but not with polymorphisms in the interleukin-1 beta gene. *J Bone Miner Res* 2000; 15 (Suppl 3): 402-14.
65. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer *Nature* 2000; 404 (Suppl 6776): 398-402.
66. Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphism with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999; 70: 418-30.
67. Quappe L, Jara L, Lopez NJ Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75 (Suppl 11): 1509-15.
68. Gonzales JR, Michel J, Rodruíguez EL, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Comparison of the interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. *Eur J Oral Sci* 2003; 111 (Suppl 5): 395-9.

69. Li QY, Zhao HS, Meng HX, Zhang L, Xu L, Chen ZB et al. Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *J Periodontol* 2004; 75: 1627-35.
70. Scapoli C, Trombelli L, Mamolini E, Collins A Linkage disequilibrium analysis of case-control data: an application to generalized aggressive periodontitis. *Genes Immun* 2005; 6 (Suppl 1): 44-52.
71. Fiebig A, Jepsen S, Loos BG, Scholz C, Schafer C, Ruhling A et al. Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics* 2008; 92 (Suppl 5): 309-15.
72. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrmann JM, Meyle J Interleukin-4 polymorphism in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 483-8.
73. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB, Jr Junior MT, Grisi MF, Michel J et al. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent* 2004; 32: 241-6.
74. Packard RR, Libby P Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54 (Suppl 1): 24-38.
75. Park JY, Pillinger MH Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull NYC Hosp Jt Dis* 2007; 65 (Suppl 1): S4-S10.
76. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102 (Suppl 7): 1369-76.
77. Smith AJ, D'Aiuto F, Palmieri J, Cooper JA, Samuel J, Thompson S et al Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism. *Clin Chem* 2008; 54 (Suppl 5): 841-50.
78. Nibali L, D'Aiuto F, Donos N, Griffiths GS, Parkar M, Tonetti MS et al. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. *Cytokine* 2009; 45 (Suppl 1): 50-4.
79. Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL et al. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 2005; 191 (Suppl 6): 969-76.

80. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodont Res* 1999; 34: 379-86.
81. 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 Periodont Res* 2001; 36: 183-6.
82. 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: 1554-9.
83. Havemose-Poulsen A, Sorensen LK, Stoltze K, Bendtzen K, Holmstrup P. Cytokine profiles in peripheral blood and whole blood cell cultures associated with aggressive periodontitis juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *J Periodontol* 2005; 76 (Suppl 12): 2276-85.
84. Schulz S, Machulla HK, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Glaser C et al. Genetic markers of tumour necrosis factor alpha in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl 6): 493-500.
85. Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70 Suppl 9: 1032-8.
86. Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara M, Ueda M et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with periodontal diseases in Japanese and chinese. *Nucleic Acids Res (Suppl)* 2001; 111-2.
87. Sun JL, Meng HX, Cao C F, Tachi Y, Shinohara M, Ueda M et al. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodont Res* 2002;37: 263-7.
88. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. *Tissue Antigens* 1999; 54 (Supp 2): 205-7.
89. Fu Y, Korostoff JM, Fine DH, Wilson ME. Fc gamma receptor genes as risk markers for localized aggressive periodontitis in African-Americans. *J Periodontol* 2002; 73 (Suppl 5): 517-23.

90. Zhang Y, Syed R, Uygur C, Pallos D, Gorry MC, Firatli E et al. Evaluation of human leukocyte N-formylpeptide receptor (FPR1) SNPs in aggressive periodontitis patients. *Genes Immun* 2003; 4 (Suppl 1): 22-9.
91. Maney P, Emecen P, Mills JS, Walters JD Neutrophil formylpeptide receptor single nucleotide polymorphism 348T>C in aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80: 492-8.
92. Ploughman LM, Boehnke M Estimating the power of a proposed linkage study for a complex genetic trait. *Am J Hum Genet* 1989; 44 (Suppl 4): 543-51.
93. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung C, Flemmig T et al. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4 (Suppl 1): 38.
94. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S et al. Consensus report: Aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4 (Suppl 1): 53.
95. Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *J Periodontol* 2005; 76 (Suppl 3): 468-75.
96. Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Heredity* 1971; 21: 523-42.
97. International HapMap Project [homepage na internet]. USA; c2007. [atualizada em 2007 Fev 20; acesso em 2008 Ago 20]. <http://www.hapmap.org/>
98. UCSC Genome Bioinformatics [homepage na internet]. Santa Cruz, CA, [2005]. [atualizada em 2009 Ago 10; acesso em 2008 Ago 20]. <http://genome.ucsc.edu/>
99. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21 (Suppl 2): 263-5.
100. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 (Suppl 4732): 1350-4.
101. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001;11 (Suppl 7): 1262-8.

102. Abecasis GR, Cookson WO. GOLD- graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics* 2000; 16 (Suppl 2) : 182-3.

103. Abecasis GR, Cherney SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002; 30: 97-101.

104. Wigginton JE, Abecasis GR. PEDSTATS: descriptive statistics graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 2005; 21: 3345-447.

105. Rutgers Map Interpolator [homepage na internet]. USA: Rutgers University; c2007, [acesso em 2009 Jun 15] <http://compgen.rutgers.edu/old/map-interpolator/>

106. Horvath S, Xu X, Laird NM The family based association test method: strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 Suppl: 301-6.

107. Horvath S, Xu X, Lake SL, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics. *Genet Epidemiol* 2004; 26 (Supp 1): 61-9.

108. Purcell S, Cherny SS, Sham PC Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003; 19 (Suppl 1): 149-50.

109. ENDEAVOUR [homepage na internet] Belgium: Katholieke Universiteit Leuven; c2005-2009,[atualizada em 2008; acesso em 2009 Maio 12] <http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/endeavour/tool/endeavourweb.php>

110. Gene-regulation.com TRANSFAC7.0 2005 [homepage na internet] Germany: BIOBASE GmbH; c2000-2009, [acesso em 2009 Maio 12] <http://www.gene-regulation.com/>

111. BLAST. NCBI [homepage na internet] USA: NCBI; [2005]. [atualizada em 2009 Jul 28; acesso em 2009 Jun 10] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

112. E! Ensembl [homepage na internet] USA; [c2009?] [atualizada em 2009 Jul; acesso em 2009 Jun 10] <http://www.ensembl.org/index.html>

113. Primer3 v0.40. [homepage na internet] USA; [2009?] [atualizada em 2009 Jul; acesso em 2009 Jun 10] <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

114. Kong A, Cox NJ. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* 1997; 61 Suppl 5: 1179-88.

115. NCBI [homepage na internet] USA: NCBI; [2009] [atualizada em 2009 Jun; acesso em 2009 Maio 15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

116. Venturin M, Bentivegna A, Moroni R, Larizza L, Riva P. Evidence by expression analysis of candidate genes for congenital heart defects in the NF1 microdeletion interval. *Ann Hum Genet* 2005; 69 (Suppl 5): 508-16.

117. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005; 39: 91-117.

118. Haines JL, Pericak-Vance MA. Overview of mapping common and genetically complex human disease genes. In: Haines JL, Pericak-Vance MA *Approaches to Gene Mapping in Complex Human Diseases*. New York: Wiley-Liss; 1998:1-16.

119. Rice JP, Saccone NL, Rasmussen E. Definition of the phenotype. In: Rao DC, Povince MA. *Genetic dissection of complex traits*. Ed. San Diego: Academic Press 2001; 69-76.

120. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Amer J of Human Genet* 2007; 81.

121. Li B, Leal SM. Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: application to analysis of sequence data. *Amer J Hum Gen* 2008; 83: 311-21.

122. Risch NJ Searching for genetic determinants in the new millenium. *Nature* 2000; 405 Suppl 6788: 847-56.

123. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-16.

124. Alves-Silva J, da Silva MS, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67 (Suppl 2): 444-61.
125. Jones HB. The relative power of linkage and association studies for the detection of genes involved in hypertension. *Kidney Int* 1998; 53: 1446-8.
126. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;58: 1347-63.
127. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000; 1: S36-S42.
128. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex diseases. *Science* 1996; 273: 1516-7.
129. Kawano H, Nakatani T, Mori T, Ueno S, Fukaya M, Abe A et al Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins BRINP family. *Molecular Brain Res* 2004; 125: 60-75.
130. Shorts-Cary L, Xu M, Ertel J, Kleinschmidt-Demasters BK, Lillehei K, Matsuoka I et al Bone morphogenetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotrope cell pituitary adenomas and induces proliferation migration and invasion. *Endocrinol* 2007; 148 (Suppl 3): 967-75.
131. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. More than just a powerhouse. *Current Biol* 2006; 16: R551-R60.
132. Watkins H, Farrall M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* 2006; 7:163-73.
133. Clarke MCH, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nature Medicine* 2006; 12: 1075-80.
134. Connelly JJ, Shah SH, Doss JF, Gadson S, Nelson S, Crosslin DR et al. Genetic and functional association of FAM5C with myocardial infarction. *BMC Med Genet* 2008; 9: 33-47.
135. Tranchevent LC, Barriot R, Yu S, Van Vooren S, Van Loo P, Coessens B et al. ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 377-84.

136. Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, DeSmet F et al. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol.* 2006; 24: 537-44.
137. Elbers C, Onland-Moret C, Franke L, Niehoff A, Van der Schouw Y, Wijmenga C. A strategy to search for common obesity and type 2 diabetes genes. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 19-26.
138. Osoegawa K, Vessere G, Utami K, Mansilla M, Johnson M, Riley B et al. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridization. *J Med Genet* 2008; 45: 81-6.
139. Wingender E. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Briefings in Bioinformatics* 2008; 9 (Suppl 4): 326-32.
140. Yang H, Keane J, Bergman CM, Nenadic G. Assigning roles to protein mentions: the case of transcription factors. *J Biomed Inform* 2009; Apr 11: PMID, 19364541.
141. Kang J, Gemberling M, Nakamura M, Whithy FG, Handa H, Fairbrother WG et al A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. *Genes Dev* 2009; 23 (Suppl 2): 208-22.
142. Jareborg N, Birney E, Durbin R. Comparative analysis of noncoding regions of 77 orthologous mouse and human gene pairs. *Genome Res* 1999; 9:815-24.
143. de Carvalho FM, Tinoco EMB, Govil M, Marazita ML, Vieira AR. Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes. *J Clin Perio* 2009; 36 (Suppl 6): 468-73.

Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes

Flavia M. de Carvalho¹, Eduardo M. B. Tinoco^{1,2}, Manika Govil^{3,4}, Mary L. Marazita^{3,4,5,6} and Alexandre R. Vieira^{3,4,5,7}

¹Department of Periodontology, Faculty of Odontology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil; ²Postgraduate Program in Dentistry, School of Health Sciences, UNIGRANRIO, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil; ³Department of Oral Biology; ⁴Center for Craniofacial and Dental Genetics, School of Dental Medicine; ⁵Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health; ⁶Department of Psychiatry, School of Medicine; ⁷Pediatric Dentistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

de Carvalho FM, Tinoco EMB, Govil M, Marazita ML, Vieira AR. Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 468–473. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01410.x.

Abstract

Aim: To evaluate the inheritance mode of aggressive periodontitis in a collection of families with a similar geographic origin.

Materials and Methods: Segregation analysis was performed in pedigree data from 74 families by the use of the SEGREG program of SAGE v.5.4.2. Homogeneous no transmission, homogeneous Mendelian transmission, homogeneous general transmission, semi-general transmission and heterogeneous general transmission models were tested assuming the prevalence of aggressive periodontitis as 1% and no deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. The parameters of the model were estimated by the method of maximum likelihood, which provides the overall ln (likelihood), $-2\ln$ and the AIC (Akaike's score) for each model. The likelihood ratio test (LRT) was used to compare each model against a fully general model ($p > 0.05$).

Results: The most parsimonious mode of inheritance was the semi-general transmission model that allows the heterozygote transmission probability to vary.

Conclusion: This result provides strong support for the hypothesis that genetic factors play a role in aggressive periodontitis and that a few loci, each with relatively small effects, contribute to aggressive periodontitis, with or without interaction with environmental factors.

Key words: familial aggregation; genetics; inheritance; periodontitis; segregation analysis

Accepted for publication 13 March 2009

Patients with aggressive periodontitis are characterized by a rapid and severe periodontal destruction around molars and/or incisors, which can become generalized and affect adjacent teeth when not treated. Clinical signs and the onset of the disease can be seen around puberty, but the infection around first molars is thought to happen at an earlier age. Epidemiological surveys have shown that the prevalence of aggressive periodontitis varies among ethnic groups,

regions and countries and may range from 0.1% to 15% (Albandar et al. 1997). A greater prevalence is reported in Africans and African-descendent groups than it is in Caucasians and Hispanics (Loe & Brown 1991). Aggressive periodontitis shows remarkable familial aggregation (Novak & Novak 1996). It seems to be inherited in a Mendelian manner, and both autosomal modes (Long et al. 1987, Marazita et al. 1994) and X-linked transmission (Hart et al. 1992) have been proposed. Although the genetic models may differ, there is a consensus that genetics play an important role in aggressive periodontitis.

To investigate the role of genetic and environmental influences on aggressive

periodontitis, we tested a series of Mendelian segregation models, which were fitted in the presence of residual familial correlation using the SEGREG program, as implemented in SAGE v.5.4.2 (S. A. G. E. 2008). These models assume that a variation in the phenotype among individuals is the result of a major gene effect, and of polygenic and residual variations, which could create familial correlations and random individual variation. Family-based designs provide the opportunity to study variation in the phenotype and provide evidence that justifies future family-based genetic analysis. From these approaches comes the possibility to localize the disease loci through linkage analysis of observed polymorphisms (Elston 1992).

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that there are no conflicts in this study.

This study was supported in part by a grant from the Brazilian government: CAPES.

Materials and Methods

Seventy-four probands with aggressive periodontitis were identified and recruited at the Periodontology Department at the Rio de Janeiro State University, in the city of Rio de Janeiro, and UNIGRANRID in the city of Duque de Caxias, both in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Diagnosis of aggressive periodontitis was based on the 1999 Consensus Classification of Periodontal Diseases (Armitage 1999). In brief, individuals with 10 or more teeth with interproximal sites with at least 4 mm of clinical attachment loss and at least 4 mm pocket depth (two of these teeth must be first molars showing at least 5 mm of clinical attachment loss and at least 4 mm of probing pocket depth) and radiographic evidence of advanced alveolar bone loss were defined as generalized aggressive periodontitis. Localized aggressive periodontitis was the clinical diagnosis if the individuals had fewer than 10 teeth with interproximal sites with the same criteria presented above. Incipient aggressive periodontitis was the definition for individuals that had two or more first molars showing at least 4 mm of clinical attachment loss and at least 3 mm of probing pocket depth and radiographic evidence of alveolar bone loss. All individuals diagnosed with any of the three types of aggressive periodontitis described above were considered as affected in this study. If individuals were edentulous and reported having lost all their teeth at young age (before 35 years), for no obvious reasons such as trauma or extensive cavities, this was recognized as a potential indicator that they started as an aggressive periodontitis case and we also designated them as affected. In addition, the following information was collected by the same examiner from all probands and family members: affection status, gender, age, family relationship and ethnicity, cigarette smoking habits, current medications taken and general health status. In addition, clinical data (pocket probing depth and clinical attachment level) and radiological examinations were collected from all participants. Individuals with co-existing morbidities (e.g. diabetes) or smokers were not defined as affected to minimize the risk of inadvertently including chronic periodontitis in the analysis.

The study sample of 74 families, comprised of 475 individuals (average 6.4 individuals per family), is summar-

Table 1. Numbers of Individuals by phenotype and gender in 74 families with at least a proband affected with aggressive periodontitis

Phenotype and gender	Number of individuals
Affected	
Male	55
Female	97
Unaffected	
Male	162
Female	161
Total	475

Table 2. Distribution of aggressive periodontitis individuals across pedigrees and pedigrees size range

Number of affected/pedigree	Number of pedigrees	Pedigree size (range)
1	26	3–10
2	26	3–10
3	13	4–13
4	7	6–17
5	2	9–15
Total	74	3–17

ized in Tables 1 and 2. The male:female ratio was 0.8, with 217 males and 258 females. Fifty-four of these families have obvious African ascendancy. The study protocol was approved by both the Ethical Committee of the Rio de Janeiro State University and University of Pittsburgh, and informed consent was obtained from all individuals prior any research activity.

To evaluate the inheritance mode of the aggressive periodontitis phenotype, segregation analysis was performed in the 74 families recruited. Pedigrees of the affected individuals were constructed and all the relatives enrolled. We used the SEGREG program of SAGE v.5.4.2 (S. A. G. E. 2008). Mendelian inheritance was assumed to be through an autosomal locus with two alleles A and B, where the A allele was associated with the relevant phenotype. The likelihood for family data (Elston & Stewart 1971) was calculated as a function of the genotype-specific baseline susceptibility parameters (β_{AA} , β_{AB} , β_{BB}), the population allele frequency (q) assuming Hardy–Weinberg equilibrium, and the probability that a parent with each genotype will transmit the allele A (τ_{AA} , τ_{AB} , τ_{BB}). We tested homogeneous no transmission, homogeneous Mendelian transmission, homogeneous general transmission, semi-general transmission and heterogeneous general transmission (S. A. G. E. 2008)

assuming the prevalence of aggressive periodontitis in this population as 1% (Tinoco et al. 1997, Susin & Albandar 2005) and no deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. Each inheritance mode was tested under the following susceptibility types: two susceptibility loci/factors, two susceptibility loci/factors with dominant or with recessive effects, three susceptibility loci/factors, and three susceptibility loci/factors with decreasing or with increasing effects. The parameters of the model were estimated by the method of maximum likelihood, and provides the overall ln (likelihood), $-2\ln$, and the AIC (Akaike's score) for each model. We used the likelihood ratio test (LRT) to compare each model against a fully general model. Unlike the procedure for usually interpreting p -values, we need to look at p -values that are >0.05 (assuming an α of 0.05). The general model acts as the 'alternative' hypothesis. In each case, the general model has the most parameters being estimated, whereas the more restrictive model is the nested 'null'. So, for each test, we either 'reject' the more restrictive model in favor of the general model, if the p -value is <0.05 ; or, we 'cannot reject' the more restrictive model (p -value ≥ 0.05). For any given model, the AIC is $-2\ln+2k$, where k is the number of parameters estimated. The model with the lowest AIC was considered to be the most parsimonious among equally likely models.

Results

The segregation analysis results are summarized in Table 3. Compared with the general model, the 'no transmission model', which indicates no genetics contributions to aggressive periodontitis, was rejected by our segregation analysis ($p = 0.02$ or lower for all tests). The models that incorporated homogeneous or heterogeneous transmissions (the presence of a major gene effect with possible additional polygenic effects) also failed to provide an adequate fit to the data, and these Mendelian models were rejected when compared with the general transmission model ($p = 0.02$ or lower for all tests). The most parsimonious mode of inheritance in each susceptibility type tested was the semi-general transmission mode (τ_{AB} free), particularly in the three susceptibility loci/factors with decreasing effects ($p = 0.31$). This best fit model

Table 3. Parameter estimates and models-fitting from segregation analysis of aggressive periodontitis families

Parameters	Models				
	Homogeneous no transmission With two-susceptibilities	Homogeneous Mendelian With two-susceptibilities	Homogeneous general With two-susceptibilities	Semigeneral transmission With two-susceptibilities	Heterogeneous general With two-susceptibilities
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	–	1	1	1	1
$\tau(AB)$	–	0.5	0.5	1	0.5
$\tau(BB)$	–	0	1	0	1
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-222.60	-222.60	-231.49	-231.49	-237.40
LN	111.30	111.30	115.74	115.74	118.70
LRC	14.79	14.79	5.90	5.90	–
p -value	0.02	0.01	0.015	0.05	–
No. parameters estimated	3	3	1	2	–
AIC	-216.60	-216.60	-225.49	-225.49	-229.40
	Homogeneous no transmission With two-susceptibilities Dominant	Homogeneous Mendelian With two-susceptibilities Dominant	Homogeneous general With two-susceptibilities Dominant	Semigeneral transmission With two-susceptibilities Dominant	Heterogeneous general With two-susceptibilities Dominant
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	–	1	1	1	1
$\tau(AB)$	–	0.5	0.5	1	0.5
$\tau(BB)$	–	0	1	0	1
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-222.60	-222.60	-231.49	-231.49	-237.40
LN	111.30	111.30	115.74	115.74	118.70
LRC	14.79	14.79	5.90	5.90	–
p -value	0.002	0.001	0.015	0.052	–
No. parameters estimated	3	3	1	2	–
AIC	-216.60	-216.60	-225.49	-225.49	-229.40
	Homogeneous no transmission With two-susceptibilities Recessive	Homogeneous Mendelian With two-susceptibilities Recessive	Homogeneous general With two-susceptibilities Recessive	Semigeneral transmission With two-susceptibilities Recessive	Heterogeneous general With two-susceptibilities Recessive
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	–	1	0.91	1	1
$\tau(AB)$	–	0.5	1	0.92	0.92
$\tau(BB)$	–	0	0.60	0	0
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-75.65	-258.76	-303.70	-332.65	-337.55
LN	37.82	129.38	151.85	166.32	168.77
LRC	261.8	78.78	33.84	4.90	–
p -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.086	–
No. parameters estimated	3	3	1	2	–
AIC	-69.65	-252.76	-293.70	-324.65	-329.55
	Homogeneous no transmission With three-susceptibilities	Homogeneous Mendelian With three-susceptibilities	Homogeneous General With three-susceptibilities	Semigeneral transmission With three-susceptibilities	Heterogeneous general With three-susceptibilities
q	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	–	1	1	1	1
$\tau(AB)$	–	0.5	0.5	1	1
$\tau(BB)$	–	0	0.99	0	0

Table 3. (Contd.)

	Homogeneous no transmission With three-susceptibilities	Homogeneous Mendelian With three-susceptibilities	Homogeneous General With three-susceptibilities	Semigeneral transmission With three-susceptibilities	Heterogeneous general With three-susceptibilities
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-226.49	-237.83	-244.10	-248.98	-254.68
LN	113.24	118.91	122.05	124.49	127.34
LRC	28.19	16.85	10.58	5.70	-
<i>p</i> -value	0.0001	0.0001	0.001	0.058	-
No. parameters estimated	3	3	1	2	-
AIC	-218.49	-229.83	-234.10	-240.98	-246.68
	Homogeneous no transmission With three-susceptibilities Decreasing	Homogeneous Mendelian With three-susceptibilities Decreasing	Homogeneous general With three-susceptibilities Decreasing	Semigeneral transmission With three-susceptibilities Decreasing	Heterogeneous general With three-susceptibilities Decreasing
<i>q</i>	0	0	0	0	0
$\tau(AA)$	-	1	0.20	1	1
$\tau(AB)$	-	0.5	0	0	0
$\tau(BB)$	-	0	0.17	0	0
$\beta(AA)$	0	0	0	0	0
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	1	1	1	1	1
-2LN	-131.20	-252.53	-226.81	-336.49	-338.79
LN	65.60	126.26	113.40	168.24	169.38
LRC	207.5	86.26	111.9	2.303	-
<i>p</i> -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.31	-
No. parameters estimated	3	3	1	2	-
AIC	-123.20	-244.53	-214.81	-328.49	-330.79
	Homogeneous no transmission With three-susceptibilities Increasing	Homogeneous Mendelian With three-susceptibilities Increasing	Homogeneous general With three-susceptibilities Increasing	Semigeneral transmission With three-susceptibilities Increasing	Heterogeneous general With three-susceptibilities Increasing
<i>q</i>	1	1	1	1	1
$\tau(AA)$	-	1	1	1	1
$\tau(AB)$	-	0.5	0.5	1	1
$\tau(BB)$	-	0	0.42	0	0
$\beta(AA)$	1	1	1	1	1
$\beta(AB)$	0	0	0	0	0
$\beta(BB)$	0	0	0	0	0
-2LN	-222.24	-591.32	-242.59	-874.01	-878.88
LN	111.12	295.66	121.29	437.00	439.44
LRC	656.6	287.5	636.2	4.87	-
<i>p</i> -value	0.0001	0.0001	0.0001	0.087	-
No. parameters estimated	3	3	1	2	-
AIC	-214.24	-583.32	-232.59	-866.01	-870.88

The models "homogeneous no transmission", "homogeneous Mendelian", "homogeneous general", and "semigeneral" are always compared to the "heterogeneous general" model (last column). Also, assumptions such as the effect of susceptibility alleles is dominant, recessive, decreases from one allele to the other, or increases from one allele to the other are included. The model with the lowest AIC and with a *p*-value > 0.05 is the best-fitting model for the data. In these results, the semigeneral model was always the best-fitting model.

q, gene frequency; $\tau(AA)$, $\tau(AB)$, $\tau(BB)$, transmission probabilities; $\beta(AA)$, $\beta(AB)$, $\beta(BB)$, baseline parameters for types AA, AB, BB; -2LN, log likelihood; LN, likelihood; LRC, likelihood ratio criterion; AIC, Akaike's score.

allows the heterozygote transmission probability to vary (i.e. suggests an excess of risk alleles being transmitted from heterozygous parents).

Discussion

The current understanding of the pathogenesis of periodontal diseases suggests

that they occur as a result of complex interactions between periodontopathic microorganisms and host factors. The aetiology, although unclear, includes the

sum of environmental and genetic factors, which can result in variations in inflammatory or immunological processes (Diehl et al. 2003). For these reasons, periodontitis is considered as a complex disease whose phenotype is determined by both the genetic trait as well as the environmental influences on the affected individual (Yoshie et al. 2007). These types of complex traits pose special challenges for genetic analysis because of gene-gene and gene-environment interactions, genetic heterogeneity, low penetrance and limited statistical power (Glazier et al. 2002).

Aggressive periodontitis shows strong familial aggregation which suggests the presence of a genetic component (Van der Velden et al. 1993, Tinoco et al. 1998). Previous segregation analyses of families with aggressive periodontitis support a major locus hypothesis and potential inheritance models include autosomal dominant (Boughman et al. 1986, Marazita et al. 1994), autosomal recessive (Long et al. 1987) and X-linked dominant (Hart et al. 1992).

Our results confirm our hypothesis that genetic factors play a role in aggressive periodontitis and we were able to rule out the "no transmission" model in our segregation analysis. The best fit model in our data was the model that allows the heterozygote transmission probability to vary, called the semi-general transmission model (τ_{AB} free). The usual interpretation for this kind of result is that there is evidence of transmission; however, the transmission is not of a straightforward single Mendelian gene. We can also rule out a large number of small gene effects. Therefore, the best explanation is a few major loci contributing to aggressive periodontitis, with or without some interactions with environmental factors.

Our study has obvious limitations. Out of the 475 individuals included in the analysis, 40 were younger than 15 years of age. One can argue that a subset of these children could develop aggressive periodontitis at a later age, and if they were included in the analysis our results could have been different. To address this concern, we have also analysed our data including age of onset at 15 years of age as a variable. The results of this data manipulation did not substantially change the results reported here (data not shown). Another limitation is the possibility that localized and generalized diseases are distinct entities. The difference between localized and

Table 4. Distribution of aggressive periodontitis phenotype among probands and relatives per family

Number of families	Incipient aggressive periodontitis	Localized aggressive periodontitis	Generalized aggressive periodontitis
9	X	X	X
1	X	X	
6		X	X
3	X		X
0	X		
13		X	
42			X
74			

generalized aggressive periodontitis is in the number and type of teeth involved, and the two diseases will progress similarly. Furthermore, around 35% of originally classified localized disease will progress to generalized disease (Brown et al. 1996). Also, among the 74 families studied, 13 families have only cases of localized disease and 42 families have only cases with generalized disease. The remaining 19 families had "mixed" families, with cases of incipient, localized and generalized disease (Table 4). These data can be used to support the hypothesis that generalized and localized disease may be caused by distinct genetic factors but there is obvious overlap as evidenced from the presence of "mixed" families. In addition, these data do not necessarily preclude our assumption that a similar inheritance mode is operating for both localized and generalized diseases. Future approaches should investigate more discreet groups (only localized disease families, only generalized disease families, and "mixed" families) when sample sizes permit. Finally, an inherited difficulty of genetic studies of periodontitis is the disease modification by environmental factors. In some families with relatively older members, one could argue that aggressive periodontitis could be mimicked in individuals who have advanced chronic periodontitis due to extremely poor oral hygiene coupled with other risk factors such as smoking or co-existing morbidities like diabetes. To minimize this risk, individuals with these environmental confounders were not included as affected in the analysis.

The statistical genetic evidence we are presenting here supports a few major loci involvement in aggressive periodontitis and family linkage studies can be used to search for the genes contributing to aggressive periodontitis. Previously, only three family linkage

studies have been performed on families with aggressive periodontitis (Boughman et al. 1986, Hart et al. 1993, Li et al. 2004). The first two studies suggested that a locus responsible for aggressive periodontitis was located on chromosome 4, while the last study reported evidence of linkage on chromosome 1q25. In addition, mutations were described in the *cathepsin C* gene, the gene defective in the allelic syndromes Papillon-Lefèvre and Haim-Munk (Hart et al. 2000a), in aggressive periodontitis families (Hart et al. 2000b, Noack et al. 2004, 2008a,b). The aggressive periodontitis in these particular families is autosomal recessive, and the results of the segregation analysis presented here suggest that families segregating *cathepsin C* mutations (phenocopies of aggressive periodontitis) are probably not frequent among the 74 families studied.

In summary, our segregation analysis supports a semi-general transmission model (τ_{AB} free) for aggressive periodontitis. Thus, it is more likely that a few loci with small effects contribute to aggressive periodontitis, with possibly the influence of environmental factors.

Acknowledgements

The authors thank the families that participated in the study. F. M. C. was sponsored by CAPES/BEX 094308-8, Brasília, Brazil. M. G. was sponsored by NIH K99DE018085. The results of this paper were obtained by using the software package S.A.G.E., which is supported by a U.S. Public Health Service Resource Grant (RR03655) from the National Center for Research Resources.

References

- Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997) Clinical features of early-onset periodontitis. *Journal of the American Dental Association* **128**, 1393-1399.

- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Boughman, J. A., Halloran, S. L., Roulston, D., Schwartz, S., Suzuki, J. B., Weitkamp, L. R., Wenk, R. E., Wooten, R. & Cohen, M. M. (1986) An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* **6**, 341–350.
- Brown, L. J., Albandar, J. M., Brunelle, J. A. & Loe, H. (1996) Early-onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years. *Journal of Periodontology* **67**, 968–975.
- Diehl, S. R., Wu, T., Burmeister, J. A., Califano, J. V., Brooks, C. N., Tow, J. G. & Schenkein, H. A. (2003) Evidence of a substantial genetic basis for IgG2 levels in families with aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research* **82**, 708–712.
- Elston, R. C. (1992) Segregation and linkage analysis. *Animal Genetics* **23**, 59–62.
- Elston, R. C. & Stewart, J. (1971) A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Human Heredity* **21**, 523–542.
- Glazier, A. M., Nadeau, J. H. & Aitman, T. J. (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**, 2345–2349.
- Hart, T. C., Hart, P. S., Michalec, M. D., Zhang, Y., Firati, E., VanDyke, T. E., Stabholz, A., Zlorogorski, A., Shapira, L. & Soskolne, W. A. (2000a) Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefèvre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *Journal of Medical Genetics* **37**, 88–94.
- Hart, T. C., Hart, P. S., Michalec, M. D., Zhang, Y., Marazita, M. L., Cooper, M., Yassin, O. M., Nusier, M. & Walker, S. (2000b) Localisation of a gene for prepubertal periodontitis to chromosome 11q14 and identification of a cathepsin C gene mutation. *Journal of Medical Genetics* **37**, 95–101.
- Hart, T. C., Marazita, M. L., McCanna, K. M., Schenkein, H. A. & Diehl, S. R. (1993) Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. *Human Genetics* **91**, 416–422.
- Hart, T. C., Marazita, M. L., Schenkein, H. A. & Diehl, S. R. (1992) Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **63**, 169–173.
- Li, Y., Xu, L., Hasturk, H., Kantarci, A., DePalma, S. R. & Van Dyke, T. E. (2004) Localized aggressive periodontitis is linked to human chromosome 1q25. *Human Genetics* **114**, 291–297.
- Loe, H. & Brown, L. J. (1991) Early onset periodontitis in the United States of America. *Journal of Periodontology* **62**, 608–616.
- Long, J. C., Nance, W. E., Waring, P., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1987) Early onset periodontitis: comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genetic Epidemiology* **4**, 13–24.
- Marazita, M. L., Burmeister, J. A., Gunsolley, J. C., Koertge, T. E., Lake, K. & Schenkein, H. A. (1994) Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **65**, 623–630.
- Noack, B., Görgens, H., Hempel, U., Fanghänel, L., Hoffmann, T., Ziegler, A. & Schackert, H. K. (2008a) Cathepsin C gene variants in aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research* **87**, 958–963.
- Noack, B., Görgens, H., Hoffmann, T. H., Fanghänel, J., Kocher, T. H., Eickholz, P. & Schackert, H. K. (2004) Novel mutations in the *Cathepsin C* gene in patients with prepubertal aggressive periodontitis and Papillon-Lefèvre syndrome. *Journal of Dental Research* **83**, 368–370.
- Noack, B., Görgens, H., Schacher, B., Puklo, M., Eickholz, P., Hoffmann, T. & Schackert, H. K. (2008b) Functional cathepsin C mutations cause different Papillon-Lefèvre syndrome phenotypes. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 311–316.
- Novak, M. J. & Novak, K. F. (1996) Early-onset periodontitis. *Current Opinion in Periodontology* **3**, 45–58.
- S. A. G. E. (2008) Statistical Analysis for Genetic Epidemiology. URL: <http://darwin-cwru.edu/sage/>.
- Susin, C. & Albandar, J. M. (2005) Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *Journal of Periodontology* **76**, 468–475.
- Tinoco, E. M., Beldi, M. I., Loureiro, C. A., Lana, M., Campedelli, F., Tinoco, N. M., Gjermo, P. & Preus, H. R. (1997) Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *European Journal of Oral Science* **105**, 9–14.
- Tinoco, E. M., Sivakumar, M. & Preus, H. R. (1998) The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 99–105.
- Van der Velden, U., Abbas, F., Armand, S., de Graaff, J., Timmerman, M. F. & Van der Weijden, G. A. (1993) The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 683–690.
- Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H. & Galicia, J. (2007) The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology* **2000** **43**, 102–132.

Address:
 Alexandre R. Vieira
 Department of Oral Biology
 School of Dental Medicine
 University of Pittsburgh
 614 Salk Hall
 3501 Terrace Street
 Pittsburgh
 PA 15261
 USA
 E-mail: arv11@dental.pitt.edu

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Understanding the mode of inheritance of aggressive periodontitis can better guide future molecular studies aiming to identify contributing genetic factors to the condition.

Principal findings: Our results provide strong support for the hypoth-

esis that genetic factors play a role in aggressive periodontitis, under a model of variable heterozygote transmission.

Practical implications: Family-based designs provide the opportunity to study variation in the phenotype and provide evidence that justifies future family-based genetic analysis.

From these approaches comes the possibility to localize disease loci through linkage analysis. The identification of the genetic variation leading to aggressive periodontitis can improve individual risk assessments of this condition in the future.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 22 de julho de 2004

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Abuquerque Medeiros
Para: Aut. Flávia Martinez de Carvalho
Orient. Prof. Eduardo Muniz B. Tinoco

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (940-CEP/HUPE) "PREFIL GENÉTICO E MICROBIOLÓGICO DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA E SEUS FAMILIARES" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Paulo José D'Abuquerque Medeiros
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

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](#)