

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**Flávia Martinez de Carvalho**

**Estudos Genéticos Preliminares de Famílias com Periodontite Agressiva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da UERJ como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia

Orientador: Prof. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

**Rio de Janeiro  
2005**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

C331 Carvalho, Flávia Martinez de.  
Estudos genéticos preliminares de famílias com periodontite  
agressiva / Flávia Martinez de Carvalho. – 2005.  
56 f.

Orientador: Eduardo Muniz Barretto Tinoco.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Periodontite. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Padrões de herança. I.  
Tinoco, Eduardo Muniz Barretto. II. Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU  
616.314

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Flávia Martinez de Carvalho**

**Estudos Genéticos Preliminares de Famílias com Periodontite Agressiva**

**Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2005.**

**Professor:** \_\_\_\_\_

**Ricardo Guimarães Fischer**

**Professor:** \_\_\_\_\_

**Alexandre Rezende Vieira**

**Professor:** \_\_\_\_\_

**Jacyara Maria Brito Macedo**

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã por todo o amor, apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as graças recebidas em toda a minha vida e especialmente por esta etapa tão sonhada.

Ao coordenador do curso Prof. Ricardo Guimarães Fischer e ao Prof. Carlos Marcelo Figueiredo pela oportunidade do curso e pelo carinho com o qual acolheram a turma.

Aos meus colegas de turma pelo companheirismo, trocas de experiências e empenho durante o curso.

A Prof.<sup>a</sup> Maria Eliza Ramos pelos ensinamentos, carinho e incentivo à pesquisa.

Ao Dr. Alexandre Rezende Vieira pela viabilização do projeto.

A Prof.<sup>a</sup> Jacyara Maria Brito Macedo por ter permitido a utilização do Laboratório de Bioquímica da UERJ e pelo carinho que sempre demonstrou.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica da UERJ, em especial a Paula Gonzalez pela paciência e por cada esclarecimento das técnicas empregadas neste trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Denise Gomes da Silva pelo companheirismo e colaboração na parte laboratorial.

A toda minha família, amigos e companheiros de trabalho por cada palavra de incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Em especial ao meu orientador Prof. Eduardo Muniz Barretto Tinoco pela dedicação, carinho, incentivo e por ter acreditado em mim para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram (a) definir o modo de herança da periodontite agressiva nas famílias; (b) testar um método alternativo de coleta de células epiteliais da mucosa oral para a obtenção de ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico e, (c) analisar o DNA de 4 indivíduos destas famílias utilizando um chip para a genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA). Foram selecionadas 5 famílias, totalizando 23 indivíduos examinados. Todos os indivíduos foram avaliados através de um questionário, um exame clínico periodontal, um exame radiográfico e exame laboratorial. Foram coletadas células epiteliais da mucosa oral e 3 mL de sangue venoso para a extração do DNA. As famílias identificadas pelos números 1,3 e 5 tiveram, respectivamente, 1, 2 e 1 dos seus membros genotipados pelo chip. Todos os indivíduos submetidos à genotipagem eram portadores de periodontite agressiva e de etnia afro-brasileira. Os resultados sugerem que o modo de herança da periodontite agressiva nestas famílias é autossômico dominante com penetrância muito alta ou completa; o método alternativo de coleta de células epiteliais da mucosa oral mostrou-se eficaz e menos invasivo. As amostras de DNA extraídas a partir do método alternativo funcionaram satisfatoriamente para a tecnologia do chip, permitindo a genotipagem de mais de 90% dos SNPs. Foram encontrados no cromossomo 1 3 SNPs com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados que diferiam do genótipo de referência ( $p < 0,000005$ ). Estes 3 SNPs estão localizados no intervalo 1q32.2-32.3, onde pode-se observar a presença de 17 genes diferentes que codificam proteínas. Um dos genes pertence à família dos receptores de fator de necrose tumoral (TNF) (TRAF5), e está envolvido no processo inflamatório. Os resultados deste estudo preliminar mostram a utilidade da técnica do chip para a genotipagem de SNPs em indivíduos com doença periodontal.

**Palavras-chaves:** periodontite agressiva, polimorfismo genético, modo de herança, genotipagem.

## ABSTRACT

The aims of this study were: (a) to define the mode of inheritance of aggressive periodontitis in families; (b) to test an alternative method of buccal epithelial cells collection to obtain genomic desoxiribonucleic acid (DNA) and, (c) to analyze the DNA of four subjects of these families using a chip for genotyping single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA). Five families were selected totalizing 23 examined subjects. All subjects were assessed through a questionnaire, a clinical and radiographic periodontal exams and a laboratory exam. Buccal epithelial cells and 3 mL of venous blood were collected to the DNA extraction. The families identified with the numbers 1, 3 and 5 had, respectively, 1, 2 and 1 of their members genotyped by the chip. All the subjects genotyped had aggressive periodontitis and were afro-brazilians. The results suggests that the mode of inheritance of aggressive periodontitis in these families is autossomal dominant with very high or complete penetrance; the alternative method of buccal epithelial cells collection showed to be effective and less invasive. The DNA extracted by the alternative method worked successfully for the technology of the chip allowing the reading of more than 90% of the SNPs. Three SNPs were found in the chromosome 1 with identical heterozygote genotype detected in 4 individuals assessed, who were different from the reference genotype ( $p < 0,000005$ ). These 3 SNPs are localized in the 1q32.2-32.3 interval where the presence of 17 different protein codifying genes can be observed. Interestingly, one of the genes belongs to the family of tumoral necrosis factor (TNF) receptors (TRAF5), and is involved in inflammatory process. The results of this preliminary study show the usefulness of the chip technique for genotyping SNPs in individuals with periodontal disease.

**Key words:** aggressive periodontitis, genetic polymorphism, mode of inheritance, genotyping.



**SUMÁRIO**

RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE QUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1.Evidências do papel da genética na periodontite agressiva .....	4
2.2.Estratégias de estudos em genética .....	5
2.3.Modos de herança .....	8
2.4.Polimorfismos associados a periodontite agressiva .....	12
2.4.1. Polimorfismos da gene da interleucina 1 (IL-1) .....	12
2.4.2. Polimorfismos da gene da interleucina 10 (IL-10) .....	17
2.4.3. Polimorfismos da gene do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	18
2.4.4. Polimorfismos da gene do receptor Fc gama (Fc $\gamma$ R) .....	19
2.4.5. Outros polimorfismos associados a periodontite agressiva .....	21
3. PROPOSIÇÃO .....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1- Amostra .....	25
4.2- Critérios de inclusão e exclusão .....	25
4.3- Aspectos Éticos .....	25
4.4- Coleta de Dados .....	26
4.5- Coleta de Material e Extração de DNA .....	27

4.6- Análises Estatísticas .....	30
5. RESULTADOS .....	31
6. DISCUSSÃO .....	37
7. CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
APÊNDICE A .....	52
ANEXO A .....	56

**LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1:** Dados sobre os cromossomos 1, 8 e 10 ..... 35

**QUADRO 2:** Relação dos genes identificados no intervalo 1q32.2-32.3 .....36

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1:</b> Resumos dos procedimentos do chip .....	29
<b>FIGURA 2:</b> Heredogramas das famílias avaliadas .....	32
<b>FIGURA 3:</b> Eletroforese do gel de agarose do DNA .....	33

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**FcγR** – Receptor Fc gama

**Gm23** – Alelo do locus gama 2 associado com produção elevada de IgG2

**IL-1** – Interleucina 1

**IL-1α** - Interleucina 1 alfa

**IL-1β** - Interleucina 1 beta

**IL-1RA** – Receptor antagonista da interleucina 1

**IL-4** – Interleucina 4

**IL-10** – Interleucina 10

**MMP-1** – Metaloproteinase de matriz 1

**MMP-3** – Metaloproteinase de matriz 3

**NIS** – Nível de inserção a sondagem

**PBS** – Profundidade de bolsa a sondagem

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**RFLP** – Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição

**SNP** – Polimorfismo de um único nucleotídeo

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TNFα** - Fator de necrose tumoral alfa

**TRAF 5** - Gene codificante de proteínas da família dos receptores de TNF

**VDR** – Receptor de vitamina D

**VNTR** – Polimorfismo com tendência a repetição

## 1. INTRODUÇÃO

As periodontites de acometimento precoce (EOP), termo recentemente substituído por periodontites agressivas<sup>4</sup>, são doenças caracterizadas por uma perda de inserção e de osso alveolar localizada ou generalizada, e uma progressão acelerada da doença em jovens<sup>1,11</sup>.

As periodontites agressivas têm uma baixa prevalência na população, variando de 0,1% a 0,3% em países industrializados, podendo chegar a 2% em outros países<sup>3</sup>. Mais recentemente, SUSIN & ALBANDAR<sup>64</sup> encontraram uma prevalência elevada (5,5%) da periodontite agressiva em uma população de adolescentes e adultos jovens no sul do Brasil.

O diagnóstico de periodontite agressiva requer a exclusão de certas doenças sistêmicas e síndromes que alterariam a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro podendo levar a perda precoce dos dentes<sup>4</sup>.

A etiologia das periodontites agressivas envolve complexas interações entre fatores genéticos, microbianos e fatores de risco ambientais locais e sistêmicos modulando o curso imuno-inflamatório da doença. Os resultados de estudos populacionais e de agregação familiar<sup>69</sup> indicam que fatores genéticos parecem ter uma forte influência na suscetibilidade a periodontite agressiva. Sendo assim, tem sido proposto

que os fatores de risco genéticos influenciam o curso da história natural da doença<sup>50</sup>.

A presença de um fator de risco genético aumenta diretamente a probabilidade de desenvolvimento da periodontite; logo, sua ausência, reduz essa possibilidade. Os fatores de risco genéticos são parte da cadeia causal ou expõem o hospedeiro à cadeia causal<sup>40</sup>.

Os polimorfismos genéticos têm sido utilizados como marcadores para localizar genes causadores de doenças através de estudos de ligação e ou de associação<sup>67</sup>. Por definição, um locus polimórfico é um locus cujos alelos ou variantes se encontram de tal forma que a variante mais comum ocorre com uma frequência inferior a 99% na população. Se o locus for bialélico, o alelo raro deve ocorrer com uma frequência maior que 1% na população. Desta forma, quando diferentes alelos de um dado gene coexistem na população, chamamos de polimorfismo genético<sup>59</sup>.

Um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) é uma variação na identidade de um único nucleotídeo em um determinado locus do genoma (locus bialélico). Os SNPs incluem, mas não se limitam a polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), ou seja, as alterações nucleotídicas que criam ou destroem sítios para endonucleases de restrição em uma molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA)<sup>67</sup>. Existem outros tipos de polimorfismos genéticos, porém os SNPs ocorrem mais frequentemente do que qualquer outro; sua frequência no genoma humano é estimada em 1 a cada 300 a 1.000 pares de bases<sup>59</sup>. Os SNPs são facilmente detectados utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Tecnologias mais recentes (rastreamento por chip) têm proporcionado maior praticidade nos processos de

identificação dos SNPs, permitindo uma genotipagem rápida e eficiente de centenas a milhares de SNPs<sup>43, 53</sup>.

Atualmente, existe um número considerável de estudos de associação genética buscando alelos específicos de genes polimórficos de citocinas inflamatórias que poderiam influenciar a progressão da periodontite agressiva. Como na periodontite crônica, os polimorfismos do gene da interleucina 1 (IL-1) têm sido associados com periodontite agressiva<sup>15, 51</sup>. Entretanto, alelos alternativos àqueles associados à periodontite crônica têm sido estudados, além de outros genes como o da interleucina 4 (IL-4)<sup>48, 20</sup>, do receptor FcγR<sup>34, 38</sup>, do fator de necrose tumoral alfa (TNFα)<sup>16</sup>, da interleucina 10 (IL-10)<sup>77, 18</sup>, da metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) e metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3)<sup>33</sup> e do receptor de vitamina D (VDR)<sup>28</sup>.

Vários polimorfismos em genes, principalmente aqueles envolvidos na resposta imunológica-inflamatória do hospedeiro têm sido explorados, conforme podemos observar através dos estudos descritos anteriormente. Os estudos indicam que alguns polimorfismos parecem estar associados a periodontite agressiva em certos grupos étnicos. Entretanto, vários estudos com indivíduos pertencentes ao mesmo grupo étnico, freqüentemente não alcançam resultados consistentes. Além disso, existem poucos estudos de análise dos haplótipos e das interações entre genes. Portanto, até o



momento, nenhum fator de risco genético específico para a periodontite agressiva tem sido identificado de forma conclusiva<sup>40</sup>.

Os objetivos desta tese foram a partir da identificação de famílias com periodontite agressiva, definir o modo de herança da doença nestas famílias para a realização de futuros estudos moleculares. Também foi testado um método alternativo de coleta de células epiteliais da mucosa oral para a posterior extração do DNA. Além disso, tais amostras de DNA de alguns indivíduos destas famílias foram testadas através do uso de um chip para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 – Evidências do papel da genética na periodontite agressiva**

Vários estudos têm sugerido que a periodontite tem uma base genética<sup>25, 26, 39</sup>. Os resultados de um estudo em gêmeos indicaram que entre 38% e 82% da variância populacional das medidas clínicas da periodontite devem ser atribuídas a fatores genéticos<sup>45</sup>.

Mais recentemente, MICHALOWICZ et al.<sup>47</sup> analisaram 117 pares de adultos gêmeos e estimaram que a periodontite crônica tem aproximadamente 50% de hereditariedade, fato que permaneceu inalterado após os ajustes de variáveis relativas ao comportamento, incluindo o fumo.

Não só os dados acima mostram o papel dos fatores genéticos na periodontite crônica, mas também outros estudos sugerem que os fatores genéticos devem exercer uma função importante na patogênese das formas agressivas da periodontite<sup>46</sup>.

Uma variedade de desenhos de estudo tem sido utilizada para estudar o efeito dos fatores de risco genéticos na patogênese da periodontite agressiva<sup>44, 63, 8, 42</sup>.

Resumidamente, foi reconhecido a partir de estudos em famílias que os irmãos de pacientes com periodontite agressiva frequentemente também apresentam periodontite; e foi sugerido também que o modo mais provável de herança seria autossômico dominante com diferentes variações de penetrância dependendo da população, sendo de 73% em caucasianos e 70% em afro-americanos<sup>42</sup>. Anteriormente, MELNICK et al.<sup>44</sup> e SPEKTOR et al.<sup>63</sup> haviam sugerido que a periodontite agressiva parecia ser herdada como uma doença ligada ao X dominante, e BOUGHMAN et al.<sup>8</sup> mostrou que se tratava de uma doença autossômica recessiva. As inconsistências dos resultados acima são atribuídas aos diferentes métodos de diagnóstico e classificação da doença<sup>2</sup>.

Recentemente, os estudos em genética buscam a base molecular da predisposição genética a periodontite, e vários polimorfismos genéticos estão sob análise a fim de se esclarecer sua função no aumento da suscetibilidade à doença<sup>30</sup>. Um número crescente de estudos busca por polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias (genes candidatos para periodontites) que poderiam influenciar a progressão da periodontite agressiva<sup>2</sup>.

Segundo TAYLOR et al.<sup>67</sup>, é importante ressaltar que a presença ou ausência de um polimorfismo de uma citocina pode não expressar diretamente um fenótipo clínico detectável. As periodontites são doenças complexas onde fatores genéticos, microbianos assim como fatores sistêmicos e locais adquiridos em conjunto exercem uma função na determinação da progressão da doença.

Então, tem sido proposto que os fatores de risco genéticos influenciam a história natural das periodontites<sup>26,50</sup>. Segundo LOOS et al.<sup>40</sup>, a presença de um fator de risco genético aumenta diretamente a probabilidade da periodontite progredir e se ausente reduz a possibilidade. Eles fazem parte de uma cadeia causal, ou expõem o hospedeiro a ela. LOOS et al.<sup>40</sup> sugerem também que deva ser possível que um alelo, originalmente definido como raro, esteja associado com ausência da doença; nestes casos o fator genético poderia ser considerado protetor.

## **2.2 – Estratégias de estudos em genética**

As evidências de participação dos fatores de risco genético na periodontite originam-se de 4 áreas de estudo: (1) estudos de doenças hereditárias e síndromes genéticas; (2) estudos em famílias; (3) estudos em gêmeos e (4) estudos populacionais, conforme HODGE &

MICHALOWICZ<sup>30</sup> sintetizaram em sua revisão de literatura; ressaltando que em periodontite agressiva, os principais estudos genéticos dividem-se em estudos em famílias e estudos populacionais.

Muitas doenças e desordens sistêmicas estão agregadas a famílias. O risco familiar pode ser estimado comparando o risco da doença em parentes do paciente com o risco da doença na população em geral<sup>73</sup>. Os resultados de estudos populacionais e de agregação familiar<sup>69</sup> indicam que fatores genéticos parecem ter uma forte influência na suscetibilidade a periodontite agressiva.

A maioria das evidências da influência genética na periodontite agressiva origina-se de análises de segregação. Este método estuda famílias com uma determinada doença com o objetivo de avaliar a probabilidade da condição ser ou não herdada como um traço genético. Normalmente é necessário coletar dados de muitas famílias com um mesmo traço/fenótipo para chegar a interpretações conclusivas<sup>24</sup>. As proporções encontradas nos irmãos afetados e/ou na prole são comparados com proporções esperadas sob hipóteses genéticas específicas. As análises de segregação das periodontites testam modelos multifatoriais que incorporam fatores ambientais e/ou genéticos adicionais que possam modificar a expressão clínica da doença em indivíduos suscetíveis<sup>30</sup> e, sustentam a hipótese de um locus principal para a periodontite agressiva<sup>24</sup>.

Em 1976, MELNICK et al.<sup>44</sup> apresentaram uma análise de segregação e sugeriram que a periodontite agressiva parece ter um traço ligado ao sexo (X) dominante com penetrância reduzida. Entretanto, SPEKTOR et al.<sup>63</sup> notaram que a prevalência elevada para um traço ligado ao sexo (X) dominante em famílias tem sido raramente encontrada. Posteriormente, outros estudos de análise de segregação sugeriram o modo de herança autossômico recessivo<sup>8</sup> e autossômico dominante<sup>42</sup>. As análises de segregação de famílias com periodontite agressiva indicam a existência de uma heterogeneidade genética nesta forma de doença. Enquanto a análise de segregação é capaz de fornecer informações sobre o modo de herança do traço genético, não fornece informações sobre genes específicos envolvidos<sup>24</sup>.

Por outro lado, o estudo de ligação é um método para determinar a posição cromossomal de um gene de maior efeito para um traço. É capaz de fornecer evidências com maior poder de explicação para a base genética de uma doença, podendo confirmar sua etiologia genética. Os estudos de ligação combinam análises clínicas detalhadas de membros da família com um amplo mapeamento do genoma utilizando marcadores genéticos conhecidos para buscar genes predisponentes ou em ligação<sup>30</sup>. Poucos estudos familiares de ligação têm sido elaborados. Na literatura destacam-se dois estudos que foram feitos em famílias com uma alta prevalência de periodontite agressiva<sup>7</sup>.

As limitações encontradas nos estudos de análise de segregação são superadas pelas técnicas de mapeamento genético de ligação e análises de associação<sup>14</sup>. Os estudos de ligação medem a co-transmissão de doenças e alelos de um locus marcador dentro de uma família (com diferentes alelos marcadores “viajando” com a doença em diferentes famílias). A análise de associação significa que um alelo específico em um locus ligado é mais comumente encontrado na população. Em contraste à análise de segregação, na qual somente o pedigree e o fenótipo da doença são considerados, os métodos de mapeamento genético também usam os polimorfismos como marcadores. Os marcadores são utilizados para seguir a transmissão dos segmentos do cromossomo através das famílias, buscando as correlações entre a transmissão de uma região cromossomal específica e a transmissão da doença<sup>15</sup>.

Geralmente, fatores de risco ambientais ou comportamentais de uma doença são frequentemente detectados pela primeira vez em grandes estudos epidemiológicos populacionais. Em epidemiologia genética, técnicas similares podem ser utilizadas para identificar fatores de risco genéticos para uma determinada doença<sup>24</sup>.

Uma técnica que tem sido utilizada para estudar a base genética da periodontite agressiva é a identificação de fenótipos significantes em pacientes com a doença para ajudar a esclarecer os genes candidatos. O

projeto Genoma Humano possibilitou a criação de um catálogo bastante completo dos genes humanos, o que tem facilitado a análise genética de traços complexos. Se a localização cromossomal dos genes candidatos forem conhecidas eles poderão ser avaliados por análise de ligação<sup>35</sup>. As frequências de polimorfismos de genes candidatos, cujas proteínas executam uma função na resposta imuno-inflamatória podem ser comparadas entre casos e controles<sup>62</sup>.

Em estudos populacionais é importante definir claramente a doença. Devido à possibilidade de heterogeneidade racial é importante assegurar que grupos casos e controles sejam pareados por raça<sup>42</sup>. A principal crítica a estes estudos populacionais de genes candidatos é a falta de uma amostra com número suficiente para prover resultados significativos<sup>30</sup>.

Genes candidatos são selecionados a partir de vários modelos: (1) expressão em tecidos de interesse; (2) modelos animais; (3) estudos em humanos (ligação e /ou associação); (4) defeitos cromossômicos que causam o fenótipo de interesse; e (5) síndromes que apresentem o fenótipo de interesse<sup>72</sup>.

### **2.3 – Modos de herança**



As evidências da hereditariedade da periodontite agressiva são derivadas de estudos iniciais que verificaram a agregação familiar<sup>6, 10</sup>. HART<sup>24</sup>, após uma revisão da literatura, constatou que em algumas famílias a porcentagem de irmãos com periodontite era de 40 a 50%. Esta agregação familiar é condizente com uma predisposição genética à doença. Entretanto, o modelo familiar deve refletir um histórico genético comum como também uma exposição aos mesmos fatores ambientais<sup>27</sup>.

Durante os últimos vinte anos, vários estudos têm sido elaborados com o objetivo de determinar como a periodontite agressiva deve ser herdada<sup>58</sup>. Estudos genéticos de periodontite agressiva sugerem o modelo de transmissão mendeliana de um gene de maior efeito<sup>7, 5, 37, 9, 23, 42</sup>. Isto significa que um ou mais genes de efeito principal poderiam contribuir para os modelos familiares de periodontite agressiva observados nestes estudos. Assim, um genótipo transmitido poderia predispor estes indivíduos a fenótipos de periodontite, quando eles forem expostos a certas bactérias<sup>58</sup>.

Os estudos de análise de segregação genética, os quais determinam o mais provável modo de transmissão de um traço de uma família e a distribuição dos membros da família com e sem o traço, têm sido elaborados utilizando famílias identificadas através de um indivíduo com periodontite agressiva<sup>58</sup>. Os resultados não são consistentes, alguns favorecendo a herança ligada ao sexo (X) dominante<sup>44, 49, 63</sup>, outros a herança autossômica recessiva<sup>57, 5, 37</sup> e, por último, a herança autossômica dominante<sup>42</sup>. Segundo THOMPSON & THOMPSON<sup>68</sup>, existem 4 padrões básicos de herança

monogênica: autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao sexo (X) dominante e ligado ao sexo (X) recessivo; e analisando os critérios de classificação dos distúrbios genéticos, a periodontite agressiva exibe características de um distúrbio genético monogênico (padrão de transmissão relacionado a um defeito em um único gene).

MELNICK et al.<sup>44</sup>, a partir de dados de 19 irmãos afetados com periodontite agressiva, sugeriram que a periodontite agressiva era um traço ligado ao sexo (X) dominante com penetrância reduzida. Foram feitas três observações importantes baseadas nesta conclusão. Primeiro, a proporção observada de mulheres e homens entre as pessoas afetadas foi de 2:1. Nenhuma transmissão pai para filho foi constatada. Finalmente, o coeficiente de segregação de 0,39 era consistente com uma transmissão dominante com penetrância reduzida. A conclusão deste estudo foi suportada por outros dois estudos subseqüentes em famílias com alta prevalência de periodontite agressiva<sup>49, 63</sup>. Entretanto, SPEKTOR et al.<sup>63</sup> observaram que a prevalência da periodontite agressiva nas famílias era muito elevada para um traço ligado ao sexo (X) dominante.

HART et al.<sup>23</sup> reavaliaram a evidência da herança ligada ao sexo (X) dominante. Eles concluíram que os estudos iniciais estavam sujeitos a erros relativos aos indivíduos afetados, já que as mulheres procuram mais os centros de tratamento odontológico. Dois estudos encontraram uma predominância de mulheres entre os casos índices, mas uma distribuição de sexo semelhante foi vista entre os parentes afetados<sup>57, 49</sup>. A falta de relatos de transmissão de pai para filho parece ser devido às informações incompletas

das famílias, já que os pais freqüentemente não comparecem nestes estudos. BOUGHMAN et al.<sup>7</sup> demonstraram claramente uma transmissão de pai para filho. O coeficiente de segregação de 0,39 é igualmente compatível com formas de herança ligada ao sexo (X) ou autossômica.

SAXÉN<sup>56</sup> examinou 31 famílias com periodontite agressiva e concluiu que a doença é mais provavelmente herdada como um traço autossômico recessivo com penetrância elevada em homozigotos. Posteriormente, outro estudo confirmou esta conclusão<sup>57</sup>. LONG et al.<sup>37</sup> compararam e avaliaram os modos de herança autossômico recessivo e ligado ao sexo (X) dominante com penetrância reduzida em 33 famílias com periodontite agressiva e, concluíram que o modelo autossômico recessivo é mais provável. BEATY et al.<sup>5</sup> e BOUGHMAN et al.<sup>8</sup> também propuseram este modo de herança da periodontite agressiva.

A evidência mais convincente de uma herança autossômica dominante e da heterogeneidade raça específica em periodontite agressiva foi fornecida por MARAZITA et al.<sup>42</sup>. Foi uma análise de segregação em larga escala, examinando 100 famílias e 104 casos índices com periodontite agressiva. Os autores concluíram que o modo de herança mais provável foi autossômico dominante com 70% de penetrância em indivíduos afro-americanos e 73% em caucasianos.

O principal obstáculo enfrentado pelos estudos de análise de segregação é a falta de um critério diagnóstico definitivo e embasado biologicamente com relação às diferenças clínicas e que são necessárias para definir o fenótipo da doença a ser estudada<sup>58</sup>.

Os resultados de estudos em gêmeos e estudos clínicos observacionais considerando a agregação familiar da periodontite

agressiva<sup>9, 42</sup>, juntamente com a presença de doenças genéticas ou síndromes nas quais a periodontite agressiva é a principal característica, implicam genes na etiologia da periodontite. Entretanto, parece claro que muitas formas de periodontite agressiva relacionadas com síndromes não são herdadas como doenças mendelianas, provavelmente não são causadas por um gene principal. Preferivelmente, vários genes polimórficos com pequenas, mas significantes associações com o risco à doença devem interagir contribuindo para o risco total. A associação do risco total com os genes deve ocorrer em virtude do arranjo de variantes genéticas encontradas em um determinado cromossomo, as quais são herdadas como um bloco ou unidade (haplótipos)<sup>58</sup>.

Algumas variantes genéticas que podem contribuir com o aumento ou diminuição do risco a periodontite agressiva têm sido identificadas e, uma vez que isso aconteça, seus modos de interação com outros fatores e meio ambiente terão que ser avaliados. Com o advento da epidemiologia molecular, é realístico considerar desenhos de estudos que permitam o desenvolvimento de perfis de risco individuais, incluindo componentes genéticos do hospedeiro e fatores ambientais<sup>24</sup>.

A natureza familiar da periodontite agressiva leva a especulação que um defeito genético principal seja responsável por essa transmissão, mas um gene que possa ser generalizado à população ainda não foi

detectado. Entretanto, vários polimorfismos genéticos têm sido associados com o risco a periodontite agressiva em várias populações<sup>58</sup>. Atualmente, as pesquisas buscam a base molecular da predisposição genética. Sendo assim, vários polimorfismos genéticos estão sob investigação para aclarar sua função no aumento da suscetibilidade a periodontite agressiva<sup>2</sup>.

## **2.4 – Polimorfismos associados a periodontite agressiva**

### **2.4.1 – Polimorfismos do gene da interleucina 1 (IL-1)**

DIEHL et al.<sup>15</sup> avaliaram a possibilidade dos polimorfismos genéticos da IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estarem associados com a periodontite agressiva em 28 famílias norte-americanas descendentes de africanos e 7 famílias norte-americanas descendentes de europeus com 2 ou mais indivíduos acometidos pela periodontite agressiva, totalizando 141 indivíduos com periodontite agressiva e 144 controles. Uma amostra de sangue venoso periférico foi coletada para a extração do DNA que foi amplificado através da PCR e submetido ao teste de restrição utilizando primers específicos para amplificar as áreas do gene da IL-1 $\alpha$  próximas ao sítio polimórfico -889 e as áreas do gene da IL-1 $\beta$  próximas ao +3953. As análises estatísticas utilizaram métodos de epidemiologia genética adequados para dados familiares e para populações étnica e geograficamente distintas. Os resultados indicaram uma evidência altamente significativa de associação (desequilíbrio de ligação) para ambas as populações (descendentes de africanos e europeus)

com periodontite agressiva generalizada, com uma tendência semelhante para a forma localizada da doença.. Os autores concluíram que a associação entre uma variação genética de um sítio polimórfico do gene da IL-1 $\beta$  e o risco para a periodontite agressiva generalizada demonstra que existe um importante componente genético na etiologia desta doença, mas que não deve exercer influência exclusiva sobre o risco à doença.

PARKHILL et al.<sup>51</sup> pesquisaram a frequência de polimorfismos nos genes que codificam a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e seu receptor antagonista (IL-1RA) em 70 indivíduos com periodontite agressiva incluindo um subgrupo de 21 indivíduos com a forma localizada da doença, e 72 indivíduos controles. Ambos os grupos eram de origem caucasiana e sistemicamente saudáveis. Os indivíduos fumantes foram incluídos no estudo. Uma amostra de sangue venoso periférico foi coletada para a extração do DNA. O SNP no exon 5 do gene da IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$  +3953) foi analisado através da amplificação da região polimórfica utilizando PCR, seguido pelo teste de restrição e visualização por eletroforese. A frequência do genótipo da IL-1 $\beta$  para o alelo 1 do SNP em questão estava significativamente aumentada em indivíduos com periodontite agressiva ( $\chi^2$ , p=0,025). Analisando os indivíduos fumantes, uma diferença significativa foi encontrada na distribuição do genótipo da IL-1 $\beta$  entre indivíduos com periodontite agressiva fumantes e controles fumantes (F-exact test, p=0,02). Esse achado não foi confirmado entre indivíduos com periodontite agressiva não fumantes e controles não fumantes. Não foram encontradas evidências de uma associação entre o genótipo do IL-1RA e a periodontite agressiva. Entretanto, uma combinação entre o alelo 1 da IL-1 $\beta$  e o alelo 1 do IL-1RA foi associada com a periodontite agressiva. Os autores sugeriram que o genótipo da IL-1 $\beta$  em combinação com o fumo, e a combinação do genótipo da IL-1 $\beta$  e do IL-1RA podem ser considerados fatores de risco para a periodontite

agressiva, sustentando o papel dos fatores de risco genético e ambiental na suscetibilidade a periodontite agressiva.

WALKER et al.<sup>74</sup>, com o objetivo de determinar a prevalência dos polimorfismos da interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$  em 2 populações de 104 e 37 indivíduos norte-americanos descendentes de africanos controles e com periodontite agressiva localizada, respectivamente; genotiparam os locus +4845 da IL-1 $\alpha$  e +3953 da IL-1 $\beta$  por PCR, utilizando o teste de restrição. Foram coletadas amostras do sangue venoso periférico para a extração do DNA. Os dados foram analisados estatisticamente através de uma tabela de contingência r x c. Os resultados mostraram que mais de 99% da população controle e 100% da população teste possuíam o alelo 1 da IL-1 $\beta$  +3953 com a maioria dos indivíduos homocigotos 1,1. A prevalência do genótipo com pelo menos um alelo 2 em cada um dos loci pesquisados foi 14% na população controle e 8% na população teste. Devido à alta frequência do alelo 1 IL-1 $\beta$  nesta população, os autores concluíram que o conhecimento deste polimorfismo IL-1 $\beta$  (+3953) parece possuir pouco valor diagnóstico ou preditivo para a periodontite agressiva localizada.

HODGE; RIGGIO & KINANE<sup>31</sup> pesquisaram a presença dos polimorfismos IL-1 $\alpha$ (-889) e da IL-1 $\beta$ (+3953) em uma população caucasiana, sendo 56 indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada e 56 indivíduos controles. Uma amostra de sangue venoso periférico foi coletada para a extração do DNA. A técnica de PCR foi utilizada para a amplificação do gene da IL-1 $\alpha$ (-889) e da IL-1 $\beta$  (+3953), e os produtos submetidos à análise de restrição enzimática. Os resultados não mostraram diferenças significantes entre pacientes e controles para os

genótipos ou frequência alélica investigados ( $p=1.0$ ), nem quando o fumo foi incluído como uma co-variante. Os autores concluíram que a ausência de uma associação entre polimorfismos da IL-1 e a periodontite agressiva generalizada, nesta população estudada, coloca em dúvida a utilidade destes genes candidatos como marcadores de suscetibilidade desta forma de periodontite.

TAI et al.<sup>66</sup> pesquisaram a frequência de SNPs nos genes que codificam a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e um marcador de polimorfismos do número variável de repetições (VNTR) no gene do IL-1RA em 47 pacientes japoneses portadores de periodontite agressiva generalizada e 97 controles. O DNA foi coletado do sangue venoso periférico. Os SNPs nos genes IL-1 $\alpha$ (+4845) e IL-1 $\beta$ (-511, +3954) foram amplificados por PCR, seguido do ensaio de restrição enzimática e visualização por eletroforese. Os polimorfismos no IL-1RA foram então amplificados por PCR e os fragmentos de diferentes tamanhos analisados. Os resultados não mostraram diferenças significantes nos genótipos estudados nem nas frequências alélicas entre os indivíduos com periodontite agressiva generalizada e os controles. Entretanto, a frequência de alelos polimórficos do gene do IL-1RA estava significativamente aumentada em indivíduos com periodontite agressiva generalizada quando comparada ao controle ( $\chi^2$  test,  $p=0,007$  OR=3,40). A taxa de VNTR foi significativamente mais elevada em periodontite agressiva generalizada do que em controles ( $\chi^2$  test,  $p=0,05$  OR=3,81). Os achados sugerem que os polimorfismos VNTR em IL-1RA estão associados com a periodontite agressiva generalizada nesta população japonesa.

TREVILATTO et al.<sup>70</sup> avaliaram o perfil genético de 14 indivíduos de uma família brasileira com alguns membros portadores de periodontite agressiva. O DNA foi



obtido das células epiteliais através de bochecho com 3% de glucose e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira. A técnica de PCR foi utilizada para analisar os polimorfismos genéticos das citocinas. Os resultados mostraram que o alelo 2 (mais raro) do polimorfismo do gene da IL-1 $\alpha$ (-889) foi encontrado em todos os indivíduos assim como o alelo 1 (mais comum) do gene da IL-1 $\beta$  (+3953). Os alelos 1 e 2 (50% cada) do gene da IL-1 $\beta$  (-511), alelo 1 do gene TNF- $\alpha$ (-308) e alelo 2 do gene IL1-RA (intron 2) estavam presentes. Os autores concluíram que os parâmetros genéticos não foram relevantes para a predição de suscetibilidade nesta família.

GONZALES et al.<sup>19</sup> pesquisaram a associação entre genótipos da IL-1 e a periodontite agressiva em 2 populações, sendo a primeira de 28 indivíduos caucasianos portadores de periodontite agressiva e 33 controles, e a segunda de 16 indivíduos da América Central portadores de periodontite agressiva e 14 controles. O DNA foi obtido do sangue coletado da ponta do dedo nos indivíduos da América Central e do sangue venoso periférico dos caucasianos. Dois tipos de polimorfismos genéticos, IL-1 $\alpha$  (+4845) e IL-1 $\beta$  (+3954), foram analisados através de PCR e ensaios de restrição enzimática. Os resultados apontaram uma distribuição similar dos genótipos estudados entre pacientes e controles em ambas as populações. A frequência do alelo 1 do gene da IL-1 $\alpha$  foi mais elevada em indivíduos com periodontite agressiva em ambas as populações quando comparada aos controles, porém não apresentou significância estatística.

LI et al.<sup>36</sup> testaram a hipótese de que genótipos específicos da IL-1 e/ou alelos poderiam ser utilizados como preditores de suscetibilidade da periodontite agressiva generalizada. Foram incluídos no estudo 122 indivíduos com periodontite agressiva generalizada e 95 indivíduos controles, ambos os grupos de origem chinesa. Os SNPs da IL-1 $\alpha$  (+4845) e da IL-1 $\beta$  (-511, +3954) foram analisados por PCR e submetidos ao

ensaio de restrição enzimática. Não houve associação significativa entre os SNPs pesquisados e a periodontite agressiva generalizada, exceto quando os indivíduos foram separados por sexo com um valor mais elevado para os homens com periodontite agressiva generalizada do que os homens do grupo controle. Os autores concluíram que os SNPs analisados devem exercer algum papel da determinação da suscetibilidade a periodontite agressiva generalizada em homens chineses.

QUAPPE et al.<sup>52</sup> avaliaram a prevalência do genótipo da IL-1 na população chilena e a associação dos polimorfismos do gene da IL-1 $\alpha$  (-889) e da IL-1 $\beta$  (+3954) com a periodontite agressiva. Foram examinados 36 indivíduos com periodontite agressiva, 75 indivíduos controle sadios e 75 indivíduos com condições periodontais desconhecidas. Estes foram genotipados para os loci da IL-1 $\alpha$  (-889) e da IL-1 $\beta$  (+3954) por PCR. A prevalência de um genótipo positivo da IL-1 foi mais elevada em indivíduos com periodontite agressiva (25%) do que nos controles sadios (12%), mas a diferença não foi significativa. A frequência da IL-1 $\beta$  (+3954) homozigota para o alelo 1 foi mais elevada em controles do que em indivíduos com periodontite agressiva, sugerindo um fator protetor para a periodontite agressiva. O heterozigoto para o alelo 2 da IL-1 $\beta$  mostra uma associação significativa com a periodontite agressiva. Nenhuma associação foi observada entre a periodontite agressiva localizada e generalizada e a extensão da doença e a presença de um genótipo positivo. Os resultados sustentam uma associação positiva entre a periodontite agressiva e a presença de polimorfismo do alelo 2 do gene da IL-1 $\beta$  (+3954).

LÓPEZ et al.<sup>41</sup> objetivaram determinar a prevalência dos SNPs da IL-1 $\alpha$  (-889) e da IL-1 $\beta$ (+3954) na população chilena e sua associação com a periodontite. Um estudo caso-controle de 330 indivíduos com periodontite e de 101 indivíduos controle foi executado com a coleta do sangue venoso periférico para a extração do DNA. Foi

encontrada uma frequência mais elevada de heterozigotos da IL-1 $\alpha$ (-889) em indivíduos com periodontite do que nos controles, mas a diferença não foi significativa. Os heterozigotos da IL-1 $\beta$ (+3954) foram significativamente mais elevados em indivíduos com periodontite do que nos controles. O homozigoto para o alelo 1 da IL-1 $\beta$  (+3954) foi considerado um fator preditivo para a periodontite. A prevalência do genótipo positivo foi significativamente mais elevada em casos (26,06%) do que em controles (9,9%) e foi associada a periodontite. Respeitando as limitações do estudo, os autores concluíram que indivíduos com um genótipo positivo tem um risco significativamente maior de desenvolver periodontite.

#### **2.4.2 – Polimorfismos do gene da interleucina 10 (IL-10)**

YAMAZAKI et al.<sup>77</sup> investigaram a hipótese de polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 estarem associados a periodontite crônica e a periodontite agressiva generalizada. O DNA foi obtido a partir do sangue venoso periférico de 34 indivíduos com periodontite crônica, 18 com periodontite agressiva generalizada e 52 controles. A região promotora entre - 506 e -1140 do gene da IL-10 foi amplificada por PCR e os polimorfismos detectados por seqüenciamento direto. Não foram encontradas diferenças significantes na frequência dos haplótipos entre pacientes e controles. Os autores concluíram que os polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 parecem não ser determinantes na

suscetibilidade ao desenvolvimento de periodontite nesta população japonesa.

GONZALEZ et al.<sup>18</sup> pesquisaram a associação genética de 2 polimorfismos da IL-10 (-594,-824) em indivíduos caucasianos, sendo 23 com periodontite crônica, 18 com periodontite agressiva e 21 controles. O DNA foi isolado de amostras de sangue venoso periférico e os polimorfismos nas posições -594 e -824 da região promotora da IL-10 foram amplificadas por PCR e analisadas por ensaios de restrição enzimática. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência alélica entre controles e indivíduos com periodontite. Os autores concluíram que estes polimorfismos parecem não estar associados com a periodontite nesta população caucasiana.

### **2.4.3 – Polimorfismos do gene do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

ENDO et al.<sup>16</sup> estudaram o SNP na região 5' do gene do TNF- $\alpha$  com o objetivo de determinar a frequência de polimorfismos e haplótipos em uma população japonesa, e relacioná-los com a periodontite agressiva generalizada. Foram examinados 46 japoneses com periodontite agressiva generalizada e 104 japoneses controles. Destes, 20 controles foram analisados por seqüenciamento direto para identificar os polimorfismos na região 5' do gene do TNF- $\alpha$ . Todos os indivíduos foram analisados por PCR utilizando métodos de sondas específicas. O DNA foi obtido a partir de coleta de sangue venoso periférico. O estudo determinou 5 SNPs na região em questão, porém não encontrou diferenças significantes entre genótipo e frequência alélica quando

comparava o grupo com periodontite agressiva generalizada e o grupo controle. Os achados sugerem que não existe associação entre polimorfismos na região 5' do TNF- $\alpha$  e suscetibilidade a periodontite agressiva generalizada nesta população japonesa.

SHAPIRA et al.<sup>60</sup> investigaram uma possível ligação entre o polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$  (-308) e a periodontite agressiva. O DNA genômico foi extraído do sangue periférico de 64 indivíduos de 11 famílias portadoras de periodontite agressiva. O polimorfismo na posição -308 da região promotora do gene do TNF- $\alpha$  foi analisado através de PCR alelo específico. As diferenças entre o grupo portador de periodontite agressiva e o controle não foram estatisticamente significantes. Então, a ligação entre o polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$  e a periodontite agressiva não foi confirmada neste estudo.

#### **2.4.4 – Polimorfismos do gene do receptor Fc gama (Fc $\gamma$ R)**

Com o objetivo de determinar se os polimorfismos dos receptores Fc $\gamma$  estão associados com a periodontite agressiva, KOBAYASHI et al.<sup>34</sup> avaliaram a distribuição dos genótipos do receptor Fc $\gamma$  para 3 polimorfismos bialélicos (Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa e Fc $\gamma$ RIIIb) em 38 indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada, 83 portadores de periodontite do adulto e 104 controles sadios pareados por raça. Os resultados mostraram uma super-representação do alelo Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 em indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada quando comparados aos controles. Além disso, os autores encontraram uma associação forte entre a periodontite agressiva

generalizada e o genótipo composto por Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 e Fc $\gamma$ RIIIa-158F. O estudo indica que o alelo Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 e possivelmente o Fc $\gamma$ RIIIa-158F poderiam estar associados com a suscetibilidade a periodontite agressiva generalizada em pacientes japoneses.

FU et al.<sup>17</sup> tiveram por objetivo determinar se os alelos e/ou genótipos específicos do Fc $\gamma$ RIIa, IIIa e IIIb poderiam ser usados para prever suscetibilidade da periodontite agressiva localizada em uma população afro-americana. O DNA foi obtido a partir de amostras do sangue periférico ou saliva de 48 indivíduos com periodontite agressiva localizada e 67 indivíduos controles, ambos os grupos de etnia afro-americana. Os genótipos foram analisados por PCR com primers alelos específicos. Os resultados apontaram uma super-representação significativa do alelo do Fc $\gamma$ RIIIb-NA2 em indivíduos com periodontite agressiva localizada quando comparados aos controles. A prevalência do genótipo Fc $\gamma$ RIIIbNA2/NA2 foi mais alta no grupo com periodontite agressiva localizada quando comparado ao controle. Indivíduos expressando este genótipo parecem possuir um risco maior para o desenvolvimento da periodontite agressiva localizada. Os dados sugerem que o genótipo deve representar um marcador de risco para a suscetibilidade a periodontite agressiva localizada em populações afro-americanas.

Visto a diversidade da distribuição dos alótipos do alelo do locus  $\gamma$ 2 associado com alta produção de IgG2 (Gm23) e genótipos do receptor Fc $\gamma$  em diferentes grupos étnicos, CHUNG et al.<sup>12</sup> examinaram sua significância clínica em indivíduos do Taiwan portadores de periodontite crônica e agressiva. Para isto, o DNA genômico de 50 indivíduos com periodontite crônica, 30 com periodontite agressiva generalizada e 74 controles foram coletados. Os alótipos Gm (23) foram determinados pelo teste de imunodifusão radial e os genótipos Fc $\gamma$ RIIa (CD32) e Fc $\gamma$ RIIIb (CD16) foram

determinados por PCR alelo específico. A taxa de transporte do alótipo Gm (23+) foi mais elevada do que 85% e o alótipo Gm (-23) estava super-representado em indivíduos com periodontite crônica quando comparados aos controles. Não existiu nenhuma diferença significativa nas distribuições dos 3 genótipos de FcγRIIa e IIIb entre os 3 grupos testados. A frequência do alelo R131 dos polimorfismos de FcγRIIa foi mais elevada em indivíduos com periodontite agressiva generalizada do que em indivíduos com periodontite crônica quando as frequências alélicas R/H foram analisadas pelo teste  $\chi^2$ . O alótipo Gm (23-) parece ser um fator de risco potencial para periodontite crônica. Embora o alelo R131 do FcγRIIa tenha ocorrido mais frequentemente em periodontite agressiva generalizada do que em periodontite crônica, sua significância clínica não pode ser justificada neste estudo.

LOOS et al.<sup>38</sup> realizaram o estudo com o objetivo de pesquisar polimorfismos genéticos do receptor Fcγ e sua relação com a suscetibilidade e com a severidade da periodontite. A população caucasiana estudada consistia de 68 indivíduos com periodontite, sendo 12 com periodontite agressiva e 56 com periodontite crônica, e 61 indivíduos controle com média de idade de 43 anos. O DNA foi isolado do sangue venoso periférico. Os indivíduos foram categorizados para os seguintes genes (alelos): FcγRIIa (R131 ou H131), FcγRIIIa (V158 ou F158) e FcγRIIIb (NA1 ou NA2). A frequência do alelo FcγRIIIa – V158 foi mais alta nos indivíduos com periodontite (53%) do que no grupo controle (39%). A frequência do alelo FcγRIIa – H131 foi 58% na população com periodontite, sendo de 79% na população com periodontite agressiva e 51% na população controle [OR=3.68 (1.29-10.5), p=0,013]. A frequência do genótipo FcγRIIa – H/H131 foi significativamente mais alta em pacientes com periodontite agressiva do que nos controles [OR=9.07 (1,29-63.56), p=0,026]. Os autores sugeriram que o genótipo FcγRIIa – H/H131 deve ser um fator putativo de

suscetibilidade e severidade, e o alelo FcγRIIIa – V158 um fator putativo de suscetibilidade para a periodontite em caucasianos.

#### **2.4.5 – Outros polimorfismos associados a periodontite agressiva**

HENNING et al.<sup>28</sup> investigaram uma possível associação entre o genótipo do receptor da vitamina D (VDR) e a periodontite agressiva. Um polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) no exon 9 do gene do VDR foi analisado por PCR e visualizado por eletroforese. Foram examinados 69 indivíduos com periodontite agressiva, dos quais 20 indivíduos apresentavam a forma localizada da doença; e 72 indivíduos controles. Os resultados mostraram que o transporte do alelo menos freqüente no gene do VDR aumentou significativamente o risco de desenvolvimento da forma localizada da periodontite agressiva. Entretanto, o genótipo do VDR não parece afetar a incidência de todos os casos de periodontite agressiva porque não houve diferença significativa na distribuição do genótipo ou das freqüências alélicas entre indivíduos controles e o grupo de indivíduos com a forma localizada e generalizada da periodontite agressiva.

MICHEL et al.<sup>48</sup> identificaram polimorfismos do gene da interleucina 4 (IL-4) de 18 indivíduos com periodontite agressiva e 22 indivíduos controles e, investigaram o papel destes no aumento da suscetibilidade a periodontite agressiva nesta população caucasiana. Uma amostra de sangue venoso periférico foi coletada para a extração do DNA e os polimorfismos foram analisados por PCR seguido pelo teste de restrição e



visualização por eletroforese. No grupo de periodontite agressiva, 27,8% foram positivos para os polimorfismos da região promotora e íntron do gene da IL-4.

GONZALES et al.<sup>20</sup> analisaram diferentes genótipos da IL-4 em caucasianos e japoneses com periodontite agressiva com o objetivo de detectar diferenças genéticas nessas populações. Participaram do estudo 124 indivíduos, sendo 31 japoneses e 30 caucasianos com periodontite agressiva generalizada, e 30 japoneses e 33 caucasianos controles. Os polimorfismos da IL-4 foram determinados pela técnica do PCR e o DNA obtido do sangue venoso periférico. Nenhuma associação significativa foi estabelecida entre os polimorfismos da IL-4 e o risco para a periodontite agressiva. Entretanto, as frequências alélicas mostraram resultados diferentes entre as populações. O polimorfismo no intron 2 foi mais elevado em indivíduos caucasianos com periodontite agressiva do que nos controles (OR=2.0 95% intervalo de confiança [1.0 – 4.2]). Além disso, a frequência desse polimorfismo em indivíduos com doença e controles foi 25% e 60%, respectivamente; sendo mais elevado na população japonesa do que na caucasiana. Os autores concluíram que não existe uma associação dos genótipos da IL-4 e a periodontite agressiva em ambas as populações estudadas, embora as frequências dos genótipos sejam diferentes entre japoneses e caucasianos.

ITAGAKI et al.<sup>33</sup> buscaram uma associação entre o polimorfismo na região promotora do gene MMP-1 (-1607) e MMP-3 (-1171) e a suscetibilidade a periodontite em uma população japonesa de não fumantes. O DNA foi obtido do sangue venoso periférico de 37 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, 205 com periodontite crônica e 142 indivíduos controle. Os polimorfismos foram determinados pela técnica do PCR. Os dados foram analisados pelo teste estatístico  $\chi^2$ . Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas distribuições dos genótipos, nas frequências alélicas ou dos haplótipos. Os autores concluíram que os dados obtidos parecem não

suportar a hipótese que os polimorfismos na região promotora dos genes da MMP-1 e MMP-3 influenciam na suscetibilidade a periodontite nesta população japonesa.

### **3. PROPOSIÇÃO**

1. Definir o modo de herança da periodontite agressiva nas famílias selecionadas;
2. Testar um método alternativo de coleta de células epiteliais da mucosa oral para a obtenção do DNA genômico;

3. Analisar o DNA de alguns indivíduos destas famílias utilizando um chip para a genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup>10K, Santa Clara, CA).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 – Amostra**

Foram selecionadas 5 famílias, a partir de um indivíduo diagnosticado como portador de periodontite agressiva<sup>69</sup>, totalizando um número de 23 indivíduos examinados no presente estudo. As famílias identificadas pelos números 1,3 e 5 tiveram , respectivamente, 1, 2 e 1 dos seus membros genotipados pelo chip (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA). Todos os indivíduos submetidos à genotipagem eram portadores de periodontite agressiva (Apêndice A) e de etnia afro-brasileira (não-brancos). As famílias examinadas foram selecionadas na Clínica de Especialização em Periodontia da UNIGRANRIO.

#### **4.2 – Critérios de Inclusão e Exclusão**

Como critério de inclusão as famílias precisavam ter pelo menos um indivíduo afetado por periodontite agressiva com idade inferior ou igual a 35 anos. Foram excluídos os indivíduos que apresentavam doença sistêmica ou síndromes.

#### **4.3 – Aspectos Éticos**

O projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do estado do Rio de Janeiro (UERJ) (Anexo A). Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento antes de serem examinados.

#### **4.4 – Coleta dos Dados**

Todos os indivíduos foram avaliados através de anamnese, exame clínico periodontal, exame radiográfico e exame laboratorial. A anamnese, o exame clínico periodontal, assim como a coleta do bochecho com uma solução antisséptica alcoólica (Scope<sup>®</sup>) foi realizado pela autora.

No questionário de anamnese constavam os seguintes dados: sexo, idade, etnia (branco ou não-branco), hábito de fumo, medicamentos em uso, dados de doenças sistêmicas e síndromes.

O exame periodontal incluiu: (1) profundidade de bolsa a sondagem (PBS) medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa/sulco; (2) nível de inserção a sondagem (NIS) medida a partir da junção cimento-esmalte (JCE) até o fundo da bolsa/sulco<sup>54</sup>.

Todos os dentes presentes, com exceção dos terceiros molares, foram examinados. Os níveis de PBS e NIS foram medidos em seis sítios por dente (disto-vestibular-DV, vestibular-V, mesio-vestibular-MV, disto-lingual-DL, lingual-L e mesio-lingual-ML). Uma sonda periodontal milimetrada da marca HUFRIEDY<sup>®</sup> (Chicago, EUA) modelo PCPUNC15 foi utilizada para a realização de todas as medidas e os valores obtidos foram aproximados para o milímetro mais próximo.

Todos os indivíduos foram submetidos a exame radiográfico periapical completo ou panorâmico em uma mesma clínica radiológica privada.

O diagnóstico da periodontite agressiva foi baseado nos critérios descritos por Tinoco et al.<sup>69</sup>, com algumas modificações: (1) PBS  $\geq$  5mm e NIS  $\geq$  4mm em pelo menos um primeiro molar; (2) NIS  $\geq$  4mm em  $>$  1 sítio; (3) presença de  $\geq$  1 lesão periodontal infra-óssea (diagnosticada radiograficamente) envolvendo molares e/ou incisivos. Já o diagnóstico de periodontite crônica foi dado pela presença de  $\geq$  4 sítios

com PBS e NIS  $\geq 4$ mm. O indivíduo foi considerado periodontalmente saudável quando não possuía sítios com PBS e NIS  $\geq 4$ mm.

#### 4.5 – Coleta de Material e Extração do DNA

Após os exames clínicos os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue e de células epiteliais da mucosa oral com o objetivo de obtenção do DNA genômico de ambos os materiais coletados.

Aproximadamente 3mL de sangue venoso periférico em um tubo (Vacuette<sup>®</sup> com EDTA) de 4mL a vácuo foi coletado por técnicos de enfermagem do laboratório de análises clínicas da UNIGRANRIO. Após a coleta, o sangue era centrifugado no local a 3000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos. O plasma foi separado e as células foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA, não excedendo o período de 3 meses.

Para a coleta de células epiteliais da mucosa oral os indivíduos foram submetidos a um bochecho com 30ml de uma solução antisséptica alcoólica (Scope<sup>®</sup>) por 1 minuto. O líquido resultante do bochecho foi dispensado em um recipiente plástico esterilizado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a manipulação.

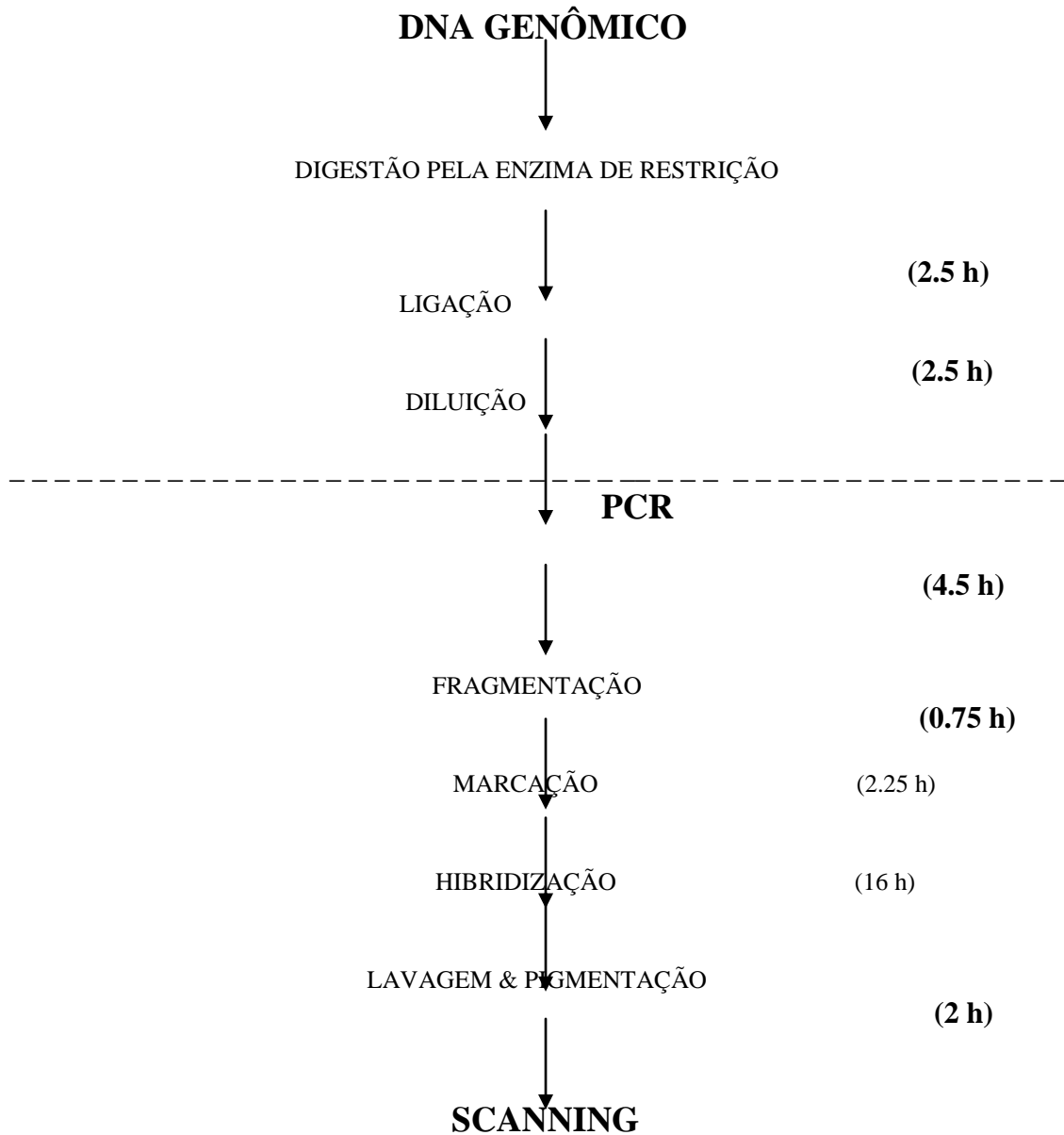
A extração do DNA a partir dos materiais coletados foram realizados no Laboratório de Bioquímica da UERJ pela autora. Foi feita a extração do DNA para a posterior genotipagem de SNPs pelo chip (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA).

A extração do DNA a partir de células epiteliais da mucosa oral foi realizada segundo as especificações do fabricante do kit utilizado (QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit 250, QIAGEN Sciences, USA). O DNA extraído foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise com o chip da Affymetrix para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa

Clara, CA), conforme recomendação do fabricante. Já a extração do DNA do sangue venoso periférico foi realizada segundo o protocolo utilizado pelo laboratório de Bioquímica da UERJ, por ser um protocolo mais simples para o processamento do sangue em comparação ao kit. O DNA extraído foi estocado a 4°C conforme recomendação do protocolo até o uso posterior.

Uma alíquota de DNA foi enviada para o Centro de Estudos de Anomalias Craniofaciais do Departamento de Pediatria da Universidade de Iowa (EUA), onde foram executadas as análises com o chip.

O chip da Affymetrix para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip®10K, Santa Clara, CA) foi desenvolvido para detectar os SNPs em amostras de DNA genômico. Inicialmente 250ng de DNA foram digeridos com a enzima de restrição XbaI, o que resultou em fragmentos de vários tamanhos. Moléculas adaptadoras foram ligadas a todos os fragmentos através da técnica de PCR. Os fragmentos amplificados foram, então, fragmentados, marcados e hibridizados ao chip (Figura 1). Após a leitura da intensidade de fluorescência, cada genótipo é determinado com base no software GDAS 2.0 da Affymetrix.



**Figura 1.** Resumos dos procedimentos do chip. Adaptado do manual do chip da Affymetrix para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip® 10K, Santa Clara, CA).



#### 4.6 - Análise Estatística

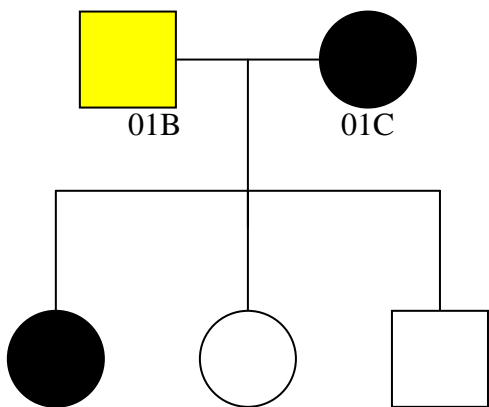
Os genótipos dos 4 casos e do DNA de referência foram comparados baseados na hipótese de que o modo de herança seria aquele determinado na análise de segregação.

As probabilidades dos genótipos coincidirem foram calculadas baseado na frequência dos alelos de cada SNP de acordo com a informação fornecida pelo fabricante. Sabendo-se que a distribuição dos genótipos em qualquer população segue uma expressão binomial  $A^2+2AB+B^2 = 1$  (Princípio de Hardy-Weinberg), sendo que  $A^2$  é o número de homozigotos de alelos comuns,  $B^2$  é o número de homozigotos de alelos raros e  $2AB$  o número de heterozigotos; foram utilizados os valores de  $2AB$  para calcular as probabilidades. Probabilidades inferiores a 0.000005 foram consideradas significativas, pois foi utilizada a correção de Bonferroni para testes múltiplos (0.05/10000).

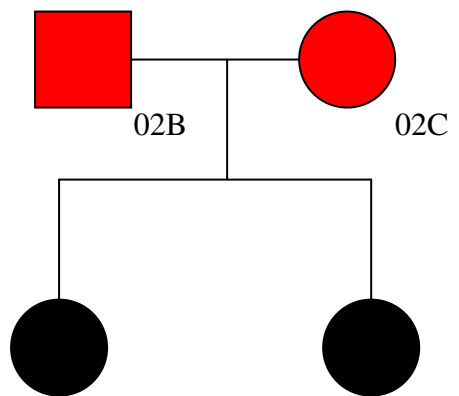
## **5. RESULTADOS**

A figura 2 apresenta os heredogramas das 5 famílias selecionadas, totalizando 23 indivíduos. Cada família é identificada por um número e cada indivíduo por um número, correspondente ao número da família, e por uma letra. Através do exame clínico periodontal (Apêndice A) foi estabelecido o diagnóstico periodontal de cada indivíduo. As famílias foram selecionadas a partir de um caso de periodontite agressiva, obedecendo aos critérios e parâmetros definidos no material e métodos desta tese. Esses casos índices são sempre identificados pela letra A.

**FAMÍLIA 01**

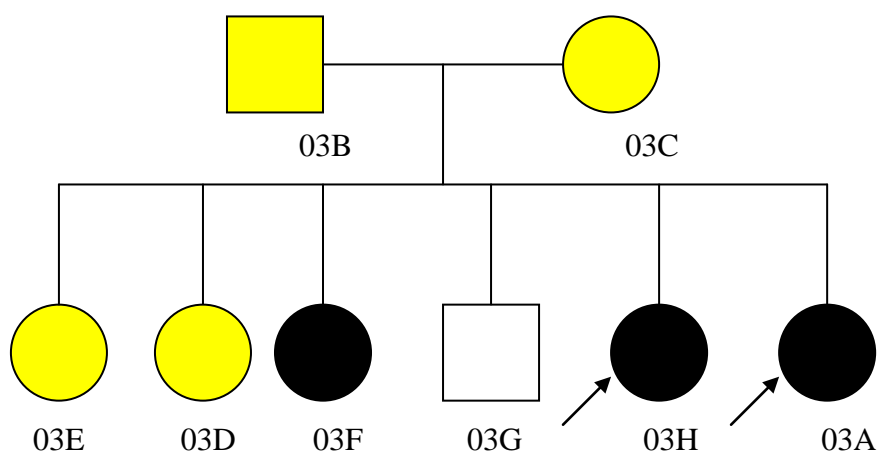


**FAMÍLIA 02**

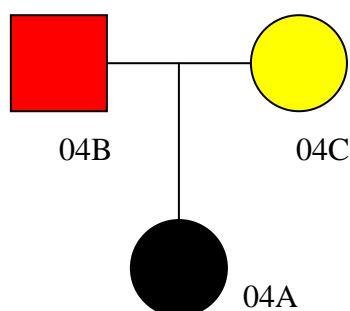


01A      01D      01E      02A      02D

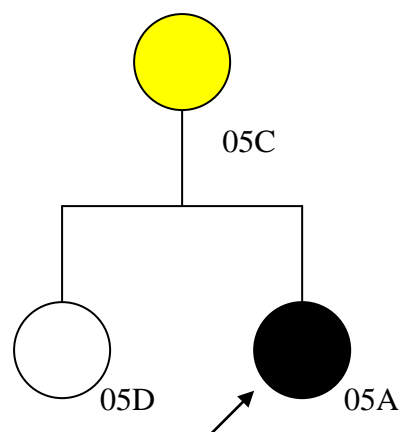
### FAMÍLIA 03



### FAMÍLIA 04



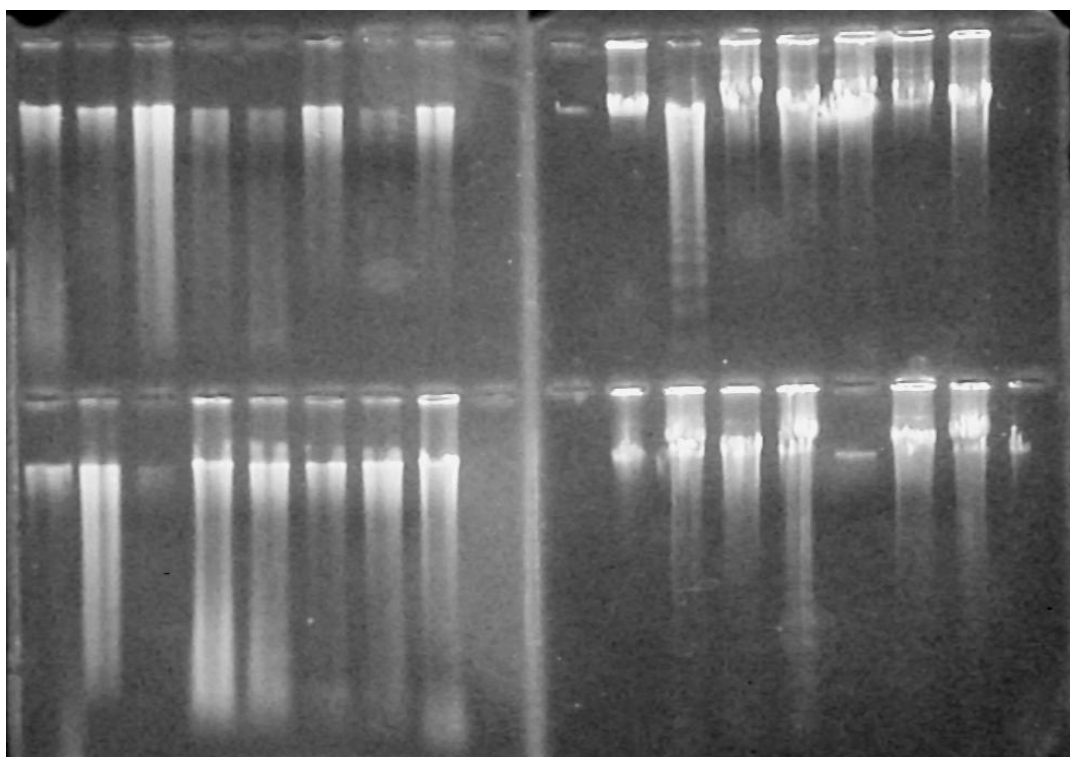
### FAMÍLIA 05



**Figura 2.** Heredogramas das famílias avaliadas: os quadrados representam o sexo masculino e os círculos o feminino. A cor vermelha representa os desdentados totais, a amarela os portadores de periodontite crônica, a preta os portadores de periodontite agressiva e a branca os periodontalmente saudáveis. As setas indicam os indivíduos que tiveram o DNA genotipado pelo chip.

Baseando-se nos 4 padrões básicos de herança monogênica: autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao sexo (X) dominante e ligado ao sexo (X) recessivo; podemos sugerir que nesta amostra de famílias com periodontite agressiva, o modo de herança assemelha-se ao autossômico dominante com penetrância muito alta ou completa.

A figura 3 mostra a eletroforese do gel de agarose do DNA extraído a partir do sangue venoso periférico (lado direito) e das células epiteliais descamadas da mucosa oral (lado esquerdo). A qualidade do DNA extraído com os dois métodos de coleta (bochecho e sangue) pode ser comparada, chegando-se à conclusão que o método alternativo testado na tese é eficaz, além de menos invasivo.



**Figura 3.** À esquerda eletroforese do gel de agarose do DNA obtido das células epiteliais descamadas da mucosa oral e extraído com o protocolo do kit (QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit 250, QIAGEN Sciences, USA) para extração de DNA. À direita eletroforese do gel de agarose do DNA obtido do sangue e extraído com o protocolo utilizado pelo laboratório de Bioquímica da UERJ. 1µl da amostra de DNA foi aplicado ao gel de agarose a 1% utilizando o TAE como tampão. A eletroforese foi executada a 5V/cm. O gel foi corado com 1mg/ml de brometo de etídeo e visualizado sobre uma luz ultravioleta.

O DNA extraído de cada um dos 4 indivíduos portadores de periodontite agressiva indicados na figura 1 foi analisado pelo chip para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA) que executou a genotipagem para mais de 10.000 SNPs.

Os genótipos dos 4 casos e do DNA de referência foram comparados baseados na hipótese de que o modo de herança seria autossômico dominante, segundo determinado na análise de segregação.

Para uma herança autossômica dominante, regiões de interesse seriam aquelas onde o genótipo dos 4 indivíduos coincidisse na forma heterozigota e fosse diferente do genótipo de referência.

Todas as quatro amostras de DNA analisadas com o chip puderam ter mais de 90% dos SNPs genotipados. Após a genotipagem verificamos 252 locais com esse perfil de herança autossômica dominante (genótipos heterozigotos), sendo que 7 desses loci apresentaram  $\geq 3$  SNPs cujo genótipos não puderam ser determinados e foram excluídos, totalizando 245 genótipos heterozigotos que coincidiram nos quatro indivíduos testados (2,45%).

Nos cromossomos 1, 8 e 10 foram encontrados 3 SNPs “vizinhos” com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados que diferiam do genótipo de referência (homozigoto) (Quadro 1). Essas regiões nos cromossomos 8 e 10 apresentaram alguns genótipos que não puderam ser determinados e foram excluídos, restando o locus no cromossomo 1.

dbSNP RS ID	Chr	Locus	03A	03H	01A	05A	Controle	Freq A Cauc	Freq Het Cauc	Freq A AfAm	Freq Het AfAm
rs1936147	10	111338259	BB	BB	AB	AB	BB	0,440	0,493	0,286	0,408

rs1936134	10	111458396	AB	AB	NoCall	NoCall	AA	0.512	0,5	0.381	0,472
rs1936133	10	111458677	AB	AB	AB	AB	BB	0.500	0,5	0.619	0,472
rs1853189	10	111523156	NoCall	AB	NoCall	AB	AA	0.643	0,459	0.512	0,5
rs953196	10	113280290	BB	BB	NoCall	NoCall	AB	0.369	0,466	0.179	0,295
rs718122	8	3146756	BB	BB	BB	AB	AB	0.650	0,455	0.257	0,382
rs718119	8	3147116	AB	AB	AB	NoCall	AA	0.952	0,091	0.810	0,308
rs1365280	8	3909528	AB	AB	NoCall	NoCall	BB	0.345	0,452	0.357	0,459
rs1365277	8	3909711	NoCall	AB	NoCall	NoCall	NoCall	0.667	0,444	0.577	0,488
rs1820437	8	3910104	AA	AA	AB	NoCall	AB	0.845	0,262	0.774	0,35
rs1340128	1	207328737	AA	AA	AA	AB	AB	0.619	0,472	0.607	0,477
rs1934614	1	207356607	AB	AB	AB	AB	BB	0.190	0,3078	0.423	0,488
rs1418973	1	207382734	AB	AB	AB	AB	AA	0.643	0,459	0.690	0,4276
rs1415249	1	208098497	AB	AB	AB	AB	BB	0.083	0,1522	0.621	0,4706
rs1578992	1	208599569	AA	AA	AB	AB	AA	0.750	0,375	0.600	0,48

**Quadro 1.** Dados sobre os cromossomos 1, 8 e 10 gerados pela análise com o Affymetrix GeneChip® 10K (Santa Clara, CA). Em destaque regiões de 3 SNPs “vizinhos” com genótipos heterozigotos idênticos que diferiram do genótipo controle (homozigoto). Em azul as frequências heterozigóticas dos 3 SNPs no cromossomo 1 em caucasianos e africanos.

No cromossomo 1, as frequências dos 3 SNPs com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados foram respectivamente 0,3078 / 0,459 / 0,1522 na população caucasiana e 0,488 / 0,4276 / 0,4706 na população americana de origem africana (quadro 1). Para constatar qual seria a chance de ter 3 pessoas de famílias diferentes nessas populações com esse genótipo, multiplicou-se cada uma das frequências 3 vezes por ela mesma e os 3 valores obtidos foram multiplicados entre eles, chegando a uma probabilidade de 0,000009 na população caucasiana e 0,0009 na população americana de origem africana. Probabilidades inferiores a 0.000005 seriam consideradas significativas, pois foi utilizada a correção de Bonferroni para testes múltiplos (0.05/10000). A probabilidade de esse evento ocorrer na população analisada (afro-brasileira) é provavelmente um valor entre as probabilidades de ocorrência em caucasianos e descendentes de africanos norte-americanos, portanto um valor próximo ao considerado estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni ( $p=0,000005$ ).

No cromossomo 1, os 3 SNPs “vizinhos” com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados que diferiam do genótipo controle (homozigoto) são identificados por rs1934614, rs1418973 e rs1415249 e estão localizados no intervalo 1q32.2-q32.3 do cromossomo 1 que possui 1.270.833 pares de bases (Tabela 1). Analisando este intervalo do cromossomo 1 no banco de dados genômicos da Universidade da Califórnia<sup>71</sup> pode-se observar a presença de 17 genes diferentes que codificam diferentes proteínas com funções específicas (quadro 2).

	ID DO GENE	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO	ESPECIFICIDADE TECIDUAL	DOENÇAS RELACIONADAS
1	KCNH1	Membro 1 da família H de canais de potássio	Mediar a corrente de sódio/potássio nos mioblastos	Proteína integral de membrana	Cérebro e mioblastos	Crescimento de células cancerígenas e proliferação de células tumorais.
2	RCOR3	REST corepressor 3		Núcleo	Desconhecida	Desconhecida
3	TRAF5	Receptor do TNF associado ao fator 5	Sinais de transdução de membranas da superfamília dos receptores TNF, associado com CD40 e parece envolvido em apoptose	Citoplasmática	Baço, timo, próstata, cólon e sangue periférico	Envolvida em processos inflamatórios e alguma relação com artrite e outras doenças auto-imunes.
4	BC031608	RCOR3	Desconhecida	Núcleo	Cérebro	Desconhecida
5	MGC14801	LOC84791	Desconhecida	Desconhecida	Vesícula	Desconhecida
6	C1orf36	C1orf36	Desconhecida	Desconhecida	Retina	Desconhecida
7	SLC30A1	Transportadora de zinco 1	Transporte de zinco para fora de célula	Proteína integral de membrana, provavelmente sobre a membrana plasmática	Desconhecida	Desconhecida
8	AY045701	NEK2B proteína kinase	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida
9	BC065932	NEK2	Desconhecida	Desconhecida	Útero	Desconhecida
10	NEK2	Serina/treonina proteína kinase NEK2	Envolvida na regulação mitótica, deve exercer uma função na meiose	Núcleo	Pele, placenta, nasofaringe e células T	Desconhecida
11	LPGAT1	FAM34A	Desconhecida	Proteína integral de membrana	Medula óssea	Desconhecida
12	BC020523	C1orf73 proteína	Desconhecida	Desconhecida	Pele	Desconhecida
13	BC033540	FLJ10399	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida
14	C1orf73	FLJ10736	Desconhecida	Desconhecida	Útero	Desconhecida
15	BC030716	FLJ12527	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida
16	DTL	FLJ14745	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida
17	AK027651	FLJ14745	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida

**Quadro 2.** Relação dos genes identificados no intervalo 1q32.2-32.



## 6. DISCUSSÃO

Vários estudos têm sugerido que a periodontite agressiva é fortemente influenciada por fatores genéticos<sup>25, 26, 39</sup>. Algumas evidências convincentes de que a suscetibilidade a infecções microbianas deve ser parcialmente determinada pelo genótipo do hospedeiro, têm emergido nas últimas décadas<sup>30</sup>, fato que motiva o desenvolvimento de estudos genéticos em periodontia.

A etiologia das periodontites agressivas envolve complexas interações entre fatores genéticos, microbianos e fatores de risco ambientais locais e sistêmicos modulando o curso imuno-inflamatório da doença. Os resultados de estudos populacionais e de agregação familiar<sup>69</sup> indicam que fatores genéticos parecem ter uma forte influência na suscetibilidade a periodontite agressiva.

Apesar de fatores ambientais fornecerem fatores de risco suficientes para o desenvolvimento da doença, indivíduos de uma mesma família não parecem ser igualmente suscetíveis a periodontite<sup>58</sup>. Por exemplo, indivíduos convivendo no mesmo ambiente, e expostos aos mesmos fatores de risco deveriam apresentar o mesmo fenótipo com relação à expressão da periodontite. Os heredogramas das famílias do presente estudo (Figura 2) e outros estudos em famílias com periodontite

agressiva<sup>6, 10</sup> sugerem que além dos conhecidos fatores de risco, fatores genéticos parecem influenciar a expressão da doença.

A maioria das evidências da influência genética na periodontite agressiva origina-se de análises de segregação<sup>44, 63, 8, 42</sup>. Sendo assim, um dos objetivos da tese foi fazer uma análise de segregação das famílias selecionadas, ou seja, determinar o modo de herança da periodontite agressiva nas famílias selecionadas.

Foram selecionados casos de periodontite agressiva obedecendo-se os critérios estabelecidos para o diagnóstico da doença e, a partir desses casos índices as famílias foram recrutadas. O limite de idade estabelecido ( $\leq 35$  anos) para o diagnóstico da periodontite agressiva não está de acordo com a classificação atual da Academia Americana de Periodontia (AAP)<sup>4</sup> que não utiliza o critério idade para a classificação da doença, mas este foi considerado na tese para excluir qualquer possibilidade de confusão no diagnóstico com periodontite crônica severa.

As análises de segregação das periodontites testam modelos estatísticos multifatoriais que incorporam fatores ambientais e/ou genéticos adicionais que possam modificar a expressão clínica da doença em indivíduos suscetíveis<sup>30</sup> e, sustentam a hipótese de um locus principal para a periodontite agressiva<sup>24</sup>. No presente estudo, nenhum modelo estatístico foi aplicado devido ao reduzido número e famílias e aos heredogramas característicos de herança autossômica dominante. Este resultado está de

acordo com o estudo clássico de análise de segregação em uma população de caucasianos (brancos) e afro-americanos (não brancos)<sup>42</sup>.

Estudos anteriores<sup>44, 63</sup> haviam sugerido que a periodontite agressiva era uma doença ligada ao sexo (X) dominante ou ainda que se tratava de uma doença autossômica recessiva<sup>8</sup>. A variabilidade dos resultados acima é atribuída aos diferentes métodos de diagnóstico e classificação da doença<sup>2</sup> e, no caso da hipótese de uma doença ligada ao sexo (X) dominante, o padrão de herança foi determinado baseado em observações da predominância do sexo feminino entre os casos índices e a carência de transmissões de pai para filho.

Analisando os critérios de classificação dos distúrbios genéticos<sup>68</sup>, a periodontite agressiva exibe características de um distúrbio genético monogênico (padrão de transmissão relacionado a um defeito em um único gene). Existem 4 padrões básicos de herança monogênica: autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao sexo (X) dominante e ligado ao sexo (X) recessivo. Os critérios de herança autossômica dominante são: o fenótipo aparece em todas as gerações da família e frequentemente a pessoa afetada tem um genitor afetado (como na família 1 e possivelmente nas demais famílias). Nos acasalamentos que produzem filhos com uma doença autossômica dominante, um genitor é geralmente heterozigótico para a mutação e o outro homozigótico para o alelo normal. Então cada filho tem 50% de chance de ser normal ou afetado. Em termos estatísticos, cada gestação é um “evento independente” não governado pelo resultado de gestações prévias; assim, dentro de uma família, a distribuição de indivíduos afetados e não afetados pode ser muito diferente de 1:1, como observado nas famílias da figura 2. Homens e mulheres têm a mesma probabilidade de transmitir o fenótipo aos filhos de ambos os sexos. Sendo assim, parece plausível sugerir o modo de herança autossômico dominante neste estudo. Apesar de não ser

possível afirmar com certeza que os pais das famílias 2 a 5 apresentaram periodontite agressiva, pois eles já eram desdentados totais ou apresentavam periodontite crônica no momento do exame, esta é a situação mais provável.

A população analisada no presente estudo é de etnia afro-brasileira, uma provável miscigenação de 3 etnias diferentes. Os dados desse estudo são comparados com estudos em populações caucasianas e de afro-americanos<sup>44, 63, 8, 42</sup> devido ao fato de não existirem na literatura trabalhos de análise de segregação de periodontites em população brasileira.

Com relação a penetrância, esta é definida como a probabilidade de um gene ter qualquer expressão fenotípica. É um conceito de tudo-ou-nada. Em termos estatísticos, é a percentagem das pessoas com um determinado genótipo e que estão afetadas, ou seja, exibindo o fenótipo<sup>68</sup>. Na presente análise de segregação, a penetrância parece muito alta ou completa porque não necessariamente as pessoas não afetadas têm a mutação para que o modelo autossômico dominante seja possível. Este resultado está de acordo com o estudo de análise de segregação<sup>42</sup> que encontrou penetrâncias altas, chegando a 73% em caucasianos e 70% em afro-americanos.

Outro objetivo do presente estudo foi testar um método alternativo de extração de DNA a partir de células epiteliais descamadas da mucosa oral após o bochecho com solução antisséptica alcoólica (Scope<sup>®</sup>). O método tradicional e mais utilizado nos estudos<sup>15, 77, 18, 52</sup> preconiza a coleta do sangue venoso periférico para a extração do DNA, já que existe uma vasta quantidade de células sangüíneas para a extração do DNA. Outro método encontrado na literatura para a obtenção de material genômico consiste na coleta de células epiteliais da mucosa jugal através de bochecho com 3% de glucose e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira<sup>70</sup>. O método alternativo testado demonstrou ser menos invasivo, além de bem aceito pelos indivíduos.

A qualidade do DNA extraído com os dois métodos de coleta (bochecho e sangue) foi analisada através da visualização da eletroforese em gel de agarose, chegando-se à conclusão que o método alternativo testado na tese é eficaz. Além disso, a qualidade do DNA extraído pela técnica do bochecho também mostrou ser suficiente para a sua posterior aplicação no chip para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 10K, Santa Clara, CA) que executou a genotipagem para mais de 10.000 SNPs, com um aproveitamento superior a 90%. O fato do DNA obtido com o método alternativo de coleta ser de boa qualidade é extremamente importante para o planejamento e execução de estudos futuros em ambientes odontológicos ou de campo, nos quais a coleta de sangue não é um procedimento simples e corriqueiro.

Apesar das amostras do DNA extraído a partir de células da mucosa oral terem funcionado satisfatoriamente na análise do chip da Affymetrix, apenas 4 indivíduos tiveram a genotipagem feita por ser esta uma tecnologia de custo muito elevado, impedindo o seu uso em larga escala. A disponibilização desta tecnologia de genotipagem através de chip em condições mais acessíveis pode tornar viável a análise de uma amostra maior, e com maior poder estatístico.

Os polimorfismos genéticos têm sido utilizados como marcadores para localizar genes causadores de doenças através de estudos de ligação e ou de associação<sup>67</sup>. Existem vários tipos de polimorfismos genéticos, porém os SNPs ocorrem mais freqüentemente do que qualquer outro; sua freqüência no genoma humano é estimada em 1 a cada 300 a 1.000 pares de bases<sup>59</sup>. Além disso, os SNPs são facilmente detectáveis utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR); porém, tecnologias mais recentes (rastreamento por chip) têm proporcionado maior praticidade nos processos de identificação dos SNPs, permitindo uma genotipagem rápida e eficiente de centenas a milhares de SNPs<sup>43, 53</sup>.

Em medicina, na área da genética humana, vários estudos têm utilizado a tecnologia do chip Affymetrix para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip®10K, Santa Clara, CA) como um estudo relacionado ao câncer de esôfago<sup>32</sup> e um estudo que visou identificar a frequência de defeitos cromossômicos na população em geral<sup>29</sup>. Recentemente, os estudos em genética buscam a base molecular da predisposição genética a periodontite, e vários polimorfismos genéticos estão sob análise a fim de se esclarecer suas funções no aumento da suscetibilidade à doença<sup>30</sup>. Um número crescente de estudos busca por polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias (genes candidatos para periodontites) que poderiam influenciar a progressão da periodontite agressiva<sup>2</sup>.

Os polimorfismos do gene da IL-1 têm sido associados com periodontite agressiva<sup>15, 51</sup>. Entretanto, alelos alternativos àqueles encontrados na periodontite crônica têm sido estudados, além de outros genes como o da IL-4<sup>48, 20</sup>, do FcγR<sup>34, 39</sup>, do TNFα<sup>16</sup>, da IL-10<sup>77, 18</sup>, MMP-1 e MMP-3<sup>33</sup> e do VDR<sup>28</sup>. Os estudos indicam que alguns polimorfismos parecem estar associados a periodontite agressiva em certos grupos étnicos. Entretanto, vários estudos com indivíduos pertencentes ao mesmo grupo étnico, frequentemente não alcançam resultados consistentes. Além disso, existem poucos estudos de análise dos haplótipos e das interações entre genes. Portanto, até o momento, nenhum fator de risco genético específico para a periodontite agressiva foi identificado de forma conclusiva<sup>40</sup>.

No presente estudo, os indivíduos que tiveram o DNA submetido a genotipagem foram escolhidos baseado no diagnóstico da periodontite agressiva e por pertencerem a

famílias consideradas com maior chance de terem uma predisposição genética à doença por apresentarem mais casos de periodontite agressiva. Coincidentemente os 4 indivíduos genotipados são do sexo feminino sendo que 2 deles são irmãos. Já o DNA de referência, fornecido pelo fabricante, pertence a um indivíduo do sexo masculino, sistemicamente saudável e de provável etnia caucasiana. Esse DNA de referência é uma amostra anônima e nenhuma informação sobre o indivíduo que forneceu essa amostra é fornecida pelo fabricante.

Os genótipos dos 4 casos e do DNA de referência foram comparados baseados na hipótese de que o modo de herança seria autossômico dominante, segundo determinado na análise de segregação. Para uma herança autossômica dominante, regiões de interesse seriam aquelas onde o genótipo dos 4 indivíduos coincidisse na forma heterozigota e fosse diferente do genótipo do controle.

Nos cromossomos 1, 8 e 10 foram encontrados 3 SNPs “vizinhos” com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados que diferiam do genótipo controle (homozigoto). Essas regiões nos cromossomos 8 e 10 apresentaram alguns genótipos que não puderam ser determinados e foram excluídas, restando o locus no cromossomo 1.

No cromossomo 1, os 3 SNPs “vizinhos” com genótipos heterozigotos idênticos nos 4 indivíduos analisados que diferiam do genótipo controle (homozigoto) são identificados por rs1934614, rs1418973 e rs1415249. As frequências desses 3 SNPs foram respectivamente 0,3078 / 0,459 / 0,1522 na população caucasiana e 0,488 / 0,4276 / 0,4706 na população americana de origem africana. A probabilidade de esse evento ocorrer na população analisada (afro-brasileira) é provavelmente um valor entre

as probabilidades de ocorrência em caucasianos e descendentes de africanos norte-americanos, portanto um valor bem próximo ao considerado estatisticamente significativo.

Analisando este intervalo do cromossomo 1 no banco de dados genômicos da Universidade da Califórnia<sup>71</sup> pode-se observar a presença de 17 genes diferentes que codificam diferentes proteínas com funções específicas. Dentre eles, o que mais despertou o interesse por estar envolvido em processos inflamatórios foi o gene identificado por fator 5 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF5) que codifica uma proteína que é membro da família de proteínas associada ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Esta proteína parece estar envolvida na patogênese de perda óssea em processos inflamatórios como na artrite reumatóide<sup>21</sup>, na indução do TNF a ativação e proteção de morte celular por apoptose<sup>65</sup>, na regulação da diferenciação de células T<sup>61</sup>, entre outras possíveis funções ainda desconhecidas. Futuramente, este gene pode ser sugerido como um potencial candidato para a suscetibilidade a periodontite agressiva e poderão ser implementados estudos de ligação ou de associação.

Este estudo pode ser considerado um estudo genético preliminar de famílias com periodontite agressiva e fez uma análise descritiva dos resultados obtidos. Futuramente, após a identificação de mais famílias segregando periodontite agressiva, um estudo de ligação capaz de fornecer



evidências com maior poder através do amplo mapeamento do genoma utilizando marcadores genéticos conhecidos para buscar genes predisponentes ou em ligação poderá ser executado. Os marcadores seriam utilizados para seguir a transmissão dos segmentos do cromossomo dentro das famílias e/ou através das famílias, buscando as correlações entre a transmissão de uma região cromossomal específica e a transmissão da doença. Quando a localização cromossomal dos marcadores é conhecida eles podem ser avaliados por análise de ligação. Uma outra abordagem seria comparar entre casos e controles as frequências de polimorfismos localizados em genes candidatos, cujas proteínas executam uma função na resposta imuno-inflamatória.

## 7. CONCLUSÕES

1. O modo de herança da periodontite agressiva nestas famílias parece ser autossômico dominante com penetrância muito alta ou completa.
2. O método alternativo de coleta de células visando à obtenção de material genômico, além de menos invasivo, mostrou-se adequado aos objetivos propostos, funcionando satisfatoriamente para a tecnologia do chip para genotipagem de SNPs (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup>10K, Santa Clara, CA), possibilitando uma genotipagem superior a 90% dos SNPs.
3. Foi identificada uma região no intervalo 1q32.2-32.3 do cromossomo 1 com 3 SNPs com genótipos heterozigotos idênticos que diferiam do genótipo de referência ( $p < 0,000005$ ). Neste intervalo ocorreu a presença de 17 genes candidatos, sendo que, em especial, o TRAF5 está envolvido em processo

inflamatório, codificando uma proteína da família dos receptores de TNF.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANDAR, J.M. Prevalence of incipient radiograph periodontal lesions in relation to ethnic background and dental care provisions in young adults. **Journal of Clinical Periodontology**, v.16, p. 625-29, 1989.
2. ALBANDAR, J.M.; RAMS, T.E. Risk factors for periodontitis in children and young persons. **Periodontology 2000**, v. 29, p. 207-22, 2002.
3. ALBANDAR, J.M.; TINOCO, E.M. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. **Periodontology 2000**, v. 29, p. 153-176, 2002.

4. ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Annals of Periodontology**, v. 4, p. 1-6, 1999.
5. BEATY, T.H.; BOUGHMAN, J.A.; YANG, P.; ASTEMBORSKI, J.A.; SUZUKI, J.B. Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. **American Journal of Human Genetics**, v. 40, p. 443-52, 1987.
6. BENJAMIN, S.D.; BAER, P.N. Familial patterns of advanced alveolar bone loss in adolescence (periodontosis). **Periodontics**, v. 5, p. 82-88, 1967.
7. BOUGHMAN, J.A.; HALLORAN, S.L.; ROULSTON, D.; SCHWARTZ, S.; SUZUKI, J.B.; WEITKAMP, I.R.; WENK, R.E.; WOOTEN, R.; COHEN, M.M. An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. **Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology**, v.6, p. 341-50, 1986.
8. BOUGHMAN, J.A.; BEATY, T.H.; YANG, P.; GOODMAN, S.B.; WOOTEN, R.K.; SUZUKI, J.B. Problems of genetic model testing in early onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 59, p. 332-37, 1988.
9. BOUGHMAN, J.; ASTEMBORSKI, J.; BLITZER, M. Early onset periodontitis: a genetics perspective. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 1, p. 89-99, 1990.
10. BUTLER, J.H. A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). **Journal of Periodontology**, v. 40, p. 115-118, 1969.
11. CALIFANO, J.V. Position paper: periodontal disease and children and adolescents. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 11, p. 1696-1704, 2003.
12. CHUNG, H-Y; LU, H-C; CHEN, W-L; LU, C-T; YANG, Y-T, TSAI, C-C. Gm (23) allotypes and Fcγ receptor genotypes as risk

- factors for various forms of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 954-960, 2003.
13. COGEN, R.B.; ROSEMAN, J.M.; AL JORUBI, W.; LOUV, W.C.; ACTON, R.T.; BARGER, B.O.; GO, R.C.; RASMUSSEN, R.A. Host factors in juvenile periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 65, p. 394-399, 1986.
  14. DIEHL, S.R. Human disease gene mapping. In: Meyers, R.A. **Encyclopedia of Molecular Biology: Fundamentals and Applications**. New York: VCH Publishers Inc, 1996, p. 221-27.
  15. DIEHL, S.R.; WANG, Y.F.; BROOKS, C.N. et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 70, p. 418-30, 1999.
  16. ENDO, M.; TAI, H.; TABETA, K. et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in japanese patients with early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 72, p. 1554-59, 2001.
  17. FU, Y.; KOROSTOFF, J.M.; FINE, D.H.; WILSON, M.E. Fcγ receptor genes as risk markers for localized aggressive periodontitis in african-americans. **Journal of Periodontology**, v. 73, p. 517-23, 2002.
  18. GONZALES, J.R.; MICHEL, J.; DIETE, A. et al. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 816-22, 2002.
  19. GONZALES, J.R.; MICHEL, J.; RODRÍGUEZ, E.L. et al. Comparison of interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. **European Journal of Oral Sciences**, v.111, p. 395-99, 2003.
  20. GONZALES, J.R.; KOBAYASHI, T.; MICHEL, J. et al. Interleukin-4 gene polymorphisms in japanese and caucasian patients with

- aggressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, p. 384-89, 2004.
- 21.GRAVALLESE, E.M.; GOLSON, D.L.; GOLDRING, S.R.; AURON, P.E. The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption. **Arthritis Research**, v. 3, p. 6-12, 2001.
- 22.HART, T.C.; MARAZITA, M.L.; SCHENKEIN, H.A.; BROOKS, C.N.; GUNSOLEY, J.G.; DIEHL, S.R. No female preponderance in juvenile periodontitis after correction for ascertainment bias. **Journal of Periodontology**, v. 62, p. 745-49, 1991.
- 23.HART, T.C.; MARAZITA, M.L.; SCHENKEIN, H.A.; DIEHL, S.R. Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 63, p. 169-73, 1992.
- 24.HART, T.C. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 67, p. 355-66, 1996.
- 25.HART, T.C.; KORNMANN, K.S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, p. 202-15, 1997.
- 26.HART, T.C.; MARAZITA, M.L.; WRIGHT, J.T. The impact of molecular genetics on oral paradigms. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.70, p. 1032-38, 2000.
- 27.HASSELL, T.M.; HARRIS, E.L. Genetic influences in caries and periodontal diseases. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 6, p. 319-42, 1995.
28. HENNING, B.J.; PARKHILL, J.M.; CHAPPLE, I.L.; HEASMAN, P.A.; TAYLOR, J.J. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v.70, p. 1032-38, 1999.
- 29.HERR, A.; GRÜTZMANN, R.; MATTHAEI, A.; ARTELT, J.; SCHROCK, E.; RUMP, A.; PILARSKY,C. High-resolution analysis of chromosomal imbalances using the Affymetrix 10K genotyping chip. **Genomics**, v. 85, n. 3, p. 392-400, 2005.

30. HODGE, P.J.; MICHALOWICZ, B.S. Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. **Periodontology** 2000, v. 26, p. 113-34, 2001.
31. HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European caucasians with generalised early onset periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 430-36, 2001.
32. HU, N.; WANG, C.; HU, Y.; YANG, H.H.; GIFFEN, C.; TANG, Z.; HANG, X.; GOLDSTEIN, A.M.; BUCK, M.R.; BUETOW, K.H.; TAYLOR, P.R.; LEE, M.P. Genome-wide association study in esophageal cancer using gene chip mapping 10K array. **Cancer Research**, v. 65, p. 2542-46, 2005.
33. ITAGAKI, M.; KUBOTA, T.; TAI, H. et al. Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in japanese patients with periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, p. 764-69, 2004.
34. KOBAYASHI, T.; SUGITA, N.; VAN DER POL, W.L.; NUNOKAWA, Y.; WESTERDAAL, N.A.; YAMAMOTO, K.; VAN DE WINKEL, J.G.; YOSHIE, H. The Fcγ receptor genotype as a risk factor for early-onset periodontitis in japanese patients. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 1425-32, 2000.
35. LANDER, E.S.; SCHORK, N.J. Genetic dissection of complex traits. **Sciences**, v. 265, p. 2037-2048, 1994.
36. LI, Q.Y.; ZHAO, H.S.; MENG, H.X. et al. Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a chinese population. **Journal of Periodontology**, v. 75, p. 1627-35, 2004.
37. LONG, J.C.; NANCE, W.E.; WARING, P.; BURMEISTER, J.A.; RANNEY, R.R. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. **Genetical Epidemiology**, v. 4, p. 13-24, 1987.

38. LOOS, B.G.; LEPPERS-VAN DE STRAAT, F.G.; VAN DE WINKEL, J.G. et al. Fcy receptor polymorphisms in relation to periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 595-602, 2003.
39. LOOS, B.G.; VAN DER VELDEN, U. Genetics in relation to periodontitis. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, .P. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 4. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 387-99.
40. LOOS, B.G.; JOHN, R.P.; LAINE, M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *In press*, 2005.
41. LÓPEZ, N.J.; JARA, L.; VELENZUELA, C.Y. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 234-43, 2005.
42. MARAZITA, M.L.; BURMEISTER, J.A.; GUNSOLLEY, J.C.; KOERTGE, T.E.; LAKE, K.; SCHENKEIN, H.A. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 65, p. 623-30, 1994.
43. MARSHALL, A.; HODGSON, J. DNA chips: an array of possibilities. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 27-31, 1998.
44. MELNICK, M.; SHIELDS, E.D.; BIXLER, D. Periodontosis: A phenotypic and genetic analysis. **Oral Surgery**, v. 42, p. 32-41, 1976.
45. MICHALOWICZ, B.S.; AEPPLI, D.; VIRAG, J.G.; KLUMP, D.G.; HINRICHS, J.E.; SEGAL, N.L.; BOUCHARD, T.J.; JR.; PIHLSTROM, B.L. Periodontal findings in adults twins. **Journal of Periodontology**, v. 62, p. 293-99, 1991.
46. MICHALOWICZ, B.S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.65, p. 479-88, 1994.
47. MICHALOWICZ, B.S.; DIEHL, S.R.; GUNSOLLEY, J.C.; SPARKS, B.S.; BROOKS, C.N.; KOERTGE, T.E.; CALIFANO,



- J.V.; BURMEISTER, J.A.; SCHENKEIN, H.A. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 1699-707, 2000.
48. MICHEL, J.; GONZÁLES, J.R.; WUNDERLICH, D. et al. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 483-88, 2001.
49. PAGE, R.C.; VANDESTEEN, G.E.; EBERSOLE, J.L.; WILLIAMS, B.L.; DIXON, I.L.; ALTMAN, L.C. Clinical and laboratory studies of a family with high prevalence of juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 56, p. 602-610, 1985.
50. PAGE, R.C.; STURDIVANT, E.C. Noninflammatory destructive periodontal disease (NDPD). **Periodontology 2000**, v.30, p. 24-39, 2002.
51. PARKHILL, J.M.; HENNING, B.J.; CHAPPLE, I.L. et al. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, p. 682-89, 2000.
52. QUAPPE, L.; JARA, L.; LÓPEZ, N.J. Association of Interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 75, p. 1509-515, 2004.
53. RAMSAY, G. DNA chips: state of the art. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 40-44, 1998.
54. ROSLING, B.G.; SLOTS, J.; WEBBER, R.L.; CHRISTERSSON, L.A.; GENCO, R.J. Microbiological and clinical effects of topical subgingival antimicrobial treatment on human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 10, p. 487-514, 1983.
55. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.L. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2 ed. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- 56.SAXÉN, L. Heredity of juvenile periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 7, p. 276-88, 1980.
- 57.SAXÉN, L.; NEVANLINNA, H.R. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. **Clinical Genetics**, v. 25, p. 332-335, 1984.
- 58.SCHENKEIN, H.A. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? **Periodontology 2000**, v.30, p. 79-90, 2002.
- 59.SCHORK, N.J.; FALLIN, D.; LANCHBURY, S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clinical Genetics**, v. 58, p. 250-64, 2000.
- 60.SHAPIRA, L.; STABHOLZ, A.; RIECKMANN, P.; KRUSE, N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-  $\alpha$  promoter region in families with localized early-onset periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 36, p. 183-86, 2001.
- 61.SO, T.; SALEK-AEDAKANI, S.; NAKANO, H.; WARE, C.F.; CRAFT, M. TNF receptor-associated factor 5 limits the induction of Th2 immune responses. **Journal of Immunology**, v.172, p. 4292-4297, 2004.
- 62.SOFAER, J.A. Genetic approaches in the study of periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, p. 401-408, 1990.
- 63.SPEKTOR, M.D.; VANDESTEEEN, G.E.; PAGE, R.C. Clinical studies of one family manifesting rapidly progressive, juvenile and prepubertal periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 56, p. 93-101, 1985.
- 64.SUSIN, C.; ALBANDAR, J.M. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 468-75, 2005.
- 65.TADA, K.; OKAZAKI, T.; SAKON, S.; KOBARAI, T.; KUROSAWA, K. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor

- necrosis factor-induces NF- $\kappa$ B activation and protection from cell death. **The journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36530-365341, 2001.
66. TAI, H.; ENDO, M.; SHIMADA, Y. et al. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 882-88, 2002.
67. TAYLOR, J.J.; PRESHAW, P.M.; DONALDSON, P.T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v.35, p.158-82, 2004.
68. THOMPSON & THOMPSON. **Genética Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993.
69. TINOCO, E.M.B; BELDI, M.I.; LOUREIRO, C.A. et al. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, p. 9-14, 1997.
70. TREVILATTO, P.C.; TRAMONTINA, V.A.; MACHADO, M.A. et al. Clinical genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 233-39, 2002.
71. **UCSC GENOME BIOINFORMATICS**.  
Disponível em <<http://www.genome.ucsc.edu>>. Acesso em: 07 ago. 2005.
72. VIEIRA, A.R. **Estudos epidemiológico, genético e molecular de fendas orais em populações latino-americanas**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/ Genética). Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
73. VYSE, T.J.; TODD, J.A. Genetic analysis of autoimmune disease. **Cell**, v. 85, p. 311-18, 1996.
74. WALKER, S.J.; VAN DYKE, T.E.; RICH, S. et al. Genetic polymorphisms of the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  genes in African-American

- LJP patients and an african-american control population. **Journal of Periodontology**, v.71, p. 723-28, 2000.
- 75.WEINBERG, R.A. How cancer arises. **Scientific American**, Sep, p. 32-40, 1996.
- 76.WESTON, A.; GODBOLD, J.H. Polymorphisms of H-ras and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 4, p. 919-26, 1997.
- 77.YAMAZAKI, K.; TABETA, K.; NAKAJIMA, T. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in japanese patients with adult and early-onset periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 828-32, 2001.

# 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](#)