

CAROLINA HABER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES IL-2 E IL-4 EM
PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA ATENDIDOS EM
BELÉM DO PARÁ**

Belém

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINA HABER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES IL-2 E IL-4 EM
PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA ATENDIDOS EM
BELÉM DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como Requisito para a Obtenção do Grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof^o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Belém

2009

CAROLINA HABER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES IL-2 E IL-4 EM PACIENTES
COM PERIODONTITE CRÔNICA ATENDIDOS EM BELÉM DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como Requisito para a Obtenção do Grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof^o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Belém, 15 de junho de 2009.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rommel Mário Rodríguez Burbano
Orientador

Prof. Dr. Adriano Maia Correa
1º.Membro

Prof. Dr. André Salim Khayat
2º.Membro

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos
3º.Membro

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
4º.Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me permitir realizar mais um sonho que parecia quase impossível.

Ao professor doutor Rommel Burbano, orientador, profissional de grandiosa experiência científica, minha gratidão pela confiança e amizade em mim depositada.

Ao professor doutor Frank Roberts pelo suporte intelectual e atenção fornecida.

Agradeço a minha família que iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação, para que eu possa trilhá-los cheia de esperanças. O amor de vocês me fortalece.

Sou especialmente grata ao Dinei, pelo carinho e companheirismo durante minha estadia em Seattle.

Aos amigos Amauri Freires e Luana Maciel, pela incansável ajuda na concretização desta pesquisa. Vocês foram meus braços direito e esquerdo!

Aos amigos de laboratório por toda hospitalidade com que fui recebida, em especial a André Khayat, Ney Santos, Joe Gasper, Danielle Calcagno, Kleber, Adriana, Marcelo. Muito obrigada pela atenção prestada.

Aos professores doutores Sidney Santos e Arthur Silva, por ter disponibilizado equipamentos laboratoriais.

Ao professor doutor Adriano Corrêa, pela ajuda na triagem de pacientes e conhecimentos odontológicos prestados.

Meu especial agradecimento aos pacientes que fizeram parte da amostra e tornaram possível a realização deste trabalho.

A UFPA, ao programa de pós-graduação e a todos funcionários e professores, obrigada por todo incentivo.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, tenham contribuído para este trabalho e me ajudaram a realizar mais um sonho.

**A Deus, por estar presente em todos os
momentos de minha vida.
À minha família, pelo apoio e incentivo para
a realização de mais um sonho.**

RESUMO

O polimorfismo no gene das citocinas pode influenciar a susceptibilidade e progressão da periodontite. Duas importantes citocinas, IL-2 e IL-4 foram recentemente associadas a periodontite crônica. Correlação genética entre polimorfismos e características clínicas da doença periodontal pode identificar marcadores biológicos e determinar o risco individual de cada paciente, além de estabelecer novas estratégias de tratamento. O objetivo deste trabalho foi associar o polimorfismo dos genes G-330T IL-2 e C-590T IL-4 com a periodontite crônica através de DNA extraído de células sanguíneas. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos, 51 portadores de periodontite crônica e 68 controles. O polimorfismo foi analisado pela técnica de reação em cadeia da polimerase, eletroforese em géis de agarose e sequenciamento do DNA. O resultados não mostraram diferenças entre casos e controles em frequência dos alelos e genótipos na IL-2. Na IL-4 houve diferenças estatísticas ($p < 0.01$) nos alelos e genótipo, o haplótipo mais presente T(-590) e o genótipo -590 T/T foram significativamente mais frequentes no grupo controle (risco relativo 0.5). Os resultados sugerem que a alta produção de haplótipo (T) no gene IL-4 está associado com a diminuição do risco à periodontite crônica, enquanto o polimorfismo da IL-2 foram distribuídos uniformemente entre casos e controles.

ABSTRACT

Cytokine gene polymorphisms may influence the susceptibility and progression of periodontitis. Two important cytokine genes, interleukin IL-2 and IL-4 recently were associated with chronic periodontitis. Correlation of genetic SNP with stable characteristics of periodontal disease may provide critical information for identifying molecular biomarkers to be incorporated into individual risk profiles and also to establish new treatment strategies. The aim of this study was to associate the G-330T IL -2 and C-590T IL-4 gene polymorphisms with chronic periodontitis. DNA was obtained from blood cells. The cases consisted of 51 patients with chronic periodontitis and were compared to 68 control subjects. The SNP were analyzed by polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, and DNA sequencing. While no significant differences between cases and controls were found in allele and genotype frequencies of IL-2. We found significant differences ($p < 0.01$) in the allele and genotype of IL-4, the haplotype T(-590) and genotype -590 T/T was significantly more frequent in controls (odds ratio 0.5). The results suggest that the high-production IL-4 haplotype (T) was associated with a decreased risk for chronic periodontitis, whereas the IL-2 polymorphisms were similarly distributed among cases and controls.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Aparência <i>in vivo</i> da gengiva superior	10
FIGURA 2: Sondagem periodontal	14
TABELA 1: Distribuição do número de indivíduos, segundo a pior condição periodontal encontrada na população de Belém	16
FIGURA 3: Progressão da Doença Periodontal (A), Periodontite Crônica Severa (B)	17
TABELA 2: Interleucinas: síntese e ações	25
FIGURA 4: Fatores de Risco para Doença Periodontal	32
TABELA 3: Genes associados com periodontite crônica	33
TABELA 4: Iniciadores que foram utilizados na reação em cadeia da polimerase	45
FIGURA 5: Padrões polimórficos dos genes (IL-2 e IL-4, respectivamente) em controle e portadores de periodontite crônica.	51
TABELA 5. Características clínicas, idade e gênero nos grupos com periodontite e controle	52

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Citosina
CAA	Células apresentadora de antígeno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Doença periodontal
DZ	Dizigóticos
G	Guanina
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MMP	metaloproteinase
MZ	Monozigóticos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
SNP	Polimorfismo de base única (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	Timina
TGF-β	Fator de transformação de crescimento-beta (<i>tumor growth factor</i>)
Th	Células T auxiliares (<i>T helper cells</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
1.2 DOENÇA PERIODONTAL	13
1.2.1 Epidemiologia	15
1.2.2 Etiologia e Patogênese	17
1.2.3 Resposta Imunológica	20
1.2.4 Fatores de Risco Periodontais	28
1.2.5 Genética em Periodontia	32
1.3 POLIMORFISMO DOS GENES IL-2 E IL-4	35
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES	42
3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL	43
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA	43
3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	45
3.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA	46
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O **periodonto** compreende os seguintes tecidos: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Sua principal função é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória na cavidade oral (Lindhe, 1999).

A **gengiva** é a porção da mucosa bucal que envolve o dente e cobre o osso alveolar, e por meio da formação de uma conexão com o dente protege os tecidos subjacentes contra o ambiente bucal. Em direção à coroa, a gengiva termina na margem gengival livre, que possui contorno parabólico, enquanto que, em sentido apical, é contínua com a mucosa alveolar, da qual é separada pela junção mucogengival (Manson & Eley, 1999; Lindhe, 1999). A aparência da gengiva e da mucosa alveolar e os diferentes tipos de tecido gengival (Figura 1).

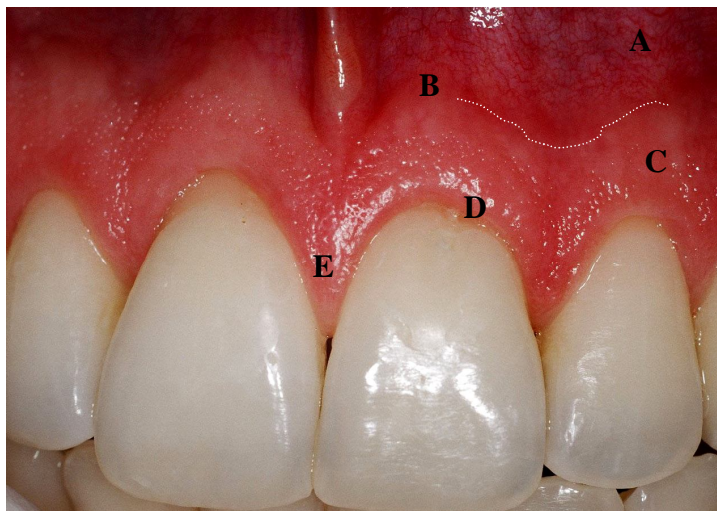


Figura 1: Aparência *in vivo* da gengiva superior.
A= mucosa alveolar, B= junção mucogengival, C= gengiva inserida, D= gengiva livre, E= papila interdentária.

A **gengiva** superficial pode apresentar um pontilhado delicado que lhe confere o aspecto de casca de laranja. Este tipo de mucosa está firmemente inserido no osso alveolar subjacente e cemento por meio de fibras do tecido conjuntivo, sendo imóvel em relação aos tecidos subjacentes. A mucosa alveolar, de cor vermelha mais escura, está localizada apicalmente à junção mucogengival e possui uma ligação frouxa com o osso subjacente. Em contraste com a gengiva inserida, a mucosa alveolar é móvel em relação ao osso subjacente (Lindhe, 1999).

O **ligamento periodontal** é o tecido conjuntivo denso que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular ao osso alveolar. Acima da crista alveolar o ligamento periodontal é contínuo com o tecido conjuntivo gengival, esta continuidade é importante quando se considera a progressão de periodontites a partir de gengivite. Este ligamento localiza-se no espaço entre as raízes dos dentes e osso alveolar que circunda o dente até o nível aproximado de 1 mm apical a junção amelocementária. A presença do ligamento periodontal é essencial à mobilidade do dente, pois a mobilidade dentária é, em grande

parte, determinada pela largura, altura e qualidade do ligamento periodontal (Berkovitzs *et al.*, 2004).

As **fibras do tecido conjuntivo** são principalmente colágenas (tipo I e III), compreendendo mais de 90% das fibras do ligamento periodontal. Embora as células predominantes no tecido conjuntivo do ligamento periodontal sejam os fibroblastos, este tecido apresenta uma população heterogênea. Células formadoras recobrimo a superfície do cemento (cementoblastos) e osso alveolar (osteoblastos) são consideradas parte do ligamento periodontal. As células de reabsorção na superfície do osso e do cemento são os osteoclastos e os cementoclastos, respectivamente. Adicionalmente, o ligamento periodontal contém células indiferenciadas, células de defesa e células epiteliais (Berkovitzs *et al.*, 2004).

O **cemento** é a fina camada de tecido calcificado que recobre a dentina radicular, este tecido varia em espessura em diferentes níveis da raiz, variando de 10-200 µm. O cemento apresenta continuidade com o ligamento periodontal em sua superfície externa e está aderido à dentina na superfície externa. Sua principal função é fornecer inserção às fibras colágenas do ligamento periodontal (Berkovitzs *et al.*, 2004).

Em conjunto com o cemento radicular e as fibras do ligamento periodontal, o **osso alveolar** constitui os tecidos de sustentação dos dentes e distribui as forças geradas durante a mastigação e outras formas de contato entre os dentes. O osso que recobre as superfícies radiculares é consideravelmente mais grosso na parte palatina do que na parte bucal da maxila (Lindhe, 1999).

As paredes dos alvéolos são revestidas por osso compacto que interproximalmente está em relação com o osso esponjoso. O osso esponjoso contém trabéculas ósseas cujo tamanho e arquitetura são em parte, determinados geneticamente, e de outra parte são o resultado das forças a que os dentes estão expostos durante a função (Lindhe, 1999).

Grossi *et al.*, 2004 afirmam que uma das propriedades mais importantes do osso refere-se à sua capacidade de remodelação e adaptação a situações funcionais diferentes de forma contínua. Isso está relacionado aos diferentes tipos de células ósseas, algumas possuindo a propriedade de formar osso (osteoblastos) ou detectar as pressões e tensões mecânicas às quais o osso está sujeito (osteoblastos e osteócitos), enquanto outras possuem a capacidade de reabsorver osso (osteoclastos).

1.2 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma destruição inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, como: ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. As doenças periodontais incluem diversas alterações inflamatórias, a **gengivite** é uma alteração inflamatória envolvendo somente o tecido gengival. Quando o processo inflamatório destrói o osso e o cemento, a patologia é chamada de **periodontite** (Clarke & Hirsch, 1995).

O agente etiológico primário da doença periodontal é a placa bacteriana, esta é composta principalmente por bactérias colonizadoras da superfície dentária dispostas sob a forma de biofilmes microbianos. Esta organização confere condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano, uma vez que atuam como barreira, retendo substâncias produzidas pelas próprias bactérias e, ao mesmo tempo, protegendo-as de fatores de defesa do organismo hospedeiro e de agentes antimicrobianos externos. (Haffajee & Socransky, 1994; Listgarten, 1994). A quantidade de placa na superfície dental pode ser mensurada clinicamente através do **Índice de Placa**. O índice utilizado nesta pesquisa foi preconizado por O'Leary e colaboradores em 1972, sua mensuração é realizada pela avaliação da presença ou ausência de placa bacteriana nas superfícies vestibular, mesial, distal e lingual de todos os elementos dentários presentes; o resultado é fornecido em percentuais de superfícies com placa em relação ao total das superfícies examinadas (ver Ficha Clínica em Anexo).

O sangramento gengival geralmente é o primeiro sinal clínico observado, porém o sangramento não é um instrumento perfeito de diagnóstico. Um estudo de Lang *et al.* (1990) indicou doença progressiva em somente 6% das áreas com sangramento. Uma região examinada sem sangramento, entretanto, é um indicador real de saúde periodontal, já que em 98% dos lugares sem sangramento não houve destruição periodontal. A quantidade de sangramento pode ser mensurada clinicamente através do **Índice de Sangramento Gengival**. O índice adotado nesta pesquisa foi elaborado por Ainamo e Bay em 1975, sua quantificação se baseia na contagem do número de faces dentais com sangramento gengival após 10 segundos da sondagem periodontal, este valor é dividido pelo número total de faces e multiplicado por cem (ver Ficha Clínica em Anexo).

O exame clínico periodontal consiste na mensuração dos parâmetros periodontais como: Índice de Placa, Índice de Sangramento Gengival, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Na **profundidade de sondagem** a mensuração é realizada quando uma sonda periodontal é inserida entre o dente e a gengiva (Figura 2), esta invaginação é forçada apicalmente na direção da junção cimento-esmalte, no espaço correspondente ao sulco gengival. Dependendo do grau de destruição tecidual encontrada no periodonto, a sonda pode penetrar de 0.5 mm a 12 mm no sulco gengival, mensurando assim a profundidade do sulco gengival (fisiológico) ou da bolsa periodontal (patológico), medidas ≥ 3 mm. A **perda de inserção clínica** é definida como a distância entre a junção cimento-esmalte e o fundo do sulco/bolsa e é calculada como a soma das medidas de profundidade de sondagem e recessão gengival (Manson & Eley, 1999).



Figura 2: Sondagem periodontal

A perda de osso alveolar é um dos sinais característicos da doença periodontal destrutiva e, geralmente, considera-se representar uma seqüela anatômica do avanço da periodontite do sentido apical. A extensão e severidade da perda óssea alveolar são usualmente medidas pela combinação de meios clínicos (profundidade de sondagem e perda de inserção clínica) e radiográficos e são importantes adjuntos para o cirurgião-

dentista no diagnóstico, plano de tratamento e avaliação do prognóstico do paciente (Papapanou & Tonetti, 2000).

A periodontite crônica é caracterizada por apresentar lenta e progressiva destruição do osso alveolar. Clinicamente observamos presença de cálculo, profundidade de sondagem superior a 5 mm em pelo menos 6 faces dentais, presença de sangramento e inflamação no tecido gengival (Lindhe *et al.*, 1999). Já a periodontite agressiva é um tipo mais severo de DP caracterizado por rápida perda de inserção e intensa destruição do osso alveolar, este tipo de periodontite é subdividido em periodontites: pré-puberal, juvenil, rápida progressão ou periodontite de início precoce (Yoshie *et al.*, 2007).

1.2.1 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos mundiais afirmam que a cárie e a doença periodontal são as patologias mais prevalentes na cavidade oral. A doença periodontal acomete de 15 a 20% da população com mais de 35 anos de idade. A periodontite está presente na população adulta em diferentes graus de acometimento, representando a maior causa de perda de dentes nessa faixa etária (Albandar & Rams, 2002; Brown & Löe, 1993).

O levantamento epidemiológico em saúde bucal, realizado em 1986 na zona urbana do Brasil, é o único levantamento de caráter nacional existente. Neste levantamento o estado de saúde periodontal foi mensurado de acordo com o Índice Periodontal Comunitário de Necessidades de Tratamento, o qual divide a arcada dentária em sextantes, sendo que a presença de dois ou mais dentes sem indicação de exodontia é pré-requisito ao

exame, caso contrário o sextante é considerado nulo. Na faixa etária de 15-19 anos foram observados 53.08% de sextantes sadios, 22.34% com sangramento, 20.6% com tártaro, 2.32% com bolsas de 4 a 5 mm, 18% com bolsas de 6 ou mais mm e 3.58% nulos para os sextantes superiores.

Em adultos na faixa etária de 35-44 anos foram encontrados 16.86% de sextante sadios, 11.46% com sangramento, 17.96% com tártaro, 6.17% com bolsas de 4 a 5 mm, 1.49% com bolsas de 6 ou mais mm e 46% nulos para sextantes superiores. Já na faixa etária de 50-59 anos, os resultados foram de 5.43% de sextantes sadios, 4.29% com sangramento, 8.09% com tártaro, 4.07% com bolsas de 4 a 5 mm, 1.74% com bolsas de 4 a 5 mm, 2.80% com bolsas de 6 ou mais mm e 64.67% de sextantes nulos.

Segundo Araújo (2003), quando observada a pior situação periodontal encontrada na população de Belém, verificou-se que o maior número de indivíduos estava concentrado em sextantes excluídos. Quando observada a pior situação periodontal encontrada na amostra, pode verificar-se que o maior número de indivíduos estava concentrado em sextantes excluídos, com predominância das faixas etárias de 35 a 44 anos e 65 a 74 anos, onde já foram extraídos grande quantidade de elementos dentários, seguido de 37 indivíduos com presença de cálculo e 23 com bolsa de 4 a 5 mm.

Tabela 1 -Distribuição do número de indivíduos, segundo a pior condição periodontal encontrada na população de Belém.

Sextante	12 anos	15 a 19 anos	35 a 44 anos	65 a 74 anos	Total
Hígido	1	1	0	0	2
Sangramento	11	5	0	0	16
Cálculo	17	13	6	1	37
Bolsa de 4 a 5 mm	0	11	9	3	23
Bolsa \geq 6 mm	0	0	0	1	1
Excluído	1	0	15	25	41

Total	30	30	30	30	120
-------	----	----	----	----	-----

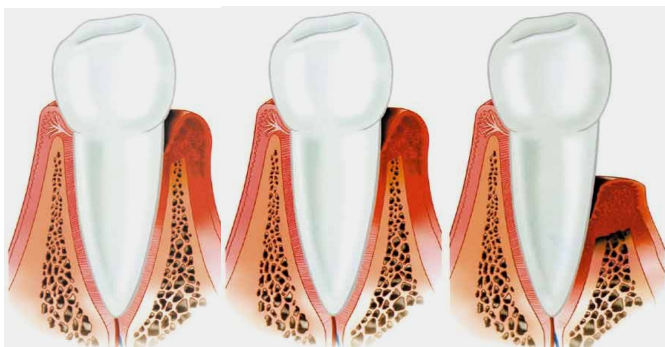
Araújo, 2003.

O aparecimento da gengivite está diretamente relacionado com o nível de higiene oral da população, porém os dados epidemiológicos mundiais são menos pronunciados ao relacionar periodontite e placa dental. Severas formas de periodontite humana freqüentemente afetam uma pequena parte da população mundial, mesmo sabendo que gengivite e formas de periodontite leve a moderada atingem essa população. Acredita-se que a baixa ocorrência de periodontite severa, registrados nos estudos populacionais, pode ser em parte atribuída à falta de padronização dos estudos ou aliados a dificuldade de mensurar se os dentes foram perdidos em virtude da DP. Fator esse que contribui para redução da prevalência de periodontite severa em pacientes edêntulos (Albandar, 2002).

1.2.2 Etiologia e Patogênese

A periodontite é uma doença infecciosa iniciada e sustentada pela placa bacteriana, caracterizada pela presença de bolsa periodontal (aprofundamento do sulco gengival) formada em consequência da perda óssea e migração do epitélio juncional. Clinicamente, observamos sangramento à sondagem, exsudato inflamatório, alteração na cor, forma e textura gengival e em casos mais avançados, pode haver presença de mobilidade dentária (Lindhe *et al.*, 1999).

A



B



B

Figura 3: Progressão da Doença Periodontal (A), Periodontite Crônica Severa (B) - Cortesia Dr. Adriano Corrêa.

A resposta individual de natureza inflamatória, induzida por bactérias presentes no biofilme, parece exercer uma função fundamental no desenvolvimento da DP. A microbiota periodontal encontra-se em um estado de fluxo contínuo, podendo conter mais de 400 espécies diferentes de microrganismos, cada uma apresentando potenciais diferentes para a indução da doença (Genco & Slots, 1984).

Algumas bactérias específicas que podem destruir os tecidos periodontais estão sendo identificadas e caracterizadas, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromona gingivalis* que são patógenos periodontais altamente virulentos que demonstram induzir respostas imunológicas elevadas em várias formas de periodontite, como no caso da periodontite crônica (Tinoco *et al.*, 1997).

O processo inflamatório gengival inicia com edema, seguido de infiltrado celular com predominância de leucócitos polimorfonucleares. Há uma intensificação do estado inflamatório à medida que a placa bacteriana persiste, ocorrendo um aumento na exsudação do fluido gengival e na migração dos leucócitos para os tecidos e sulco gengival. Os linfócitos e neutrófilos são as células predominantes no infiltrado inflamatório nesta fase e

uma quantidade muito pequena de plasmócitos é observada no interior da lesão (Listgarten & Ellegaard, 1973; Brex *et al.*, 1987).

Na gengivite estabelecida observa-se infiltrado composto de linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, à medida que o infiltrado celular sofre expansão há necessidade de espaço no periodonto para abrigá-lo. O estágio mais avançado desse processo é conhecido como periodontite, caracterizado por destruição avançada, ocasionando migração apical do epitélio, dano extenso as fibras periodontais e perda de osso alveolar, podendo até resultar em mobilidade ou perda dentárias (Lindhe *et al.*, 1999).

A gengivite induzida por placa bacteriana, não envolve perda de inserção periodontal e é reversível perante a remoção da placa dentobacteriana. Microscopicamente, as alterações teciduais incluem proliferação da camada basal do epitélio juncional, levando à migração celular apical e lateral, vasculite dos vasos sanguíneos adjacentes ao epitélio juncional, destruição progressiva de fibras colágenas, alterações citopatológicas nos fibroblastos residentes e infiltrado inflamatório/imune progressivo (Page & Schroeder, 1976).

A persistência dos biofilmes microbianos em íntima proximidade aos tecidos periodontais torna a resposta inflamatória em lesão crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte, formando-se uma bolsa periodontal, além de contínua destruição de colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de PMN nos epitélios juncional e da bolsa periodontal, denso infiltrado inflamatório mononuclear e perda de osso alveolar, caracterizando a periodontite crônica. (Page & Schroeder, 1976; Jeffcoat & Reddy, 1991).

Em achados microscópicos da periodontite, foi observado que a migração apical do epitélio juncional ocorre simultaneamente com a dissolução de fibras periodontais mais coronalmente dispostas. Para ocorrer migração celular, os queratinócitos devem se destacar da membrana basal do epitélio, processo provavelmente mediado por degradação enzimática. O movimento ativo de células epiteliais envolve adesão às moléculas da matriz extracelular em locais de contato e subsequente contração do citoesqueleto, o que gera forças locomotivas. A motilidade celular também requer a liberação da célula dos locais de adesão, o que é diretamente, pelo menos em parte, limitado pela proteólise das moléculas da matriz pela metaloproteinases (MMP). Então, períodos de progressiva destruição tecidual da periodontite envolvem atividade proteolítica tais como as collagenases MMP-1 e MMP-8, e as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (Golub *et al*, 1995; Sorsa *et al*, 1988).

Os linfócitos T são predominantes em lesões periodontais estáveis, enquanto que os linfócitos B e plasmócitos estão mais abundantes em lesões periodontais em progressão (Lindhe *et al*, 1980; Reinhardt *et al.*, 1988). O que sugere que células Th1 que expressam células T são os principais reguladores inflamatórios em lesões iniciais ou estáveis. Produção de interferon-gama (IFN- γ) pode aumentar fagocitose dos neutrófilos e macrófagos, inibindo a progressão da infecção. A predominância de linfócitos B e plasmócitos em lesões avançadas em progressão evidenciam o papel das células Th2 na destruição do tecido periodontal (Tsai *et al*. 2007).

1.2.3 Resposta Imunológica

A periodontite crônica é resultado da resposta inflamatória da placa bacteriana, podendo afetar os tecidos gengivais e progredir para destruição do epitélio

juncional, colocando assim em risco a longevidade da dentição. A progressão da doença é devido a combinação de fatores como presença de bactérias periodontopatogênicas, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, matriz de metaloproteinases, prostaglandinas E₂ (PGE₂) e baixos níveis de inibidores inflamatórios como interleucina-10, fator de transformação de crescimento-beta (TGF-β) e tecidos inibidores de metaloproteinases (Page *et al.*, 1997).

Nas doenças inflamatórias crônicas há fatores que não causam a doença, mas amplificam alguns mecanismos que a tornam mais severa. Quando um determinado tecido apresenta uma resposta inflamatória, a expressão de várias citocinas torna-se aumentada e posteriormente, na tentativa de controlar essa mesma resposta inflamatória local, a expressão de citocinas tende a diminuir. Desta maneira, há uma complexa interação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias atuando nos tecidos periodontais inflamados (Okada & Murakami, 1998). Nos últimos anos vários estudos têm procurado esclarecer como as citocinas interferem na progressão da DP (Wilson *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Seymour *et al.*, 2007; Okada & Murakami, 1998; Loos *et al.*, 2005; Holla *et al.*, 2008).

As citocinas têm sido investigadas com relação à doença periodontal, buscando entender o papel que desempenham. Alguns dados são referidos a seguir:

Citocinas são polipeptídeos que atuam de forma não-enzimática, em concentrações nanomolares ou picomolares, regulando crescimento, diferenciação e função de várias células e linhagens celulares. Essas moléculas foram originalmente identificadas, descritas e denominadas de acordo com seu papel sobre células linfo-hematopoéticas (Metcalf *et al.*,

1989), mas, sabe-se que estas apresentam uma variedade de funções, atuando em processos fisiológicos e fisiopatológicos. O termo citocina se restringe às moléculas originalmente denominadas interleucinas (IL), linfocinas, monocinas, fatores estimuladores de colônias, ou interferons, com base na sua origem ou ação sobre células do sistema hematopoético (Robertson *et al.*, 1994).

Há numerosas propriedades compartilhadas por essas moléculas:

- as citocinas são produzidas durante a fase efetora da imunidade inata e adaptativa, atuando como mediadoras e reguladoras da resposta imune e inflamatória;
- atuam sobre muitos tipos celulares diferentes (efeito pleiotrópico);
- costumam ter múltiplos e diferentes efeitos sobre a mesma célula-alvo;
- as ações das citocinas costumam ser redundantes;
- influenciam a função e síntese de outras citocinas;
- iniciam sua ação por ligação a receptores na superfície da célula-alvo;
- os níveis de produção das citocinas são controlados geneticamente (Pociot *et al.*, 1993).

As citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatórios) ou inibidores (anti-inflamatórios), não se limitando ao sistema hematopoético, e exercem papel essencial em muitos outros sistemas fisiológicos, incluindo o sistema reprodutor (Hauser, 1995; Robertson *et al.*, 1994).

A célula-alvo pode ser a mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina), uma célula vizinha (ação parácrina) ou uma célula distante estimulada por meio de citocinas secretadas na circulação (ação endócrina) (Abbas *et al.*, 2000).

A maioria das respostas imunes envolve principalmente respostas do tipo humoral ou mediadas por células, e há evidências de que essas duas respostas não são frequentemente mutuamente exclusivas (Parish, 1972; Katsura, 1977). A descoberta de dois subtipos de clones de células T auxiliares (Th) CD4+, Th1 e Th2, derivadas de um terceiro fenótipo, Th0, em camundongos e em humanos, fornece algumas explicações para a expressão recíproca das duas respostas (Mosmann *et al.*, 1986; Del Prete *et al.*, 1991).

Quando ativadas por antígenos ou células apresentadoras de antígenos, as células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e LT- α (Mosmann *et al.*, 1986; Cherwinski *et al.* 1987; Coffman *et al.*, 1988; Mosmann & Coffman, 1989). O padrão de citocinas Th1 está frequentemente associado com resposta mediada por células, particularmente apropriadas para destruir intracelularmente patógenos extracelulares endocitados por células fagocíticas ou patógenos que se multiplicam no citoplasma das células infectadas, estando, também, associado à hipersensibilidade do tipo tardia e ativação das células TCD8+, e pela produção de anticorpos opsonizantes, podendo estar associado com estímulo inflamatório e dano tissular (Mosmann *et al.*, 1989).

Em contraste, o padrão de citocinas Th2, que inclui IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, inibe as respostas mediadas por células fagocíticas, mas estimula respostas de anticorpos, promovendo a produção de quantidades relativamente elevadas de IgM, IgE, e isotipos de IgG não-ativadores do complemento, além de estimular a ativação e

diferenciação de eosinófilos e atua nas reações alérgicas (Cherwinski *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1989).

A secreção das diferentes citocinas contribui de forma eficaz para a diferenciação entre os subtipos de células T. Assim, a regulação das respostas humorais é mediada por células que pode ser explicada, em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células Th1 e Th2 no decorrer de uma resposta imune. Algumas dessas respostas reguladoras são conhecidas, como por exemplo, o IFN- γ , que é produzido pelas células Th1 e inibe a proliferação de clones Th2 (Gajewski & Fitch, 1988; Fernandez-Botran *et al.*, 1988), enquanto a IL-4, que é produzida pelas células Th2, inibe a diferenciação e proliferação de células Th1 (Le Gros *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990). Um terceiro tipo de célula T foi identificado, as chamadas células Th3 CD4⁺ que secretam TGF- β mas não secretam IL-2, IFN- γ , IL-4 ou IL-10, e parecem ser o único subtipo de célula T que age nas mucosas, atuando na regulação negativa de células Th1 e de outras células do sistema imune (Mosmann & Sad, 1996; Raghupathy, 2001).

No periodonto as citocinas são produzidas por vários tipos celulares como: leucócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, osteoclastos, células epiteliais, monócitos, linfócitos e mastócitos que atuam como importantes mediadores químicos que regulam a duração e a intensidade da resposta imune (Abbas *et al.*, 2002; Silva *et al.* 2007).

O desenvolvimento e regulação da resposta imunológica dependem da quantidade da produção local de citocina, fato que irá determinar se a resposta será protetora ou não para o organismo. A resposta imunológica frente à infecção é regulada pelo balanço entre citocinas Th1 e Th2. O principal efeito de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) é

aumentar a resposta mediada por células, enquanto as citocinas Th2 (IL4) tem objetivo de suprimir resposta mediada por células e conseqüentemente aumentar a resistência associada a resposta imunológica humoral (Modlin & Nutman, 1993).

A periodontite envolve resposta imune inata e adaptativa, sendo que o papel da resposta do hospedeiro na perda óssea é muito complexo. Estudos sugerem que a deficiência na resposta do hospedeiro aumenta a destruição periodontal, ao mesmo tempo resposta muito vigorosa também contribui para a destruição da área. A importância das citocinas foi mostrada através de estudos que comprovaram inibição de IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) na progressão de perda de inserção e perda óssea periodontal em primatas não-humanos (Assuma *et al*, 1998) e na redução da perda óssea (Williams, *et al*. 1985).

As interleucinas compõem um grande grupo de citocinas denominadas por IL-1 a IL-15, produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais. As interleucinas possuem uma variedade no mecanismo de ação (Tabela 2), mas a maioria delas está envolvida na indução da divisão de outras células, sua atuação se dá em um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada interleucina (Sim, 1993). Atualmente o grupo de citocinas vem aumentando sendo composto por IL-1 a IL-35 (Collison & Vignali, 2008).

Tabela 2: Interleucinas, síntese e ação.

Interceucina	Síntese	Ação
IL - 1 α	Macrófagos, célula epitelial	Ativação do linfócito T, células tronco e Macrófagos. Febre.
IL - 1 β	idem	idem
IL - 2	Linfócito T	Proliferação e ativação e linfócito T, CD4, CD 6 e NL
IL - 3	Linfócito T, células tímica epitelial	Início da hematopoiese
IL - 4	Linfócito T e mastócito	Ativação de linfócito B Diferenciação das CAA (*)
IL - 5	Linfócito T e mastócito	Crescimento e diferenciação de eosinófilos
IL - 6	Linfócito T e macrófago	Crescimento e diferenciação de linfócitos T e B Produção de proteínas de fase aguda Ativação das células tronco
IL - 7	Estroma da medula óssea	Maturação de linfócitos Pré-B e Pré-T
IL - 8	Macrófago	Quimiotáticos para neutrófilos e linfócito T
IL - 9	Linfócito T	Ativação dos mastócitos
IL - 10	Linfócito T, macrófago, vírus Epstein-Barr	Supressor das funções dos macrófagos. Ativação de linfócito B
IL - 11	Fibroblasto do estroma Medular	Sinergia com IL-3 e IL-4 na hematopoiese
IL - 12	Linfócito B e macrófago	Ativa células NK e induz diferenciação da célula T CD4 em célula T h1
IL - 13	Linfócito T	Crescimento e diferenciação de linfócito B inibe ação de macrófagos
IL - 14	Linfócito T, alguns linfócitos B	Fator de crescimento para células B. Inibe a síntese de Ig.
IL - 15	Linfócito T	Ativa células NK, células T NK, CD 8 ⁺ , CD 4 ⁺ , linfócito B, macrófagos e células T intestinais γ e δ

CAA – Célula apresentadora de antígeno

A IL-1 pertence à família de proteínas correlatas que atuam como protótipo de citocina multifuncional, estando localizada no cromossomo 2q13-21. IL-1beta é um precursor de 31 kDa que é glicosilado e clivado para molécula de pró-IL-1beta. A principal função da IL-1, juntamente com a IL-6 e o TNF- α , é mediar a resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata, desempenhando atividades pró-inflamatórias. Como a principal citocina pró-inflamatória, aumentos nos níveis de IL-1 β têm sido ligados a artrite reumatóide, malignidades invasivas, infecções virais e bacterianas, mal de Alzheimer, insuficiência cardíaca congestiva e periodontite crônica (Nisengard & Newman, 1997; Kornman et al., 1997; Gore et al. 1998).

A IL-2 possui um papel crítico na mediação da resposta imune, atuando como um fator de crescimento e de diferenciação para as células T, células B, células *natural killer*, linfócitos infiltrantes de tumores, monócitos, macrófagos e oligodentrócitos. Estudos têm demonstrado que a IL-2 causa a regressão de alguns tipos de tumores e pode ter implicações em imunoterapia, tratamento de doenças infecciosas e deficiências imunes. A IL-2 está associada a estimulação da atividade osteoclástica na reabsorção do osso alveolar (Ries *et al.*, 1989). Apesar do papel pró-inflamatório da IL-2, seu envolvimento na influencia e progressão da DP é pobremente entendido. Existem estudos conflitantes sobre os níveis da IL-2 no soro de indivíduos com periodontite (McFarlane & Meikle, 1992) e níveis da IL-2 presentes em cultura de células mononucleares de gengiva e sangue periférico (Fujihashi *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1997). Porém, evidências indicam que a IL-2 pode ser um fator relevante na patogênese da periodontite, em virtude de tecidos

periodontais com inflamação crônica apresentaram culturas de linfócitos e perda óssea alveolar produzirem IL-2 (Seymour *et al.*, 1985).

A IL-3 está envolvida no crescimento dos precursores das linhagens hematopoiéticas e a IL-5 induz a produção de IgA por linfócitos B e estimula o crescimento e diferenciação de eosinófilos (Nisengard & Newman, 1997).

A IL-4 é uma glicoproteína que apresenta propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatória. Ela é um fator solúvel produzido por linfócitos T ativados, que determina a proliferação e a diferenciação das células B. Esta citocina induz, nas células B, a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II, e os receptores Fc. A IL-4 também age nos linfócitos T, nas linhagens de mastócitos, e em várias outras células da linhagem hematopoiética, inclusive os granulócitos, os megacariócitos e os precursores eritrócitos, bem como os macrófagos (Seymour *et al.*, 1985). Um dos papéis biológicos da IL-4 é promover supressão de citocinas pró-inflamatórias com a IL-1 e TNF α (Essner *et al.*, 1989; Hart *et al.*, 1989).

A IL-4 controla a produção de citocinas, seu efeito inibidor na produção de citocinas faz do IL-4 um candidato potencial para ser utilizado em doenças inflamatórias crônicas. Como características pró-inflamatórias, a IL-4 induz a proliferação de linfócitos B e a liberação de IgG e IgE após a estimulação por lipopolissacarídeos de bactérias periodontopatogênicas (Snapper & Paul, 1987; Tew *et al.*, 1989). Em sítios com periodonto inflamado foram encontrados níveis elevados de IgG e IgE (Reinhardt *et al.*, 1989; Michel *et al.*, 2001; Hyypä, 1984). Foi sugerido que a ausência de IL-4 nos tecidos gengivais com

periodontite poderia ser responsável pelo acúmulo de macrófagos na região, devido a IL-4 induzir a apoptose em macrófagos nos tecidos gengivais (Yamamoto *et al.*, 1997).

A IL-4 e IL-10 têm sido consideradas inibidoras de IL-1 e TNF- α e estimuladoras de reabsorção óssea *in vitro*. IL-1 estimula a reabsorção diretamente e indiretamente via expressão de ciclooxigenases-2 através dos osteoblastos. Ambos os mediadores inibem a reabsorção óssea através da suspensão da ciclooxigenase-2-dependente síntese da prostaglandina E₂. A IL-4 também inibem o recrutamento de osteoclastos percussores e a sua diferenciação para maturação de osteoclastos multinucleados (Sasaki *et al.*, 2000).

A resposta do hospedeiro é essencialmente de proteção, contudo uma resposta inflamatória exacerbada pode levar a uma destruição tecidual mais severa, indicando uma contribuição crítica da resposta do indivíduo no desenvolvimento da periodontite (Kornman *et al.*, 1997; Reinhardt *et al.*, 1993).

A complexidade da resposta imune e sua regulação têm levado grandes avanços nos estudos das citocinas e genética molecular, sendo as citocinas consideradas reguladoras-chaves dos mecanismos homeostáticos. As variações nas citocinas tanto quantitativa como qualitativa podem ser associadas com susceptibilidade do hospedeiro às doenças, dessa forma, estabelecem critérios que irão contribuir no estudo da patogênese da periodontite (Ollier, 2004). Justificando assim o grande número de estudos de polimorfismos genéticos em citocinas.

1.2.4 Fatores de Risco Periodontais

Por muitas décadas foi predominante o pensamento que a DP era causada predominantemente pelo acúmulo de placa bacteriana. A manifestação inicial da doença

seria uma gengivite marginal, a qual, sem uma higiene oral adequada progredia lentamente e inexoravelmente para a periodontite (Manson & Eley, 1999). Eram escassas as informações a respeito da susceptibilidade do hospedeiro e da existência de fatores de riscos, como: fumo, diabetes, gravidez, sexo, idade, osteoporose, estresse; sendo que hoje sabemos que estes fatores podem determinar e/ou influenciar o modo de progressão, interferindo na progressão da DP (Lindhe *et al*, 1996; Mealey, 2000).

O hábito de fumar cigarros é um fator de risco para a periodontite (Bergstrom, 1989; Haber *et al.*, 1993). Fumantes aumentam a prevalência e a severidade da DP, bem como aumenta a prevalência de perda dentária e edentulismo quando comparados com não-fumantes. Estudos afirmam que o cigarro aparenta interferir na resposta cicatricial durante o tratamento periodontal e na recorrência da periodontite durante fases de manutenção do tratamento (Tonetti *et al*, 1995). No mesmo estudo, foi comprovado que ex-fumantes apresentaram riscos diminuídos para desenvolver periodontite quando comparados com fumantes ativos, este achado é considerado uma forte evidência que a interrupção do fumo pode contribuir na melhora da saúde periodontal (Tonetti, 1998).

O *Diabetes Mellitus* pode influenciar na prevalência e na gravidade da periodontite como também no progresso da doença (Taylor *et al.*, 1996). Em relação ao grau de comprometimento dos tecidos periodontais entre diabéticos e não diabéticos, estudos demonstraram que os pacientes diabéticos apresentavam valores mais elevados na profundidade de sondagem, perda de inserção, níveis de perda óssea e prevalência mais acentuada de periodontite severa (Oliver & Tervonen, 1994).

Durante a gravidez, com muita frequência, têm-se relatado mudanças no aspecto gengival das pacientes, com uma tendência ao agravamento da DP, tornando-se mais perceptível frente à presença de irritantes locais. Tais mudanças, como hiperemia, edema e sangramento gengival, estão relacionadas a fatores como deficiências nutricionais, altos níveis hormonais, presença de placa bacteriana, assim como o estado transitório de imunodepressão (Amar & Chung, *et al.*, 1994). Também são observadas alterações na microbiota bucal e no metabolismo celular. O aumento nos níveis de estrógenos, especialmente progesterona, resulta em mudanças na permeabilidade vascular. Na cavidade bucal, isto pode resultar em edema gengival e aumento nos níveis de fluido gengival (Machuca *et al.*, 1999). Somando-se a isto, a produção de prostaglandina é estimulada, possibilitando exacerbação do processo inflamatório gengival. Assim, a gestante pode ser considerada uma paciente com risco temporário, maior que o normal, para desenvolver complicações periodontais (Zachariassen, 1993).

As mulheres demonstraram menor frequência de DP do que os homens, ainda que apresentem período de susceptibilidade aumentada. Sugere-se que esta diferença estaria mais relacionada com a pobre higiene bucal dos homens e com sua menor frequência ao dentista do que com qualquer outro fator genético (Neville *et al.*, 2004). Em 1990, Brown teve como resultado o aumento de 1,5 vezes no número de bolsas periodontais encontrado em pacientes do sexo masculino, em todas as faixas etárias analisadas.

Grossi *et al.*, 1994 afirmam que a idade está associada com o aumento da DP. Mas tem sido observado que o aumento da lesão periodontal observada em idades elevadas é resultado da destruição cumulativa ao invés de aumento do nível da agressividade da periodontite. Logo, a idade não é um fator de risco por si só (Genco, 1996).

Lopes *et al.* 2008 revelaram ser semelhante à situação periodontal, no grupo de mulheres na pós-menopausa com densidade mineral óssea normal no exame inicial e após um ano, indicando que a idade neste caso não poderia ser considerada um fator de risco para o aumento da profundidade de sondagem e do nível de inserção clínica. No entanto, a maior perda no nível de inserção periodontal observada entre as mulheres com osteopenia e com osteoporose, analisadas no presente estudo, ratifica a associação entre a osteoporose e um dos parâmetros de avaliação da doença periodontal, ou seja, o nível de inserção clínica. Isto pode ser explicado, pois há uma hipótese de que a deficiência de estrogênio influencia na remodelação óssea em sítios com processos inflamatórios, como observados na doença periodontal. Confirmando assim a hipótese de que as mulheres na pós-menopausa com osteoporose apresentaram maior probabilidade de ter doença periodontal do que as mulheres sem osteoporose.

Indivíduos que sofrem estresse psicológico estão mais predispostos a apresentarem perda de inserção clínica e perda de osso alveolar. Um possível fator seria o aumento da produção de IL-6 em resposta ao aumento do nível de estresse (Hugoson *et al.*, 2002; Kiecolt-Glaser *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que a resposta do hospedeiro frente a infecções com *Porphyromonas gingivalis* pode ser comprometida pelo estresse (Hourihaddad *et al.*, 2003). Vários estudos foram publicados afirmando que o estresse é um fator de risco para a DP, porém a relação pode ser simplesmente pelo fato que pessoas estressadas normalmente não apresenta bons hábitos de higiene oral (Croucher *et al.*, 1997).

Variações genéticas podem ter papel protetor ou ser um fator de risco para periodontite, diferenças genéticas no desenvolvimento imuno-celular e na apresentação do antígeno podem contribuir na susceptibilidade de doenças autoimune e infecciosas (Van der

Pol & Van de Winkel, 1998). Fatores de riscos genéticos têm sido relacionados à influência natural da história da periodontite (Fig.4) (Michalowicz *et al.* 1991; Hart, 1994; Page, 1999; Page & Sturdivant, 2002).

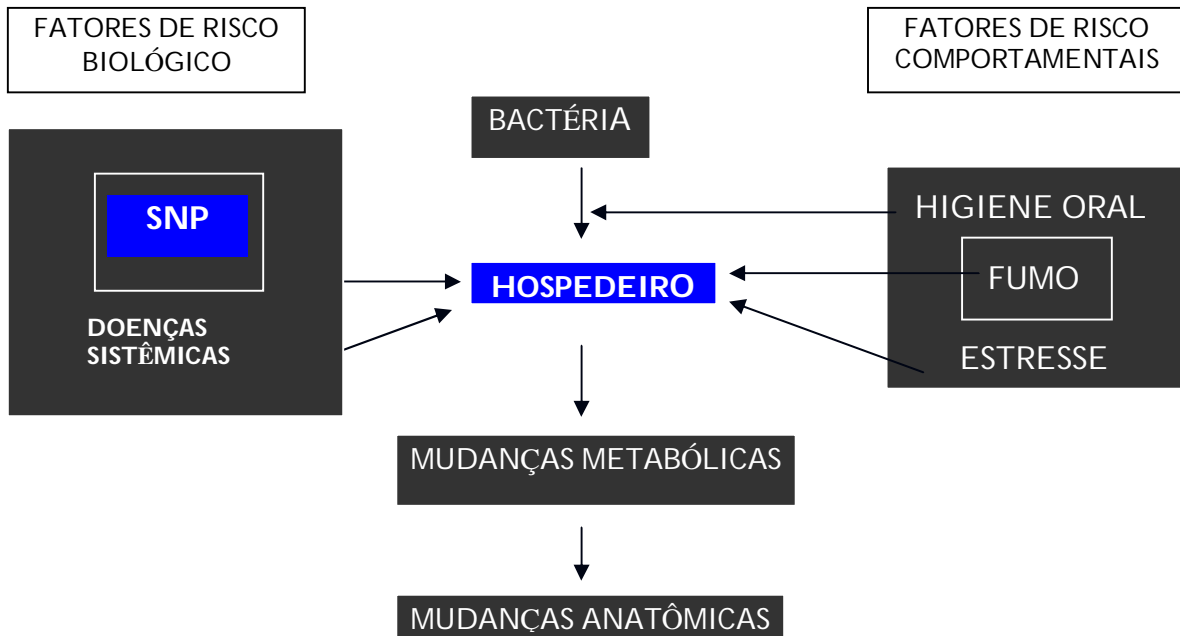


Figura 4: Fatores de Risco para Doença Periodontal

1.2.5 Genética em Periodontia

A periodontite é considerada uma doença humana complexa, assim como Mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, por apresentar progressão lenta e natureza crônica. Estas doenças são relativamente freqüentes e aparecem na idade adulta, sendo normalmente doenças complexas de caráter multigênica, por apresentarem uma função cumulativa de múltiplos genes e influências ambientais (Hart & Kornman, 1997, Tabor *et al.*, 2002). Fazendo analogia a outras doenças complexas, estima-se que a periodontite envolve pelo menos 10 a 20 genes modificadores da doença periodontal (Tabela 3). Porém, é importante

ressaltar que o número e tipo de genes modificadores da doença para a mesma condição podem não ser igual para diferentes populações étnicas, devido às influências dos fatores ambientais (Loos *et al.*, 2005).

Tabela 3: Genes associados com periodontite crônica.

Genes	Lócus/ Alelo	Etnia	Referências
IL-1 α	+4845 G/T	Caucasiano	Gore <i>et al.</i> , 1998
IL-1 β	+3954 C/T	Caucasiano	Kornman <i>et al.</i> , 1997
TNF- α	-1031 T/C	Japonês	Endo <i>et al.</i> , 2001
	-863 C/A	Japonês	Soga <i>et al.</i> , 2003 Endo <i>et al.</i> , 2001
	-857 C/T	Japonês	Soga <i>et al.</i> , 2003 Endo <i>et al.</i> , 2001
TNF- β	+252 A/G	Caucasiano	Soga <i>et al.</i> , 2003 Fassmann <i>et al.</i> , 2003
IL-6	-572 G/C	Caucasiano	Galbraith <i>et al.</i> , 1998 Hollá <i>et al.</i> , 2004
	-373 (microsatélite)	Japonês	Komatsu <i>et al.</i> , 2005
IL-10	-1082 A/G	Caucasiano	Scarel-Caminaga <i>et al.</i> , 2004
	-819 C/T	Caucasiano	Scarel-Caminaga <i>et al.</i> , 2004
	-592 C/A	Caucasiano	Scarel-Caminaga <i>et al.</i> , 2004
TNFR2	+857 T/G	Japonês	Shimada <i>et al.</i> , 2004.
IFN- γ R1	Microsatélite (íntron)	Caucasiano	Fraser <i>et al.</i> , 2000.

Doenças crônicas que tem alta frequência populacional tende a ser agregada em famílias. Essa agregação familiar é frequente devido ao ambiente, condições socioeconômicas e aos fatores hereditários. O mecanismo genético de como ocorre a doença crônica é desconhecido devido sua etiologia complexa, sendo que a suscetibilidade genética pode ser importante para desvendar sobre a expressão da DP (Kornman *et al.*,

1997). Agregação familiar tem sido suspeita devido ao desenvolvimento de periodontites de acometimento precoce (Marazita *et al.*, 1994; Sáxén & Nevalinna, 1984). Em contraste com a periodontite agressiva, a periodontite crônica não segue tipicamente o padrão familiar de transmissão ou distribuição. Estudos em gêmeos é o método mais popular para suportar aspectos genéticos da periodontite crônica (Yoshie *et al.*, 2007).

O polimorfismo genético pode ser associado com diferentes formas clínicas de periodontite (Kornman *et al.*, 1997). A periodontite agressiva sofre forte influência dos fatores genéticos (Hart, 1994). No que se refere a periodontite crônica, certos estudos afirmam que a mesma é aparentemente pouco influenciada por esses fatores. Entretanto, tem-se demonstrado que a susceptibilidade à periodontite crônica também pode estar relacionada com o componente hereditário em 50% dos casos (Kornman *et al.*, 1997; Michalowicz *et al.*, 2000).

Evidências genéticas foram observadas através da comparação da periodontite crônica em gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Os autores assumiram nessa pesquisa que, como um dado grupo de gêmeos cresceram no mesmo ambiente, existe uma razão para acreditar que eles compartilham a maior parte dos hábitos e práticas. Dessa forma, a similaridade desses fatores como hábitos pessoais, estilo de vida e acesso a cuidados de saúde não devem ser diferentes, na média, em membros de pares de gêmeos sendo MZ ou DZ. Ao avaliar os parâmetros periodontais (perda de inserção, profundidade de sondagem, índice gengival e índice de placa) foi observada que a população apresentou diferentes perda de inserção nos gêmeos DZ quando comparados com os MZ. O resultado indicou que cerca de 50% da variação da perda de inserção é hereditária (Michalowicz *et al.* 1991, 2000).

Estudos epidemiológicos e moleculares da microbiota oral sugerem que apesar de fatores microbianos serem necessários para o desenvolvimento da DP, quando se apresentam de forma isolada não são capazes de prognosticar quanto a presença ou severidade da periodontite. Atualmente, a susceptibilidade do hospedeiro (resposta imune e estado da doença sistêmica) e outros fatores ambientais não microbianos (fumo) tem mostrado importantes contribuições na expressão da doença. Estudos sugerem que menos de 20% da variabilidade da expressão da DP pode ser explicada pelo nível de microorganismos específicos. Por exemplo, estudo sobre a contribuição estatística do fumo na doença foi similar a atribuída a bactéria (Hart & Kornman, 1997).

Fatores desencadeadores, como bactéria específica, podem não estar fortemente associado com a destruição tecidual caso os fatores modificadores, como o fumo, não estejam presentes. Os autores afirmam que o reconhecimento da bactéria é essencial para a iniciação e progressão da periodontite, mas fatores como o fumo e genética, podem influenciar significativamente a severidade da DP (Schenkein *et al.*, 1995).

1.3 POLIMORFISMO DOS GENES IL-2 E IL-4

Polimorfismo de base única (SNP) surge como resultado de mutações genéticas, sendo a forma mais abundante de variação no ácido desoxirribonucléico (DNA). Todos os organismos sofrem mutações espontâneas como resultado normal da função celular ou através de interações aleatórias com o ambiente. Uma alteração que modifica somente um

par de base é conhecido como mutação em ponto, nem todas mutações em ponto podem ser reparadas e podem ser transmitidas por herança genética. As trocas de nucleotídeos, por transição (a troca de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra) ou por transversão (de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa), só podem ser consideradas SNPs se sua prevalência for maior que 1% na população (Collins, 1991).

O SNP pode apresentar ou não efeitos biológicos no organismo. Se a transição ocorrer numa região codificante do gene, irá resultar numa substituição de aminoácidos e alterar a estrutura protéica, podendo alterar conseqüentemente a função. Em casos em que a mutação ocorre em região promotora do gene, pode haver uma alteração na regulação gênica resultando na inibição ou redução da expressão gênica, ou até mesmo a superexpressão gênica, talvez acarretando alguma conseqüência biológica (Loos *et al.*, 2005).

Variações individuais no risco a uma determinada doença têm sido associadas com variação alélica específica de diferentes genes que estão presentes em uma proporção significativa da população. Polimorfismo em um grande número de genes pode afetar o efeito de fatores ambientais, e essas interações podem explicar a grande variação na incidência de doenças na população mundial (González *et al.*, 2002). O fato de que polimorfismos genéticos podem estar associados ou podem ser funcionalmente responsáveis pela aparente diferença na resposta imune frente a infecções nos diversos indivíduos, contribui para aumentar o interesse em identificar genes relacionados a periodontite (Walker *et al.*, 2000, Kornman *et al.*, 1997).

Assim como outras doenças complexas, a variação gênica associada a múltiplo locus em portadores de periodontite pode ser utilizada para localizar genes candidatos a doença periodontal. Por isso que a maioria das pesquisas genéticas em periodontia tem direcionado estudos para polimorfismo gênico imunoregulatório ou metabólico, como as citocinas, receptores de superfície celular, enzimas entre outras relacionadas com o reconhecimento de antígeno (Yoshie *et al.*, 2007).

O balanço entre níveis locais de algumas citocinas estimula a resposta de bactérias periodontopatogênicas e liberação de seus produtos, sendo um importante fator que determinará a resposta imunológica ao patógeno (Jiang *et al.*, 1999).

A associação de SNP a doenças está primeiramente ligada aos efeitos do polimorfismo na posição no gene pela modificação da expressão ou da função do produto gênico, além de demonstrar o desequilíbrio de ligação com outros genes implicados (Collins *et al.*, 1997). O estudo de SNPs em doenças complexas podem ser utilizados como marcadores em mapeamento de genes candidatos em clonagem posicional ou como polimorfismos a serem testados (Kruglyak, 1997).

Em 1997, Kornman *et al.* publicaram o primeiro artigo sobre a associação entre genótipo IL-1 e a progressão da periodontite, observaram que pacientes genótipos positivos apresentam aumento de exsudato inflamatório e de sangramento gengival. O risco calculado para pacientes com genótipo positivo para a IL-1 desenvolverem a DP é de 6.8. Os autores concluíram que um paciente gene positivo tem uma probabilidade quase sete vezes maior de desenvolver ou ter uma progressão na periodontite do que um paciente gene negativo.

Outros estudos evidenciaram que genótipos positivos para IL-1 poderiam ser mais suscetíveis à perda dentária quando comparados com paciente genótipo negativo para IL-1 (McGuire & Nunn, 1999). Posteriores investigações mostraram que pacientes não fumantes e genótipo positivo para IL-1 com idade superior a 50 anos apresentaram profundidade de sondagem periodontais significativamente mais elevadas do que paciente genótipo negativo (Cullinan *et al.*, 2001). Resultados contraditórios também foram publicados demonstrando que não houve diferenças periodontais entre pacientes genótipos negativo e positivo para a IL-1 (Papapanou *et al.*, 2001; Trevilatto *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm analisado polimorfismos em genes de mediadores pró-inflamatórios, como os reguladores da intensidade da resposta do hospedeiro ou do risco à doença periodontal, como as citocinas IL-1 α e β (Kornman *et al.* 1997; Diehl *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 1999), IL-6 (Trevilatto *et al.*, 2003), IL-4 (Scarel-Caminaga *et al.*, 2003), MMP-1 (Souza *et al.*, 2003), IL-2 (Scarel-Caminaga *et al.*, 2002), TGF-B1 (Souza *et al.*, 2003), receptor de vitamina D (Hennig *et al.*, 1999), TNF α e os genes classe II do complexo de histocompatibilidade principal, envolvidos na patogênese da doença que são apontados como agentes de risco à progressão da periodontite (Takashiba *et al.*, 1999)

O gene da IL-2 se encontra localizado no braço longo do cromossomo 4, região 4q26-q27, o polimorfismo em destaque é a substituição da T/G na posição -330 apresentam estudos com câncer de próstata e doadores de sangue (Reynard *et al.*, 2000). Evidências indicam que IL-2 também pode ser um fator relevante na patogênese da DP. Culturas de linfócitos provenientes de tecido periodontal inflamatório crônico de pacientes com perda óssea alveolar produzem IL-2 (Seymour *et al.*, 1985). Portadores de periodontite apresentam nível elevado IL-2 no soro sanguíneo quando comparados com pacientes sem

DP, sugerindo que a IL-2 pode ser um marcador patológico inflamatório em DP (McFarlane & Meikle, 1991; John *et al.*, 1998).

O SNP na posição -330 (T/G) na região da IL-2 humana foi caracterizada por John *et al.* (1998), que avaliaram as frequências dos alelos G e T em 79 caucasianos saudáveis em na Inglaterra. Os autores sugeriram que este polimorfismo pode ser útil como marcador diagnóstico para susceptibilidade de doenças inflamatórias. O mesmo polimorfismo foi investigado em 76 doadores de sangue do sudeste Inglês (Reynard *et al.*, 2000).

Scarel-Caminaga *et al.* (2002) analisaram SNP do gene da IL-2 (-330) em população do sudeste do Brasil, predominantemente caucasiana. Os resultados mostraram que a comparação entre os três grupos (controle, periodontite moderada e severa) não houve diferenças significantes entre os genótipos ($p= 0.191$). Porém após análise estatística dos grupos controle e periodontite moderada em relação a periodontite severa, observou-se que indivíduos com genótipo TT pareceram ser 2.5 vezes menos prováveis a desenvolver doença periodontal que pacientes heterozigotos ou com homozigose GG (OR=2.57; 95% IC= 1.15-5.73).

O gene da IL-4 se encontra localizado no braço longo do cromossomo 5, região 5q 31.1, os polimorfismo mais comuns está na posição C-590T e tem sido associados com asma, artrite reumatóide, Doença de Crohn e periodontite crônica (Rosenwasser *et al.*, 1995, Takabayashi *et al.*, 1999, Aithal *et al.*, 2001, Moreno *et al.*, 2006, Scarel-Caminaga *et al.*, 2003). Este SNP tem mostrado aumentar a função do gene e está associado a níveis elevados de IgE em famílias asmáticas (Noguchi *et al.*, 1998).

A IL-4 inibe a persistência de macrófagos e diminui a ação dos receptores CD4 em lesões periodontais, este último é um dos maiores receptores periodontopatogênicos de lipopolissacarídeos presente na membrana de bactérias com *Porphyromona gingivalis*, causando conseqüentemente a diminuição da destruição dos tecidos periodontais (Lauener *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1996).

A IL-4 suprime a síntese de citocina pró-inflamatória, incluindo IL-1 e TNF α que induzem vários eventos associados a inflamação, destruição tecidual, reabsorção óssea e produção de matriz metaloproteinase PGE₂. Portanto, a falta de IL-4 pode aumentar a susceptibilidade a periodontite (Shapira *et al.*, 1992). Em concordância com esses achados, Scarel-Caminaga *et al.* (2003) propuseram que a ausência local da IL-4 aumentaria a atividade da periodontite crônica.

Em 2003, Kang *et al.* investigaram a relação do polimorfismo no gene IL-4 em 32 adultos coreanos com periodontite e 150 controles. Os resultados não mostraram diferenças significativas na distribuição dos alelos, genótipos e haplótipos entre casos e controle. Os autores sugerem que o gene IL-4 contribui de forma restrita na suscetibilidade inter-individual de adultos portadores desta doença.

Hooshmand *et al.* (2008) avaliaram a possível correlação entre IL-4 (C-590T) e IFN- γ (G5644A) com a susceptibilidade à periodontite em 109 Iranianos, porém seus resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre alelos e genótipos entre casos e controles.

Holla *et al.* (2008) testaram a distribuição de alelos, genótipos e haplótipos no gene da IL-4 entre pacientes com periodontite crônica e controles na população da República

Tcheca. Os resultados não mostraram nenhuma diferença significativa entre casos e controles, porém o haplótipo T(-590) foi significativamente mais freqüente em portadores de periodontite crônica que controles (17% X 11%; risco relativo:1,85%). Os autores sugerem que a alta produção do haplótipo T no gene IL-4 está associada com aumento do risco a periodontite nesta população.

Gonzales *et al.* (2007) avaliaram SNP na região promotora da IL-4 em 58 pacientes com periodontite agressiva. Os resultados mostraram frequência alélica uniformemente distribuída, porém diferenças entre os genótipos entre caso e controle. Houve alta frequência do genótipo IL-4 -590T/T e IL-4 -34T/T em pacientes com periodontite agressiva quando foi comparado com o grupo controle. Os autores afirmam que é necessário futuras pesquisa para provar esta associação do SNP com a periodontite agressiva.

Michel *et al.* (2001) investigaram a relação entre o polimorfismo da IL-4 (-590T/C) e os níveis séricos de IL-4 em controles e portadores de periodontite precoce. No grupo com DP 27.8% dos pacientes apresentaram genótipo -590T/T (SNP positivo). Os pacientes com periodontite foram distribuídos em subgrupos: SNP negativo e SNP positivo. Os níveis de IL-4 foram mensurados em toda amostra e observaram que indivíduos SNP positivo portadores de periodontite apresentaram níveis de IL-4 tão reduzidos que o teste Elisa não pôde detectar e quantificá-los. No grupo controle e o subgrupo SNP negativo apresentaram níveis séricos de 1 pg /ml e 1.2 pg /ml, respectivamente. Os autores concluíram que o genótipo -590T/T contribui na redução dos níveis de IL-4 ($p < 0.01$), predispondo um aumento da suscetibilidade à periodontite precoce.

Poucos estudos foram realizados sobre o polimorfismo dos genes das IL-2 e IL-4, logo uma avaliação mais profunda se faz necessário para analisar a influência dessas interleucinas na progressão da periodontite crônica da nossa população.

2 OBJETIVOS

- ◆ Avaliar a frequência dos polimorfismos nos genes da IL-2 (G-330T) e IL-4 (C-590T) em pacientes portadores de periodontite crônica e comparar o padrão de distribuição destes polimorfismos entre os pacientes portadores de periodontite crônica e grupo controle.

- ◆ Investigar parâmetros clínicos da cavidade oral, através da mensuração do Índice de placa bacteriana, Índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem periodontal e perda de inserção clínica em ambos os grupos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi preenchida uma ficha clínica mediante o consentimento dos pacientes, através de assinatura do Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa (em anexo), conforme orientação Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA. Os dados da ficha foram coletados através de perguntas diretas ao paciente e por meio de exame clínico. A ficha foi preenchida por um auxiliar devidamente orientado.

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Um estudo comparativo (caso-controle) foi desenvolvido com pacientes 119 indivíduos de ambos os sexos (40.33 ± 0.5), com idade superior a 22 anos (45.21 ± 10.8), selecionados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFPA.

Para minimizar a influência de outros fatores de risco ambientais e sistêmicos, foram excluídos da pesquisa: diabéticos, fumantes, portadores de osteoporose, pacientes imunodeprimidos, grávidas, pacientes que fizeram uso de antibióticos um mês prévio e paciente com alteração sistêmica que comprometa a função imunológica.

O diagnóstico e classificação da doença periodontal foram realizados através da mensuração do Índice de placa bacteriana, Índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem periodontal (sonda periodontal de Williams- Hu-Friedy[®], EUA) e perda de

inserção clínica. A amostra foi distribuída em dois grupos: (1) grupo controle, com 68 pacientes sem sangramento gengival e nenhum dente com profundidade de sondagem superior a 3 mm (2) grupo com periodontite crônica, 51 pacientes com dentes exibindo perda de inserção clínica superior a 5 mm em pelo menos 6 áreas, presença de sangramento e inflamação no tecido gengival.

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL

Foi coletado 5ml de sangue através de punção venosa. Este material foi armazenado em tubos de ensaio com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e levados à temperatura de -20° C no freezer do Laboratório de Citogenética Humana na UFPA, para posterior extração do DNA.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O material genético foi extraído a partir da fração celular pelo método convencional com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, conforme Sambrook *et al.* (1989).

Após a separação das três camadas, eritrocitária, leucocitária e plasmática, o sangue foi processado para as primeiras etapas da extração que se refere à lavagem com PBS (tampão fosfato salino), NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 5,4 M; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 8,4, sendo proporcionalmente duas partes de tampão para uma parte da camada celular, agitando a mistura suavemente. Em seguida o material foi centrifugado a 4.000 r.p.m por 10 minutos.

Após desprezar o sobrenadante (solução + restos orgânicos indesejáveis) foram adicionados 5 ml solução de lise celular (NaCl 0,3 M; EDTA 100 mM com pH 7,5 e uréia 7,0 M) para promover a ruptura dos leucócitos. Essa solução foi homogeneizada e a ela foi adicionado 500 µL de dodecilsulfato de sódio a 20%, incubando a solução em banho-maria a 37°C por 16 horas.

Após a retirada do material do banho-maria foi adicionado 5 ml de fenol-clorofórmio (1:1), agitando a mistura suavemente por 10 minutos e, posteriormente, foi centrifugada a 4.000 r.p.m. pelo mesmo tempo. A primeira fase foi transferida para outro tubo e "lavada" mais uma vez com a solução de fenol-clorofórmio.

O sobrenadante obtido foi adicionado a uma solução de clorofórmio-isopropanol (24:1), homogeneizado por 10 minutos e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O procedimento foi repetido por mais uma vez.

Após o tratamento com clorofórmio-isopropanol foi transferida a primeira fase para outro tubo, adicionando apenas 10% do volume do DNA obtido a uma solução de acetato de sódio a 3,0 M (pH: 5,2). Esta solução precipitou o DNA juntamente com Etanol absoluto gelado 2,5 vezes o volume da mistura, agitou-se suavemente até o momento em que foi observada a precipitação de DNA. Este precipitado foi diluído em água deionizada estéril agitando-se até a completa diluição do material. O material extraído foi deixado em temperatura ambiente por 4 a 6 horas para completa diluição.

Após a extração foi processada a quantificação do DNA, realizada no espectrofotômetro *Bio Photometer* da Eppendorf, na faixa de leitura de 260nm. O DNA após o processo de quantificação foi diluído para 100 ng/µl.

O DNA obtido foi liofilizado em tubos eppendorf e acondicionados a temperatura ambiente para posterior envio para o laboratório Dr. Frank Roberts na Universidade de Washington- EUA.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para a análise dos segmentos estudados foi empregada a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) que usa iniciadores ou iniciadores específicos para cada gene estudado.

As reações de amplificação das regiões analisadas foram otimizadas para um volume final de 25 μ L, uma alíquota de 0.125 μ L de Taq DNA Polimerase, 1.5 μ L de 50mM MgCl₂, 2.5 μ L de 10X PCR Buffer-Mg Cl₂, 0.5 dNTP 10mM, 0.5 de cada primer e 2.5 μ L do DNA extraído, os reagentes eram da Invitrogen[®] (Califórnia, EUA). Os reagentes foram incubados em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf[®], Alemanha) sob o seguinte parâmetro: denaturação inicial por 2 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (denaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 2 minutos (extensão) seguidos de 72°C por 5 minutos (extensão final). Os segmentos dos iniciadores estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 4: Iniciadores que foram utilizados na reação em cadeia da polimerase.

<i>SNP</i>	<i>Seqüência Específicas de Iniciadores</i>
IL-2	5` TAT TCA CAT GTT CAG TGT AGT TCT 3` (<i>FORWARD</i>)

-330 T/G 5` CAT TGT GGC AGG AGT TGA GGT 3` (*REVERSE*)

IL-4 5` TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT 3` (*FORWARD*)

-590 T/C 5` TGG GGA AAG ATA GAC TAA TA 3` (*REVERSE*)

Com o auxílio do termociclador, a técnica de PCR foi utilizada para a amplificação de fragmentos específicos dos genes da IL-2 e IL-4. Em seguida, a amostra foi submetida à eletroforese em géis verticais de agarose a 2 % sob corrente elétrica de 150 v e 400 mA por 45 minutos. Posteriormente, os géis foram corados por brometo de etídio possibilitando as análises que foram realizadas mediante comparação com padrão de massa molecular. Após a confirmação do comprimento das bandas de DNA (IL-2: 249pb, IL4 188pb) realizamos o sequenciamento do DNA através de capilares de eletroforese pela ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*[®], EUA).

3.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA

O DNA purificado foi sequenciado pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard* (*Applied Biosystems*[®]) e os mesmos iniciadores da PCR. A reação foi diluída em 10 µL de água; contendo 2 µL de 5x Buffer, 1.2 µL de H₂O, 0.8 µL de primer a 10 µM e uma alíquota de 1µL de *Big Dye*. O volume total de 15 µL foram incubados em termociclador e submetidos a 25 ciclos sob o seguinte parâmetro 96°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min.

Após o término dos ciclos, a temperatura se estabilizou em 4°C, e a amostra foi imediatamente purificada. Para isso, adicionou-se 26 µl de etanol a 95% ao produto da reação de sequenciamento.

A solução, após homogeneizada brevemente por vórtex, foi incubada à temperatura de -20°C por 15 min; e então centrifugada por 30 min a 3.000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 125 µl de etanol a 70%. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m., e o sobrenadante completamente descartado e submetido a centrifugação da placa invertida por 1 min a 700 r.p.m. Deixamos os precipitados de DNA purificado secar por 5 min e a ele foi adicionado 10 µl de água para iniciar o sequenciamento do DNA através de capilares de eletroforese.

As amostras sequenciadas foram submetidas à eletroforese no ABI PRISM 3100 *Genetic Analyser*. Como resultado, obtemos as seqüências na forma de cromatografia visualizadas pelo 3100 *data collection software, version 1.1*.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste t de Student para analisar a diferença entre os parâmetros periodontais entre casos e controles. A distribuição dos alelos, genótipos e haplótipos foram analisadas pelo teste qui-quadrado. O risco à doença associado a alelos ou genótipos foi calculado por níveis proporcionais com intervalo de confiança de 95%. E também o teste Wilcoxon (Mann-Whitney) foi empregado para comparar as diferenças entre os

polimorfismos dos genes IL-2 e IL-4 no grupo controle e no grupo com periodontite crônica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, de natureza crônica e sua patogênese consiste de uma complexa interação entre o biofilme dental, resposta do hospedeiro modificada por fatores ambientais, podendo ser influenciada por uma variedade de genes que determinam diferentes aspectos da patologia da doença. Citocinas podem representar um fator de risco, embora haja controvérsias, alguns polimorfismos nos genes das interleucinas influenciam a susceptibilidade e progressão da DP.

O biofilme dental é uma condição necessária para que a DP se desenvolva, embora a quantidade e as espécies bacterianas não sejam suficientes para explicar o complexo processo desta doença (Kornman *et al.*, 1997). Quadros graves de DP podem ocorrer na ausência de biofilme dental expressivo, sugerindo uma resposta inflamatória exagerada do indivíduo (Reinhardt *et al.*, 1993) o que indica uma contribuição importante da resposta do hospedeiro em relação à patogênese da DP (Page 1999; Kornman & Løe, 2000).

Diferentes estudos têm demonstrado que fatores genéticos podem influenciar a severidade e progressão da periodontite. (Hart & Kornman, 1997; Tabor *et al.*, 2002; Sáxén & Nevalinna, 1984; Michalowicz *et al.* 1991; González *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2000; Yoshie *et al.*, 2007; Papapanou *et al.*, 2001; Trevilatto *et al.*, 2002). Demonstrou-se que polimorfismos nos genes da IL-1 (Kornman *et al.*, 1997), TNF α (Endo *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003), TNF β (Fassmann *et al.*, 2003; Galbraith *et al.*, 1998), IL-6 (Trevillato *et*

al., 2003), IL-10 (Scarel-Caminaga *et al.*, 2004) estão associados com um aumento no risco a periodontite crônica.

O presente estudo analisou dois polimorfismos na região promotora dos genes IL-2 e IL-4 em população não-fumante no estado do Pará, sendo que somente o gene da IL-4 foi considerado um fator de risco genético na progressão da periodontite crônica.

Em relação ao polimorfismo IL-2 G-330T, foram encontrados no grupo com periodontite crônica 4 (8.5%) homozigotos para o alelo G, 26 (54%) homozigotos para o alelo T e 18 (37.5%) heterozigotos GT. No grupo controle foi encontrado 7 (16%) homozigotos para o alelo G, 23 (52%) para o alelo T e 14 (32%) heterozigotos GT. Apenas o grupo caso se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0.12$; $p = 0.73$; $GL = 1$ e $\chi^2 = 3.89$; $p = 0.048$; $GL = 1$), respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre casos e controle em relação à frequência do alelo e a do genótipo na IL-2 ($p = 0.74$) e periodontite crônica.

Estes achados estão em concordância com o trabalho de Scarel-Caminaga (2002), inclusive as frequências encontradas no presente trabalho foram bem próximas aos valores de Scarel-Caminaga; grupo controle (4% GG, 59% TT, 36% GT) e grupo com periodontite moderada (4% GG, 67% TT, 29% GT). Entretanto, evidências indicam que IL-2 pode ser um fator relevante na patogênese da periodontite crônica segundo achados de McFarlane & Meikle, 1991 e John *et al*, 1998.

Para o polimorfismo IL-4 C-590T foram observados no grupo com DP 19 (39%) homozigotos para o alelo C, 10 (20%) para o alelo T e 20 (41%) heterozigotos CT. No grupo controle foi encontrado 11 (24%) homozigotos para o alelo C, 19 (41%) para o

alelo T e 16 (35%) heterozigotos CT. Os grupos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1.7$, $p = 0.19$, $GL = 1$ e $\chi^2 = 3.7$, $p = 0.054$, $GL = 1$). As frequências obtidas nos dois grupos são estatisticamente significantes ($p = 0.013$), sugerindo que há uma relação entre o gene da IL-4 e a periodontite crônica na população estudada.

A frequência de muitos alelos varia entre os grupos étnicos, e muitos estudos têm mostrado resultados contraditórios quando são feitas comparações entre populações distintas (Papapanou *et al.*, 2001; Soga *et al.*, 2003). Múltiplos genes podem influenciar a susceptibilidade ou severidade à DP (Soga *et al.*, 2003). A presença do gene polimórfico pode aumentar ou diminuir o risco de uma população desenvolver o fenótipo para a doença.

O genótipo para diversas interleucinas pode influenciar diretamente na patogênese da periodontite (Michalowicz, 1994; Reynard *et al.*, 2000). No entanto, os autores não são unânimes em suportar uma relação positiva entre a composição genotípica e a suscetibilidade ou severidade à DP (Gonzales *et al.*, 2004). Talvez isso ocorra porque muitos dos polimorfismos podem depender da presença de outros genes polimórficos ou de fatores ambientais para manifestar uma contribuição no risco para desenvolver a doença (Gonzales *et al.*, 2004).

A distribuição dos alelos e genótipos do presente estudo está apresentada nos gráficos 1 e 2. O haplótipo mais freqüente no gene IL-4, grupo controle, foi T(-590) e genótipo 590 T/T foram significativamente mais freqüentes no grupo controle (risco relativo 0.5). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e periodontite crônica ($p < 0.01$) mostrando que a alta produção de haplótipo (T) em IL-4 está associada à diminuição do risco ao desenvolvimento da periodontite crônica.

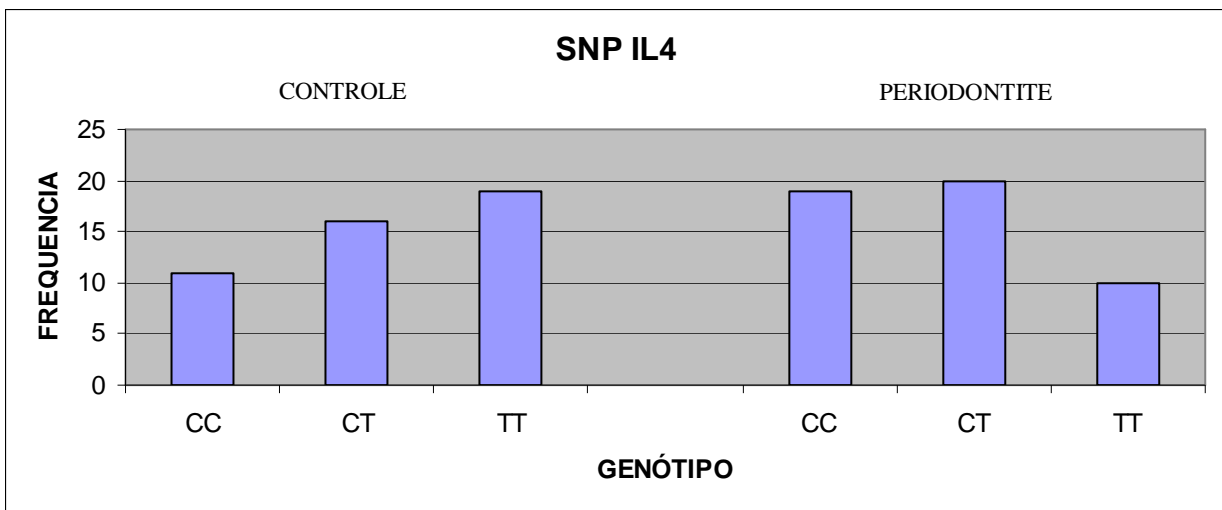
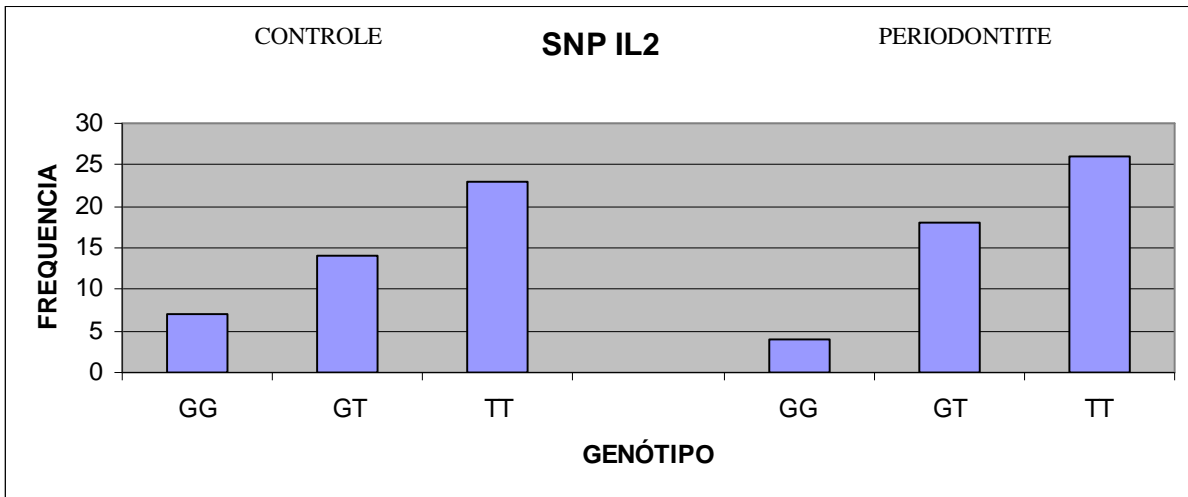


Figura 5: Padrões polimórficos dos genes (IL-2 e IL-4, respectivamente) em controle e portadores de periodontite crônica.

O polimorfismo no gene da IL-4 (-590) sugere um papel dessa citocina na patogênese da DP ($p= 0.0037$). A frequência do polimorfismo do alelo T do gene IL-4 na posição -590 esteve significativamente diminuída em pacientes com periodontite quando

comparados com o grupo controle. O genótipo -590 T/T foi mais freqüente em pacientes sem periodontite (risco relativo 0.5).

As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na tabela 5, os valores obtidos mostram que o grupo controle apresentou uma média dos parâmetros periodontais inferior ao grupo dos pacientes com periodontite crônica. As diferenças entre caso e controle estão de acordo com os resultados esperados.

Tabela 5. Características clínicas, idade e gênero nos grupos com periodontite e controle.

Características	Controle (n=68)	Periodontite (n=51)
Idade (anos)	41.73 ± 11.17	49.86 ± 8.52
Gênero (%)	36.76 ± 0.48	45.09 ± 0.50
Índice de Placa (%)	39.98 ± 0.19	80.01 ± 0.20
Índice de Sangramento (%)	11.39 ± 0.11	60.84 ± 0.28
Profundidade de Sondagem (mm)	1.39 ± 0.20	3.03 ± 0.84
Perda de Inserção (mm)	1.43 ± 0.21	4.05 ± 1.44

A comparação da média da idade, índice de placa, índice de sangramento, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica revelou não ser estatisticamente diferente entre casos e controles ($p < 0.01$). No entanto, quando analisamos o gênero entre os dois grupos observamos que a média de homens é significativamente menor ($p = 0.18$) no grupo controle que nos portadores de periodontite crônica (36.76 ± 0.48 ; 45.09 ± 0.50 , respectivamente).

Apenas poucos estudos avaliaram o polimorfismo da IL-4 no promotor -590C/T, Scarel-Caminaga *et al.* (2003) avaliaram o SNP em pacientes brasileiros com periodontite crônica, mas não observaram nenhuma diferença estatisticamente significativa em alelos ou genótipo em relação à doença. Achados similares, como os de Kang *et al.* (2003), Hooshmand *et al.* (2008) e Holla *et al.* (2008) não encontraram correlação entre o risco de desenvolver periodontite com o polimorfismo deste promotor em populações coreanas, iranianas, turcas e tchecas, respectivamente. No entanto, Gonzáles *et al.* (2007) e Michel *et al.* (2001) investigaram a relação entre -590C/T e a periodontite agressiva, observando que os genótipos estavam significativamente associados com a DP.

O polimorfismo do gene IL-2 demonstrou distribuição uniforme entre casos e controles. A falta de associação indica que mutações polimórficas ocorridas neste gene não apresentaram relação com a DP, sugerindo que esse polimorfismo não é um marcador de risco quanto à susceptibilidade a periodontite crônica na população estudada.

Achados negativos não excluem a possibilidade de que o gene IL-2 possa estar envolvido com a patogênese da periodontite crônica. Contudo, mais estudos com diferentes origens étnicas também precisam ser realizados para elucidar o papel das interleucinas e outros genes envolvidos na susceptibilidade e na patogênese da doença periodontal.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Os polimorfismos nos genes da IL-2 (G-330T) não demonstraram ser um bom marcador para periodontite crônica na população do Estado do Pará.
- Estudos dos polimorfismos nos genes da IL-4 (C-590T) sugerem uma diminuição do risco a periodontite para portadores do genótipo -590 T/T, podendo ser um marcador de risco quanto a susceptibilidade a periodontite crônica na população estudada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

Abbas KA, Litchman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e molecular*. Livraria e Editora 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;**25**:229-35.

Aithal GP, Day, CP, Leathart J, Daly AK, Hudson M. Association of single polymorphism in the interleukin-4 receptor gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes and Immunity* 2001;**2**:44-47.

Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000* 2002;**29**:7-10.

Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000* 2002;**29**:31-69.

Amar S, Chung KM. Influence of hormonal variation on the periodonto in women. *Periodontol. 2000* 1994;**6**:79-87.

Araújo MVA. Estudo das condições de saúde bucal e necessidades de tratamento em pacientes do curso de Odontologia da Universidade Federal do Pará. São Paulo, SP. Universidade de São Paulo, 2003, 109p. Dissertação.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and antagonist inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;**160**:403-409.

Bergstrom J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1989;**17**:245-247.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Anatomia Embriologia e Histologia Bucal*. 3ed. São Paulo: Artmed, 2004.

Brecx MC, Gautschi M, Gehr P, Lang NP. Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingival. *J Period Res* 1987;**22**:468-472.

Brown I, Løe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000* 1993;**2**:57-71.

Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. A family of small inducible proteins secreted by leucocytes are members of a new superfamily that includes leucocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol* 1989;**142**:679-687.

Brown, L. J. Periodontal status of US employed adults in 1985-1986. *JADA* 1990;**121**:226-232.

Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 1987;**166**:1229-1244.

Clarke NG, Hirsch RS. Personal risk factor for generalized periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995;**22**:136-145.

Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW, Mosmann TR. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunological Reviews* 1988;**102**:5-38.

Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a Theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation. *Science* 1997;**278**:1580-1581.

Collins FS, McKusick VA. Implications of the human genome project for medical science. *J Amer Med Assoc* 2001;**285**:540-544.

Collins FS. Of Needles and Haystacks: Finding Human Disease Genes by Positional Cloning. *Clin Res* 1991;**39**:615-623.

Collison LW, Vignali DAA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev* 2008;**226**:248-262.

Croucher R, Marcenes WS, Torres MC, Hughes F, Sheiham A. The relationship between life-events and periodontitis. A case-control study. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:39-43.

Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy Mj, Seymour GJ, Middleton PG, Taylor JJ. Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. *J Period Res* 2001;**43**:328-333.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) (TES) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type I T helper or type 2 T helper) profiles of cytokine production. *J Clin Invest* 1991;**88**:346-350.

Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, Schenkein HA, Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphism with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999;**70**:48-430.

Endo M, Thai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Analysis of single polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001;**72**:1554-1559.

Essner R, Rhoades K, McBride WH, Morton DL, Exonomou JS. IL-4 downregulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol* 1989;**142**:3857-3861.

Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252 lymphotoxin-alpha and the -308 tumor necrosis factor alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol Res* 2003;**38**:394-399.

Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta E.S. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T Helper 1 and T Helper 2 cells. *J Exp Med* 1988;**168**:543-558.

Fraser DA, Loos BG, Boman U, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Schenck K, Dembic Z. Polymorphisms in an interferon-gamma receptor-1 gene marker and susceptibility to periodontitis. *Acta Odontol Scand* 2003;**61**:297-302.

Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW, Yamamoto M, McGhee JR, Mestecky J, et al. Cytokine and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell response in chronic inflamed gingival tissues. *J Periodontol* 1993;**64**:400-406.

Gajewski TF, Fitch FW. The proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;**140**:4245-4252.

Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: Influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998;**69**:428-433.

Genco RJ, Slots J. Host response in periodontal disease. *J Dent Res* 1984;**63**:441-451.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996;**67**:23-29.

Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS *et al.* Doxycycline inhibits neutrophil (PMN) type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995; **22**:100-109.

Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:384-389.

Gonzales JR, Mann M, Stelzig J, Bödeker RH, Meyle J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;**34**:473-479.

González CA, Sal N, Capellá G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *International Journal of Cancer* 2002;**100**:249-260.

Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;**25**:781-785.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1994;**65**:260-267.

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

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;**5**:78-111.

Hart CT, Kornman K. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;**14**:202-215.

Hart PH. Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α , interleukin 1 and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:3803-3807.

Hart TC. Genetic considerations of risk in human periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1994:3-11.

Hauser SL. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. *Annals of Neurology* 1995;**38**:702-704.

Holla LI, Fassmann A, Augustin P, Halabala, Znojil V, Vanek J. The association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol* 2008;**79**:1927-1933.

Hollá LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphism in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;**75**:30-36.

Hooshmand B, Hajilooi M, Rafiei A, Mani-Kashani KH, Ghasemi R. Interleukin-4 and interferon gene polymorphism in patients with periodontitis. *J Periodontol Res* 2008;**43**:111-115.

Houri-Haddad Y, Itzhaki O, Ben-Nathan D, Shapira L. The effect of chronic emotional stress on the humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol Res* 2003;**38**:204-209.

Hugoson A, Ljungquist B, Breivik T. The relationship of some negative events and physiological factors to periodontal disease in an adult Swedish population 50 to 80 years of age. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:247-253.

Hyypä T. Gingival IgE and histamine concentrations in patients with asthma and in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 1984;**11**:132-137.

Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *J Periodontol* 1991;**62**:185-189.

Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 1999;**67**: 2125-2130.

John S, Turner D, Donn R, Sinnot P, Worthington J, Ollier WER, Hutchinson IV ; Hajeer AH. Two novel biallelic polymorphism in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenet* 1998;**25**:419-420.

Kang BY, Choi YK, Choi WH, Kim KT, Choi SS, Kim K, Ha NJ. Two polymorphisms of interleukin-4 gene in Korean adult periodontitis. *Arch Pharm Res* 2003;**26**:482-486.

Kara N, Keles GC, Sumer P, Gunes SO, Bagci H, Koprulu H, Bek Y. Association of the polymorphisms in promoter and intron regions of the interleukin-4 gene with chronic periodontitis in a Turkish population. [*Acta Odontol Scand.*](#) 2007;**65**:292-297.

Katsura, Y. Cell-mediated and humoral immune responses in mice.III. Dynamic balance between delayed-type hypersensitivity and antibody response. *Immunol* 1977;**32**:227-235.

Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:9090-9095.

Komatsu Y, Tai H, Galicia JC, Shimada Y, Endo M., Akazawa K, Yamazaki K, Yoshie H. Interleukin-6 -373 A9t11 allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue Antigens* 2005;**65**:110-114.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:72-77.

Kornman KS, Löe H. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000;**2**:83–97.

Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics* 1997;**17**:21-24.

Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol* 1990;**17**:714:721.

Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 downregulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1990;**20**:2375-2381.

Le Gros S, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro-IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;**172**:921-929.

Lindhe GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1996;**23**:675-680.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontia clínica e implantologia oral*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol* 1980;**51**:264–9.

Listgarten MA, Ellegaard B. Experimental gingivitis in monkey. Relationship of leucocyte in junctional epithelium, sulcus depth and connective tissue inflammation scores. *J Period Res* 1973;**8**:199-214.

Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 1994;**5**:52-65.

Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32**:159-179.

Lopes FF, Loureiro FHF, Pereira AFV, Pereira ALA, Alves CMC. Associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008; **30**:379-83.

Machuca G, Khoshfeiz O, Lacalle JR, Machuca C, Bullón P. The influence of general health and social-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *J Periodontol*. 1999;**70**:779-785.

Manson JD, Eley BM. *Manual de Periodontia*. 3ed. São Paulo: Santos, 1999.

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**:623-630.

McFarlane CG, Meikle M. Interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are elevated in the sera of patients with periodontal disease. *J Periodontol Res* 1992;**26**:402-408.

McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and II-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999;**70**:49-54.

Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent* 2000;**21**:943-946.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989;**339**:27-30.

Michalowicz B. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;**65**:479-488.

Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ, Pihlstrom BL. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;**62**:293-299.

Michalowicz, BS, Dieh SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;**71**:1699-1707.

Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diete A, Herrman JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphism in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:483-488.

Modlin RL, Nutman TB. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr Opin Immunol* 1993;**5**:511-517.

Moreno O, Gonzalez CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martin J, Ramirez G. Polymorphism in the IL4 and IL4R Genes in Colombian patients with Rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006;**34**:36-42.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;**136**:2348-2357.

Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989;**46**:111-147.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;**17**:138-146.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, Kawashima T, Yanagi H, Matsui A, Hamaguchi H. Association of asthma and interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998;**28**:449-453.

O'Leary T J, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;**43**:38-42.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;**9**:248-266.

Oliver RC, Tervonen T. Diabetes- A risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol* 1994;**65**:530-538.

Ollier WE. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 2004;**28**:174-178.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis : summary of developments, clinical implication and future directions. *Periodontol 2000* 1997;**14**:216-248.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976;**34**:235-249.

Page RC, Sturdivan EC. Noninflammatory destructive periodontal disease (NDPD). *Periodontol 2000* 2002;**30**:24-39.

Page RC. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontol Res* 1999;**34**:331-339.

Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlen G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J Clin Periodontol* 2001;**28**:389-396.

Papapanou PN, Tonetti, MS. Diagnóstico e Epidemiologia das Lesões Ósseas Periodontais. *Periodontol* 2000;**4**:8-21.

Parish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant Rev* 1972;**13**:35-65.

Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Immunology* 1993;**23**:224-231.

Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Sem Immunol* 2001;**13**:219-227.

Reinhardt RA, Bolton RW, McDonald TL, DuBois LM, Kaldahl WB. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol* 1988;**59**:656-70.

Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, Dubois LM, Kornmas KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;**20**:225-231.

Reinhardt RA, McDonald TL, Bolton RW, DuBois LM, Kaldahl WB. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol* 1989;**60**:44-50.

Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of the tumor necrosis factor- α , interleukin-10, interferon and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. *Eur J Immunogenetics* 2000;**27**:241.

Ries WL, Seeds MC, Key LL. Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity: increased acid production and radioactive calcium release. *J Periodontal Res* 1989;**24**:242-246.

Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. *Critical Reviews in Immunology* 1994;**14**:239-292.

Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback J, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, Borish L. Promoter polymorphism in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allerg* 1995;**25**:74-78.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor press, 1989.

Sasaki H, Hou L, Melani A. *et al.* IL-10, but not IL-4 suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol* 2000;**165**:3626-3630.

Sáxén L, Nevallina HR. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genet* 1984;**63**:32-335.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RP, Camargo LEA, Line SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphism are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:443-448.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RP, Camargo LEA, Line SRP. Investigation of the IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol* 2003;**30**:341-345.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RP, Line SRP. S.R.P.; Investigation of the IL2 gene polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:587-591.

Schenkein HA, Gunsolley JC, Koertge TC *et al.* Smoking and its effects on early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1995;**126**:1107-1113.

Seymour GJ, Cole KL, Powell RN, Lewins E, Cripps AW, Clancy RL. Interleukin-2 production and bone-resorption activity in vitro by stimulated lymphocytes extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *Arch Oral Biol* 1985;**30**:481-484.

Shapira L, Van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses* 1992;**39**:319-322.

Shimada Y, Tai H, Galicia JC, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K. Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;**31**:43-469.

Silva TT, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases : Apical and Periodontal Disease. *J Dent Res* 2007;**86**:306-319.

Sim E. Humoral Factors. *The natural immune system*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 1993.

Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;**139**:10-17.

Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor alpha gene -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:524-531.

Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingival, sulcular fluid and polymorphnucleares leukocytes. *J Perio Res* 1988;**23**:386-393.

Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Line SR. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:154-158.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;**145**:3796-3806.

Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex Genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 2002;**3**:391-397.

Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Kusuhara K, Nishima S, Hara T. Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene. *J Human Genetic* 1999;**44**:352-353.

Takahashi S, Noji S, Nishimura E. Unique intronic variations of HLA-DQB gene in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1997;**66**:379-386.

Taylor GW, Loesche WJ, Terpenning MS. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996; **67**: 1085-1093.

Tew J, Engel D, Mangan D. Polyclonal T-cell activation in periodontitis. *J Periodont Res* 1989;**24**:225-241.

THE INTERNACIONAL SNP MAP WORKING GROUP. A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms. *Nature* 2001; **409**:928-933.

Tinoco EM, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NM. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazil population. *Eur J Oral Sci* 1997;**105**:9-14.

Tonetti MS, Pini Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette Smoking on periodontal healing following GTR in intrabony defects. A preliminary prospective study. *J Clin Periodontol* 1995;**22**:229-234.

Tonetti MS. Cigarette Smoking and Periodontal Diseases : Etiology and Management of Disease. *Annals of Periodontol* 1998;**3**:88-101.

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2003;**18**:6-9.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian Population. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:438-442.

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado, MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;**29**:233-239.

Tsai IS, Tsai CC, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Change in Gingival Crevicular Fluid Interleukin-4 and Interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med* 2007;**23**:1-7.

Van der Pol WL, Van de Winkel JGJ. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics* 1998;**48**:222-232.

Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S. *et al.* Genetic polymorphism of the IL-1a e IL-1b genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* 2000;**71**:723-728.

Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flubiprofen: A potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science* 1985;**227**:640-642.

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodont Res* 1996;**31**:393-407.

Yamamoto M *et al.* Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases :role of Th1 and Th2 tyoe cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodont Res* 1997;**32** :115-119.

Yamamoto M, Kawabata K, Fujihashi K, McGhee JR, Van Dyke TE, Bamberg TV, Hiroi T, Kiyono H. Absence of exogenous interleukin-4 induced apoptosis of gingival macrphages may contribute to chronic inflammation in periodontal diseases. *Amer J Pathol* 1996;**149**:331-339.

Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:102-132.

Zachariasen RD. The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women Health*. 1993; **20**:21-30.

ANEXOS

FONTES FINANCIADORAS E AVALIAÇÃO ÉTICA

Este projeto teve orçamento aprovado para financiamento pela Fundação Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP/CT-INFRA 0927-03 ref. 01.04.0096.00.

O presente projeto de pesquisa “Avaliação do polimorfismo dos genes IL-2 e IL-4 em pacientes com periodontite crônica no estado do Pará” foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Instituto de Ciências da saúde da Universidade Federal do Pará, sob o protocolo nº 162/07 CEP-ICS/UFGPA. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Citogenética Humana na Universidade Federal do Pará, juntamente com a colaboração da Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFGPA e Universidade de Washington- EUA.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA INTITULADA: “AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DOS GENES IL-2, IL-4 EM PACIENTES COM PERIODONTITE CRÔNICA ATENDIDOS EM BELÉM DO PARÁ”.

Por meio deste eu, _____, idade de _____ anos, RG n.º _____, morador(a) da rua _____, na cidade de _____ autorizo minha participação na pesquisa que será realizada pela cirurgiã-dentista Carolina Haber de Souza, RG n.º 2895863, sob orientação do Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano. Estou consciente de que esta pesquisa tem finalidade de estudo da doença periodontal, clínica e geneticamente, não representando risco a minha integridade física e moral. A minha participação será através do fornecimento de dados referentes a meu estado de saúde, exame clínico da minha boca com procedimentos de sondagem periodontal (medir inflamação gengival) e coleta de 5ml de sangue venoso, o qual será analisado no Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, a fim de avaliar a minha susceptibilidade genética ao desenvolvimento da doença periodontal. A minha privacidade será totalmente preservada quanto à utilização das informações obtidas. Para meu benefício recebi informações sobre a importância dos cuidados com higiene e saúde bucal e tratamento desta doença, é de meu conhecimento que estou participando como voluntário(a), sem receber nenhum ganho financeiro. Fui informado(a) que tenho total liberdade de recusar a participar desta ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo.

Declaro que entendo todos os termos acima expostos e aceito voluntariamente participar deste estudo.

Qualquer dúvida, entrar em contato pelo telefone: (91) 3266-1142 ou (91) 3201-7495

Belém, ____ de _____ de 200__

Pesquisadora

Participante da Pesquisa

Testemunha

Testemunha

FICHA CLÍNICA

DADOS DO PACIENTE – Grupo

Nome:				
Profissão:	Idade:	Gênero:	Etnia:	Estado Civil:
Endereço:				
CEP:	Tel:	Cel.:	e-mail:	

ANÁLISE DA SAÚDE

- Esta ou esteve sob tratamento médico ou cirúrgico? (S) (N) Por que? _____
- Esteve hospitalizado? (S) (N) Motivo? _____
- Sofre de distúrbios cardiovasculares? (S) (N)
 - Alteração de pressão arterial (S) (N)
 - Portador de prótese cardíaca (S) (N)
- Sofre de algum distúrbio sangüíneo? (S) (N)
- Hemorragia (S) (N) Anemia (S) (N)
- Apresenta história de febre reumática? (S) (N)
- Sofre de algum distúrbio gastrointestinal?
 - Gastrite (S) (N) Hepatite (S) (N)
 - Úlcera (S) (N) Cirrose (S) (N)
- Faz uso de alguma medicação ou droga? (S) (N) Qual? _____
- Sofre de algum distúrbio renal? (S) (N)
- Sofre de algum distúrbio neurológico? (S) (N)
 - Convulsão (S) (N) Desmaios (S) (N)
- Teve ou tem alguma doença infecto-contagiosa? (S) (N) Qual? _____
- Está grávida ou amamentando? (S) (N)
- Você é alérgico? (S) (N) A que? _____
- Teve ou tem alguma doença não listada acima que deva ser comunicado? (S) (N)

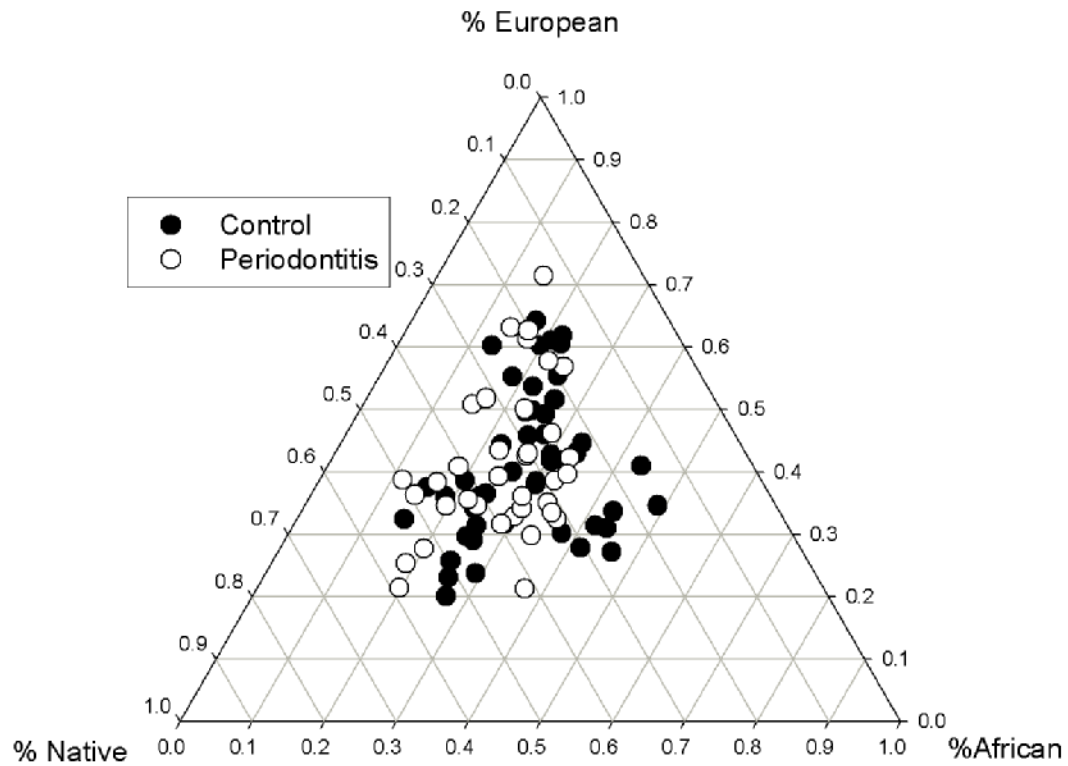
DECLARO QUE AS INFORMAÇÕES DESTE PRONTUÁRIO POR MIM PRESTADAS SÃO VERDADEIRAS .

Belém, _____ de _____ de 200__

Assinatura paciente/ responsável

MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

AFRICANO, INDIGENA, EUROPEIA



Estimativa de mistura interétnica homogênea entre grupo controle e grupo com periodontite crônica do presente estudo.

361

GGATTTACCTACATCCATTCAGTCAGTCTTTGGGGGTTTAAAGAAATTCCAAAGAGTC
A

421 TCAGAA

361

AATACTTTTCAAGTAAACTTTCTTGATATTACTCTATCTTTCCCAGGAGGACTGCATT

421 ACAACAAATTC

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](#)