



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE PRÓ-CENTRO-OESTE

JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO

**POLIMORFISMOS DE GENES DE INTERLEUCINAS CONTRIBUEM
PARA A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA DOENÇA
PERIODONTAL CRÔNICA**

Goiânia
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

João Antonio Xavier Manso

3. Título do trabalho

POLIMORFISMOS DE GENES DE INTERLEUCINAS CONTRIBUEM PARA A
SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Carlos da Silva, Usuário Externo**, em 10/09/2020, às 19:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO, Discente**, em 11/09/2020, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1544054** e o código CRC **A549B0DF**.

JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO

**POLIMORFISMOS DE GENES DE INTERLEUCINAS CONTRIBUEM
PARA A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA DOENÇA
PERIODONTAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste, como um requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Goiânia
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Xavier Manso, João Antonio
POLIMORFISMOS DE GENES DE INTERLEUCINAS
CONTRIBUEM PARA A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA DOENÇA
PERIODONTAL CRÔNICA [manuscrito] / João Antonio Xavier Manso. -
2020.
72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2020.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Interleucina. 2. Periodontite. 3. Polimorfismo Genético. 4.
Predisposição Genética para Doença. I. , Cláudio Carlos da Silva,
orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE JOÃO ANTONIO XAVIER MANSO - Aos vinte e oito dias do mês de abril do ano de 2020 (28/04/2020), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **Cláudio Carlos da Silva (PUC/GO)** (orientador), **Aparecido Divino da Cruz (PUC/GO)**, **Lysa Bernardes Minasi (PUC/GO)**, **Emília Oliveira Alves Costa (PUC/GO)** e **Alex Silva da Cruz (PUC/GO)** para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública por webconferência, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E HÁBITOS DE HIGIENE ORAL NA SUSCETIBILIDADE À DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA”**, em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **JOÃO ANTONIO XAVIER MANSO**, discente do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador do discente, Prof. Dr. **CLÁUDIO CARLOS DA SILVA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Aprovado / Reprovado

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
_____ Aprovado _____

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
_____ Aprovado _____

Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi
_____ Aprovado _____

Profa. Dra. Emília Oliveira Alves Costa
_____ Aprovado _____

Prof. Dr. Alex Silva da Cruz
_____ Aprovado _____

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato

Habilitado, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOCTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, na área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 14 h 05 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

POLIMORFISMOS DE GENES DE INTERLEUCINAS CONTRIBUEM PARA A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA



Documento assinado eletronicamente por **Emília Oliveira Alves Costa**, **Usuário Externo**, em 04/05/2020, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lysa Bernardes Minasi**, **Usuário Externo**, em 04/05/2020, às 19:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Carlos da Silva**, **Usuário Externo**, em 04/05/2020, às 20:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aparecido Divino da Cruz**, **Usuário Externo**, em 06/05/2020, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALEX SILVA DA CRUZ**, **Usuário Externo**, em 06/05/2020, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1274563 e o código CRC 472D3DBD.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Gonçalves Manso Filho e Edna Souza Xavier Manso, pelo amor incondicional, paciência e amparo oferecidos ao longo da minha vida. Não seria possível sem vocês!

À minha namorada Fernanda Paula Arantes, MSc, a qual tanto admiro e me espelho. É um privilégio cultivar sentimentos tão genuínos ao seu lado. Agradeço pelo carinho, cuidado e incentivo constantes. Suas contribuições na confecção dos manuscritos foram de grande relevância para esta pesquisa.

À minha família, parentes, amigos e pessoas próximas, pelo apoio e solidariedade durante todo o processo. Agradeço, em especial, aos meus irmãos Hellen Xavier Manso e Guilherme Xavier Manso.

Ao Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva, pela oportunidade de ser mais uma vez seu orientando. Agradeço também pelo apoio e auxílio prestado durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto), pela paciência e cuidado durante as correções, ensinamentos e conselhos, os quais foram de extrema valia para o presente trabalho e, também, para a minha formação.

À Prof.^a Dr.^a Lysa Bernardes Minasi, pelas contribuições durante o desenvolvimento deste estudo e por aceitar o convite como avaliadora do mesmo.

À Prof.^a Dr.^a Eneida Franco Vêncio, pelas sugestões e demais contribuições para adequação deste trabalho. Agradeço também por aceitar o convite como avaliadora durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Alex Silva da Cruz, pela colaboração durante a confecção do projeto de pesquisa e por aceitar o convite como avaliador deste produto final.

À Prof.^a Dr.^a Emília Oliveira Alves Costa, por aceitar o convite como avaliadora deste estudo. Agradeço também pelas sugestões e demais contribuições.

Ao Prof. Dr. Danilo Conrado Silva, por aceitar o convite como avaliador suplente do presente estudo.

Aos professores, Dr. André Kipnis e Dr. Cirano José Ulhoa, coordenadores do programa de Pós-graduação, Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste/ Goiás, pelo auxílio e apoio prestado durante o curso.

Aos voluntários que se submeteram aos procedimentos necessários para a obtenção das amostras biológicas. Muito obrigado por participarem!

Ao Prof. Renato Hannum, MSc, pela execução dos exames clínicos e demais contribuições.

Aos colegas e amigos Jakeline Soares Fortes, Sabrina Sara Moreira Duarte, Esp. Eduardo Rocha Pedrosa, Calebe Bertolino Marins de Campos, MSc, Alessandro Arruda Alves, MSc, Lilian de Souza Teodoro, MSc, Damiana Mirian da Cruz e Cunha, MSc, Marcos Vinícius Milki, MSc, Dr. Macks Wendhell Gonçalves, Dr.^a Fernanda Ribeiro Godoy, Dr.^a Irene Plaza Pinto. Muito obrigado pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da PUC Goiás, que considero como uma segunda casa, por disponibilizar os recursos e espaço para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também a cada técnico, estagiário, professor e estudante vinculados a esta unidade.

Ao Laboratório de Mutagênese (LABMUT) da UFG, por permitir o uso do espaço e dos equipamentos necessários para a continuidade e condução dos trabalhos. Agradeço também à Dr.^a Daniela de Melo e Silva, aos demais professores e estudantes vinculados a esta unidade.

Ao programa de Pós-graduação, Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste, pela oportunidade oferecida. Agradeço também aos professores, secretários e colegas (estudantes), pelo apoio e demais contribuições prestadas durante o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, por fomentar o presente estudo (FAPEG- Chamada Pública Universal n° 05/2012).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A doença periodontal crônica (DPC) caracteriza-se como uma condição inflamatória recorrente nos tecidos de sustentação dos dentes, causada por infecções bacterianas e processos autodestrutivos de atividade imune mediados por citocinas pró-inflamatórias, das quais se destacam as interleucinas 1 β , 6 e 8 que, juntamente com outras biomoléculas, compõem os mecanismos iniciais da imunidade inata. Essas moléculas podem ter variações em seus genes, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que em conjunto com fatores ambientais, representam parâmetros potenciais nas análises de suscetibilidade à doença. O objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento de variantes genéticas dos genes *IL1B* (rs1143634), *IL6* (rs1800795, rs1800796) e *CXCL8* (rs4073, rs2227306 e rs2227539), assim como aspectos sociodemográficos e de estilo de vida, com a suscetibilidade à DPC em um grupo de voluntários goianienses. Amostras de sangue periférico de 152 voluntários foram obtidas via punção venosa, constituindo em 101 controles e 51 casos (DPC), agrupados segundo o resultado do periograma, previamente executado em conjunto com o questionário de hábitos e estilo de vida. O DNA das amostras foi extraído utilizando *kits* comerciais e genotipado por técnicas de PCR-RFLP e qPCR, conforme a estratégia adotada para o marcador molecular empregado. Os dados foram tabulados e submetidos aos testes estatísticos, todos a 5% de significância. Os resultados evidenciaram uma tendência significativa no acometimento à DPC nos indivíduos que escovam os dentes menos de duas vezes por dia. Os alelos de menor frequência das variantes rs1143634, rs1800796 e rs2227539 estiveram associados à DPC, detectando-se um efeito preditivo significativo ($p < 0,05$). Destaque para os alelos T (rs1143634) e C (rs1800796), que foram associados ao aumento do risco, quando inferidos individualmente e em conjunto. Os aspectos multifatoriais da doença foram confirmados, relatando-se a influência de componentes genéticos e ambientais na suscetibilidade, uma vez que os alelos de menor frequência dos genes *IL1B* (rs1143634 T), *IL6* (rs1800796 C), *CXCL8* (rs2227539 A) e a baixa frequência de escovação estiveram, respectivamente, associados com a predição e tendência à DPC.

PALAVRAS-CHAVE: Interleucina. Periodontite. Polimorfismo Genético. Predisposição Genética para Doença.

ABSTRACT

Chronic periodontal disease (CPD) is described as a recurrent inflammatory condition in the tooth supporting tissues, caused by bacterial infections and self-destructive processes of immune activity mediated by pro-inflammatory cytokines, of which the interleukins 1 β , 6 and 8 that, together with other biomolecules, makes up the initial mechanisms of innate immunity. These molecules may have variations in their genes, such as single nucleotide polymorphisms (SNP), which together with environmental factors represent potential parameters in analyzes of susceptibility to the disease. The aim of this study was to investigate the involvement of polymorphisms of the *IL1B*, *IL6* and *CXCL8* genes, as well as sociodemographic and lifestyle aspects, with susceptibility to chronic periodontal disease in a group of volunteers from Goiânia city. Peripheral blood samples from 152 volunteers were obtained via venipuncture and grouped into controls and a case group (CPD), according to the result of the periogram, previously performed together with the questionnaire of habits and life style. The DNA of the samples was extracted through commercial kits and genotyped using the PCR-RFLP and qPCR techniques, according to the strategy adopted for the molecular marker used. The data were tabulated and submitted to the adequate statistical tests, all at 5% significance. A significant trend to develop CPD was detected for individuals who brush their teeth less than twice a day. The allele of minor frequency of the variants rs1143634, rs1800796, and rs2227539 were associated with CPD, revealing a significant predictive effect ($p < 0.05$). Highlight for the T (rs1143634) and C (rs1800796) alleles, which were associated with increased risk, when inferred individually and together. Multifactorial aspects of disease have been confirmed, reporting the influence of genetic and environmental components on susceptibility, since minor frequency alleles of *IL1B* (rs1143634 T), *IL6* (rs1800796 C), *CXCL8* (rs2227539 A) genes and a low brushing frequency were associated, respectively, with the prediction and tendency to CPD.

KEYWORDS: Interleukin. Periodontitis. Genetic Polymorphism. Genetic Predisposition to Disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Progressão dos eventos de patogênese que encaminham o quadro clínico da doença periodontal crônica.	27
FIGURA 2. Produtos de PCR de 194pb em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.	38
FIGURA 3. Gel de poliacrilamida a 8%, expondo os fragmentos de restrição do produto de PCR. Alelo 1 (A1) = 12pb + 85pb + 97pb e alelo 2 (A2) = 12pb + 182pb, correspondendo a C e T, respectivamente. O fragmento de 12pb não foi detectado para esta metodologia.	39
FIGURA 4. Representação gráfica da distribuição dos genótipos de rs1800795 do gene <i>IL6</i> após a reação de qPCR. Legenda: Círculos vermelhos = Homozigotos para citosina; Círculos verdes = Heterozigotos guanina/citosina; Círculos azuis = Homozigotos para guanina; Quadrado Preto = Controle Negativo.	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) e os fragmentos de restrição do <i>amplicon</i> de 194pb, referente ao SNP rs1143634 do gene <i>IL1B</i>	38
TABELA 2. Componentes da reação de qPCR, volume e concentração final na mistura.	41
TABELA 3. Relação das sondas usadas nas reações de qPCR para a obtenção do padrão polimórfico das variantes.....	41
TABELA 4. Valores quantificados das variáveis sociodemográficas, estilo de vida, aspectos clínicos entre os grupos estudados e seus respectivos valores de <i>p</i> (quando aplicáveis).	43
TABELA 5. Frequência genotípica e alélica dos grupos para cada SNP estudado, valores de <i>p</i> referente a análise do HWE e ao teste Qui-Quadrado (análise da distribuição).	45
TABELA 6. Frequência genotípica ajustada em função do alelo de risco e valor de <i>p</i> obtido da análise de distribuição (Qui-Quadrado).....	46
TABELA 7. Frequências dos Haplótipos dos genes <i>IL6</i> (rs1800795 e rs1800796), <i>CXCL8</i> (rs4073, rs2227306 e rs2227539) resultados da análise de distribuição, entre os grupos, mediante o teste Qui-Quadrado.	47
TABELA 8. Resultados da análise de Regressão Logística Binária, onde a variável dependente, grupos, foi calculada em função dos genótipos ajustados (SNPs). A análise inclui o cálculo do <i>odds ratio</i>	48
TABELA 9. Resultados da análise de Regressão Logística Binária (fatores interação), onde a variável dependente, grupos, foi calculada em função dos SNPs rs1143634 e rs1800796 combinados.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A1	Alelo 1
A2	Alelo 2
A	Adenina
AAP	Academia Americana de Periodontologia
C	Citosina
CXCL8	Gene da Interleucina 8
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Do Inglês: <i>Deoxynucleotides Phosphated</i> - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Doença Periodontal
DPA	Doença Periodontal Agressiva
DPC	Doença Periodontal Crônica
EDTA	Do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético
EFP	Do inglês: <i>European Federation of Periodontology</i> - Federação Europeia de Periodontologia
G	Guanina
HWE	Do inglês: <i>Hardy–Weinberg equilibrium</i> – Equilíbrio de Hardy–Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
<i>IL1B</i>	Gene da Interleucina 1 Beta
<i>IL1RN</i>	Gene Antagonista de Receptores de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
<i>IL6</i>	Gene da Interleucina 6
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPC	Índice Periodontal Comunitário
KCL	Cloreto de Potássio
LABMUT	Laboratório de Mutagênese
LPS	Lipopolissacarídeos
MMPs	Do Inglês: <i>Matrix Metalloproteinases</i> - Metaloproteinases de Matriz
mRNA	Do Inglês: <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico Mensageiro

NFκB	Do Inglês: <i>Nuclear Factor Kappa B Cells</i> - Fator Nuclear Kappa B
NPR	Núcleo de Pesquisas Replicon
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Do Inglês: <i>Odds ratio</i> – razão de chances
<i>p</i>	Valor de probabilidade
PAMPS	Do Inglês: <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> - Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Par de base
PCR	Do Inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PUC Goiás	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
qPCR	Do inglês: <i>Polymerase chain reaction quantitative real time</i> - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
RANK	Do Inglês: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i> - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
RANKL	Do Inglês: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i> - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B Ligante
RFLP	Do Inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
SNP	Do Inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T	Timina
TBE	Tris Borato de EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TLR	Do Inglês: <i>Toll-like Receptors</i> - Receptores do Tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tris-HCL	Hidroximetil aminometano e Ácido Clorídrico (Tampão)
UFG	Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Classificação	21
2.2	Caracterização e Epidemiologia da Doença Periodontal Crônica	22
2.3	Patogênese	24
2.4	Interleucina 1 beta	27
2.5	Interleucina 6	29
2.6	Interleucina 8	30
2.7	Aspectos Genéticos	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAS E MÉTODOS	36
4.1	Descrição do Grupo Amostral	36
4.2	Avaliação pelo Exame Periodontal	36
4.3	Obtenção das Amostras e o Isolamento do DNA Genômico	37
4.4	Identificação do Polimorfismo rs1143634 – PCR-RFLP	37
4.5	Rastreamento dos SNPs rs1800795, rs1800796, rs4073, rs2227306 e rs2227539	39
4.6	Análise dos Dados e Interpretação dos Resultados	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	APÊNDICE I	73
	APÊNDICE II	75
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

Na década de 2000, ocorreram diversos avanços na área da genética humana, os quais proporcionaram o conhecimento amplo das variantes de sequência de DNA, que se relacionam ao aumento do risco de uma variedade de doenças complexas comuns (ARNAR; PALSSON, 2017). Durante esse período, o Projeto Genoma Humano e Projeto HapMap procederam com o objetivo de comunicar os seus respectivos dados, os quais foram disponibilizados publicamente. Esses bancos de dados, contribuíram com diversas informações como o mapa da variação genética humana, sequências de referência do genoma humano, além do desenvolvimento de metodologias que viabilizaram análises mais concisas e acuradas de amostras do genoma (KRASSOWSKI et al., 2018; INTERNATIONAL, 2005; HUMAN, 2004).

Os progressos na área de genética permitiram a compreensão da estrutura haplotípica do genoma humano, de forma que as análises de gene candidato e o implemento de análises em *microarray*, a qual possibilita a obtenção rápida de genótipos, beneficiaram estudos baseados na suscetibilidade genética. Dessa forma, variantes genéticas comuns passaram a ser investigadas tanto por genotipagem simultânea quanto por métodos convencionais (ARNAR; PALSSON, 2017; MACARTHUR et al., 2017; TABA; SOUZA; MARIGUELA, 2012).

Diferente dos subtipos monogênicos ou distúrbios mendelianos, as doenças complexas se caracterizam como uma classe de enfermidades, nas quais tanto a suscetibilidade genética quanto os elementos ambientais estão envolvidos na etiologia da condição. Nessas situações, os aspectos genéticos não são determinantes, mas inferidos como fatores de propensão para a doença (BIJANZADEH, 2017; BECKER et al., 2011; DEBRET et al., 2011). Os elementos genéticos e os fatores ambientais têm sido relacionados com o risco de afecção para condições comuns (MÜLLER et al., 2016; LANDER; SCHORK, 1994) como: diabetes, câncer, doenças cardíacas, entre outras (BURTON et al., 2007; HIRSCHHORN et al., 2002).

A partir desta concepção se incluem as doenças periodontais (DPs), as quais consistem em doenças complexas. As DPs possuem um conjunto de diversos fatores que atuam no desenvolvimento da patologia (LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012). Entre esses, destaca-se o biofilme (placa dentária), o qual é apontado como um fator necessário, mas não determinante na causa patológica da doença (MARK BARTOLD; VAN DYKE, 2013; LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012).

A DP segue os padrões das enfermidades complexas, para as quais o processo patológico está vinculado à interação ambiente/hospedeiro, com variação contínua. Desse modo, os fatores genéticos apresentam um papel modulador que influencia na inflamação crônica das mucosas

e a conseqüente perda do osso alveolar. Isto posto, subentende-se que a suscetibilidade genética pode estar relacionada com os agravos da doença, os quais podem influenciar na prevenção e terapia da DP (TETTAMANTI et al., 2017).

A doença periodontal crônica (DPC) é considerada a forma mais prevalente das patologias periodontais (NAZIR, 2017; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Esta condição ocorre em distribuição desigual, incide somente em alguns indivíduos de uma população e em dentes específicos, os quais passam por destruição avançada (NUTO; NATIONS; COSTA, 2007), apresentando-se como uma doença inflamatória, iniciada por bactérias patológicas presentes na placa subgengival (biofilme) (CHOLEWA; MADZIARSKA; RADWAN-OCZKO, 2018; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Os processos inflamatórios se constituem em uma característica proeminente das doenças crônicas, sendo descritos como componentes fundamentais no decurso patológico, implicados no envolvimento de mediadores proteicos de baixo peso molecular (citocinas), que atuam no princípio e no controle da resposta imune e inflamatória. Devido aos diferentes papéis imunoinflamatórios, muitos mediadores são cotados na suscetibilidade à DP, pressupondo que variantes alélicas de diferentes *loci*, incluindo genes de citocinas, estariam influenciando no desempenho de seus produtos proteicos e conseqüentemente na atividade imunológica (CANTORE et al., 2014).

O implemento de estudos epidemiológicos e pesquisas clínicas longitudinais contribuíram para as análises relacionadas com a suscetibilidade genética da doença periodontal crônica e agressiva (DPA). Esses estudos permitiram a descrição de indivíduos de alto risco de maneira que colaboraram para o reconhecimento dos parâmetros genéticos relacionados com essas condições (NAZIR, 2017; LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012).

Diversas pesquisas foram realizadas acerca da associação de SNPs com o desenvolvimento da DP (MAZUREK-MOCHOL et al., 2019; SHI, 2017; AMIRISETTY et al., 2015; SONG et al., 2013; SHAO et al., 2009; FERREIRA et al., 2008; HOLLA et al., 2004). Resultados positivos foram obtidos embora se questione a validade dos mesmos (KINANE; SHIBA; HART, 2005), em função da ausência de sobreposição dos dados entre os estudos (GREENSTEIN; HART, 2002). Além disso, alguns pesquisadores têm levantado discussões sobre as limitações dessas pesquisas, pondera-se que o número amostral, baixo número de controles e a ausência de casos homogêneos em relação ao perfil clínico, étnico e idade dos participantes estejam relacionados com os resultados díspares entre as pesquisas realizadas (DE COO et al., 2018; VAITHILINGAM et al., 2014; SCHÄFER; JEPSEN; LOOS, 2011).

Por conseguinte, não há um consenso a respeito dos polimorfismos de sequência única ou quais genes estão associados à DP. No entanto, a comunidade científica aceita o envolvimento de fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento da doença, refletindo a importância de se obter mais informações relacionadas ao papel, em especial, de genes de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da condição. Acredita-se que o conhecimento dos genes envolvidos na predisposição possibilitará um melhor entendimento da evolução da doença, além de propor testes de suscetibilidade para contribuir na assistência à saúde, prevenção e controle adequado à DP. Diante disso, este estudo teve o escopo de investigar o envolvimento de SNPs de alguns genes de interleucinas, assim como alguns aspectos sociodemográficos e de estilo de vida, com a suscetibilidade à doença periodontal crônica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A proposição de que as doenças periodontais possuem fatores hereditários tem sido discutida ao longo de décadas, dado que desde 1930 há relatos de constatações. Contudo, ainda não está claro como os fatores ambientais e genéticos contribuem para a suscetibilidade que, *a priori*, pode ser influenciada por uma quantidade determinada de ambos os elementos (RAZZOUK; TERMECHI, 2013; MICHALOWICZ, 1994).

Muitas pesquisas que avaliaram fatores de risco genético focaram suas análises em indivíduos com a DPA, antes denominada como periodontite de início precoce, pois consideraram que as interferências dos aspectos ambientais são menores, em relação à DPC. Além disso, presume-se que os portadores da DPA representam uma população mais homogênea, visto que os enfermos apresentam padrões de progressão semelhantes, os quais se demonstram mais acentuados nesta condição (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2011; MICHALOWICZ, 1994).

Apesar das diferenças, semelhanças ainda são observadas entre DPA e DPC, visto que ambas exibem os mesmos padrões de resposta imune frente aos antígenos (PICOLOS et al., 2005; MICHALOWICZ, 1994). Durante o processo, o reconhecimento dos lipopolissacarídeos (LPS) estimulam os monócitos a liberarem mais prostaglandina-E2 (PGE2), o qual consiste em um poderoso mediador da destruição dos tecidos, uma vez que promove perda de inserção conjuntiva (ZOU; BAR-SHAVIT, 2002; GARRISON; NICHOLS, 1989).

Referente aos aspectos hereditários observados nas DPs, reportava-se uma maior atenção para DPA, até o início da década de 1990, a qual era mais fundamentada nesse quesito. Em se tratando da DPC, relatava-se algumas iniciativas de pesquisas que incluíam desde estudos com populações até pesquisa entre gêmeos (MICHALOWICZ, 1993; SOFAER, 1990).

Os primeiros estudos a respeito da DPC atribuíram-na como o resultado quase universal do envelhecimento. Contudo, este conceito tem sido questionado no decorrer dos anos (BAKER; ROOPENIAN, 2002), por consequência de estudos longitudinais e transversais, os quais observaram a redução dos níveis ósseos com o aumento da idade, mas que apenas uma pequena parcela dos indivíduos progride para uma perda severa considerável, a qual comprometeria a função e a longevidade dos dentes (TOMASI; WENNSTRÖM; BERGLUNDH, 2008; PAULANDER et al., 2004; LINDHE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1983).

Pesquisas concomitantes também foram implementadas com intuito de verificar a incidência da doença em indivíduos que vivem em condições ambientais desfavoráveis

(carência de atendimento odontológico e higiene oral inadequada). Foram obtidos resultados que contrapuseram a hipótese que vincula a patologia com o envelhecimento, de modo que os indivíduos desenvolveram a enfermidade em diferentes taxas (OFFENBACHER; BARROS; BECK, 2008; JOHNSON et al., 1988; LÖE et al., 1986).

O paralelo observado entre as pesquisas mencionadas anteriormente demonstra concordância no sentido de não atribuir o desenvolvimento da DPC apenas como consequência do envelhecimento e/ou da falta da higiene oral adequada (JOHNSON et al., 1988), uma vez que nem todas as pessoas se demonstraram propensas para a doença. Desse modo, estas constatações levantam o questionamento da origem da suscetibilidade que alguns indivíduos apresentam em relação à DPC (BAKER; ROOPENIAN, 2002).

Adicionalmente, ainda se ressaltam as dificuldades ou até mesmo as inconsistências acerca dos parâmetros de classificação e diagnóstico das doenças periodontais. Os mesmos, defrontam-se por diversas vezes com questionamentos em relação aos aspectos etimológicos que ainda não se encontram totalmente esclarecidos (ARMITAGE, 2004).

2.1 Classificação

Referente à classificação da DP, verificam-se mudanças consideráveis ao longo dos anos, uma vez que de 1977 a 1989, mediante a orientação da Academia Americana de Periodontologia (AAP – do inglês: *American Academy of Periodontology*), as doenças periodontais passaram de duas para cinco categorias. Ressaltou-se o reconhecimento dos efeitos de doenças sistêmicas sobre a saúde periodontal, que resultou na criação de uma nova categoria, a periodontite sistêmica (WIEBE; PUTNINS, 2000).

A classificação de 1989 da AAP apresentou diversas limitações que foram percebidas durante o passar dos anos, na medida em que confusões eram relatadas durante o diagnóstico. Entre essas se destacam: a ausência de uma categoria que abrangesse estritamente doenças gengivais; sobreposição entre categorias de doenças; impedimento da inclusão de certos pacientes em qualquer uma das categorias; similaridade da resposta do hospedeiro em distúrbios supostamente díspares; destaque maior para a idade de início; além dos critérios de classificação imprecisos (WIEBE; PUTNINS, 2000).

Em função dessas deficiências houve a necessidade de outra classificação, a qual sucedeu em 1999, sendo recomendada pelo Workshop Internacional para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e aceito pela AAP (CATON, 1999). A relação conteve a adição de novas subcategorias como no caso das doenças gengivais (gengivites); exclusão de

outras (subcategorias) que se sobrepujam; renomeação, como no caso da “Periodontite do Adulto” que passou a ser “Periodontite Crônica” (CASTRO; DUARTE, 2002).

A classificação de 1999 esteve em vigor por quase duas décadas, permeando até a edição de 2018 do *Proceedings* do *Workshop* Mundial para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares, que ocorreu durante o mês de novembro no ano de 2017 em Chicago, nos Estados Unidos, mediante o empenho da AAP e da Federação Europeia de Periodontologia (EFP - do inglês: *European Federation of Periodontology*). A classificação vigente se organizou em duas frentes: a primeira é relacionada às condições e doenças periodontais; que abrange gengivites, periodontites e demais condições que afetam o periodonto, a segunda é referente às condições e doenças peri-implantares; que envolve a saúde peri-implantar, mucosite peri-implantar, peri-implantite e deficiências nos tecidos peri-implantares moles e duros (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN; 2018; CATON et al., 2018; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018).

2.2 Caracterização e Epidemiologia da Doença Periodontal Crônica

A DPC consiste na inflamação recorrente e progressiva dos tecidos de sustentação dos dentes, possui níveis de prevalência elevados sendo a segunda maior causa patológica dentária no mundo. É causada, inicialmente, por infecções bacterianas (gram-negativas), que clinicamente se apresentam como inflamações gengivais, sangramento a sondagem, debilitação dos tecidos à sondagem (bolsas periodontais), perda de inserção gengival e do osso alveolar. Adicionalmente, ainda se verificam aspectos irregulares, os quais podem variar entre os indivíduos doentes como a hiperplasia ou recessão gengival, furca em evidência (exposição da raiz de um dente molar), aumento da mobilidade, inclinação dos dentes e esfoliação dentária (ARORA; MISHRA; CHUGH, 2014; NUTO; NATIONS; COSTA, 2007; ALMEIDA et al., 2006; FLEMMIG, 1999).

Em função do processo patológico progressivo, de natureza crônica, distingue-se a DPC como uma enfermidade complexa (LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012), uma vez que as características mencionadas são comuns em doenças humanas complexas como no caso da doença de Alzheimer, doença de Crohn e doenças cardiovasculares. As condições mencionadas, assim como a DPC, partilham, em princípio, de um fenótipo relativamente “leve”, o qual pode ocorrer em comorbidade com outras doenças (MAZIAK, 2015; ALMEIDA et al., 2006; TABOR; RISCH; MYERS, 2002).

A progressão da doença ocorre por meio de processos inflamatórios sucessivos nos tecidos conjuntivos, os quais promovem o aprofundamento do sulco gengival que consiste na formação de bolsas de tecido mole ou fendas aprofundadas entre a gengiva e a raiz do dente. Em se tratando da DPC severa, poderá acarretar na mobilidade dos dentes, desconforto, dores, perturbações durante a mastigação, além da eventual perda do elemento dentário (PRESHAW; BISSETT, 2013; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005;). Entre os parâmetros seguidos para a análise de prevalência da DPC, observa-se a profundidade da bolsa ou nível de inserção clínica e a quantidade de dentes implicados (BROWN; LÖE, 1993).

Referente aos dados epidemiológicos, pesquisas têm verificado diferenças na distribuição mundial da DPC, atribuindo-se a desigualdade à aspectos socioeconômicos, divergências etimológicas e metodológicas entre os pesquisadores (WILLIAMS, 2014; ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007; LÖE et al., 1986, 1978). Relata-se que a mesma afete entre 20% e 50% da população mundial (NAZIR, 2017). Todavia, a DPC tem sido demonstrada como mais prevalente em países subdesenvolvidos (NAZIR, 2017; VAN PALENSTEIN HELDERMAN; JOARDER; BEGUM, 1996;), apesar de não ser obrigatoriamente extensa ou severa em populações indígenas (RONDEROS; PIHLSTROM; HODGES, 2001).

Nos Estados Unidos, um estudo epidemiológico, realizado entre 2009 e 2010, reportou uma prevalência de 47% para indivíduos adultos, destes 38% tinham 30 anos ou mais, e 64% apresentavam mais de 65 anos (EKE et al., 2012), que compreende a uma estimativa abaixo dos níveis observados em populações europeias (HOLTFRETER et al., 2010; BOURGEOIS; BOUCHARD; MATTOUT, 2007). Em relação aos dados da África e do Oriente Médio, pesquisadores mencionam o acesso limitado à higiene oral adequada e ao tratamento odontológico especializado em países subdesenvolvidos. Assume-se que a DPC seja mais prevalente nesses países (WILLIAMS, 2014).

No Brasil, dados da Pesquisa Nacional da Saúde Bucal (BRASIL, 2012) reportaram a presença da doença periodontal em 37% das crianças com até 12 anos, 49% entre jovens de 15 a 19 anos, 82% entre adultos de 35 a 44 anos e 98% entre idosos de 65 a 74 anos. Os resultados também revelaram que o comparecimento de cálculo e sangramento em indivíduos de 12 anos é mais comum, além disso, reportou-se uma frequência de 19% referente à periodontite severa em indivíduos de meia idade. Adicionalmente, também foi observado que complicações gengivais são pouco expressivas em indivíduos idosos em função de pouca quantidade de dentes.

Segundo a OMS (2012), 15 a 20% dos adultos de meia idade (35-44 anos) apresentam a doença periodontal grave, a qual é uma das principais causas de perda dentária. Todavia,

também se reporta que a perda completa ou generalizada dos dentes afete mais as pessoas idosas, visto que, globalmente, aproximadamente 30% das pessoas entre 65 e 74 anos não possuem dentes naturais.

Estudos epidemiológicos foram realizados ao longo dos anos em diversas populações, mas ainda se verifica uma carência de dados, sobretudo em países da América Latina, uma vez que os modelos de diagnósticos empregados não descrevem com exatidão o perfil de dominância da doença, em função da simplificação metodológica, a qual subestima a prevalência da condição. Todavia, a comunidade científica assume que a DPC tenha uma prevalência elevada nos países latino-americanos (NAZIR, 2017; ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007).

O fato de haver modelos metodológicos simplificados pode estar relacionando com algumas limitações que inevitavelmente ocorrem. Isso se apresenta, por exemplo, durante a análise dos parâmetros clínicos que se exibem nas medições biológicas; como perda de inserção e perda óssea, estas que são passivas de variações biológicas temporais ou até mesmo erros de medição (TELES et al., 2016).

Somado a isso, também se inclui a especificidade dos sítios, que consiste na característica da patologia de se manifestar em um ou vários dentes, além da possibilidade de outras superfícies dentárias se apresentarem isentas dos aspectos clínicos. Posto isso, evidencia-se a necessidade, não apenas, da análise da magnitude (severidade) como também da extensão da doença, embora estes parâmetros possam ser simplificados, em alguns modelos metodológicos, uma vez que o padrão universal, o qual envolve valores de gravidade e extensão, necessários para se designar como DPC, ainda não foram definidos. Em função disso se atribui arbitrariamente valores limiares (*threshold*) para as medições, os quais têm por finalidade evidenciar a destruição dos tecidos de sustentação, mas por outro lado também explicam o fato de haver divergências nas estimativas de prevalência da DPC entre os estudos (PAPAPANOU; SUSIN, 2017; ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007).

2.3 Patogênese

Por se tratar de uma doença infecciosa se atribui as bactérias a condição de agente etiológico primário, em função da resposta imunológica e o quadro inflamatório que os seus produtos geram no hospedeiro. Contudo, diferente da maioria das infecções se verifica a presença de vários tipos de bactérias, as quais conferem um quadro de infecção mista que causa o desequilíbrio ecológico em razão do crescimento excessivo de microrganismos comensais, os

quais consistem em fatores de causa da DPC. Os microrganismos se desenvolvem nos tecidos requerendo do hospedeiro uma resposta, de modo que os mecanismos imunológicos articulam ações para manter a homeostase ou equilíbrio ecológico (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; HAJISHENGALLIS, 2015; ARORA, MISHRA, CHUGH, 2014; GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997).

É importante ressaltar que a inflamação pode ser caracterizada como uma resposta fisiológica aos diferentes tipos de lesões ou agressões, as quais abrangem calor, agentes químicos e infecções bacterianas. As inflamações ainda podem se apresentar como aguda, quando a resposta é rápida ou de pouca duração, ou crônica, quando a agressão não é resolvida, mantendo a condição inflamatória, a qual poderá progredir para uma resposta imune adaptativa. Ambas as respostas coordenam a retomada da homeostase dos tecidos (XU; LARBI, 2018; TROWBRIDGE; EMLING, 1997).

Desse modo se torna evidente a relevância e a necessidade da compreensão dos mecanismos imunológicos e das respostas inflamatórias, que por sua vez são fundamentais no entendimento da patogênese de doenças complexas como a DPC, tendo em vista que a mesma é intermediada pela resposta inflamatória ao biofilme no local da infecção. Contudo, apesar de ser uma infecção mista, existem constatações de que micro-organismos específicos estariam relacionados com as formas progressivas da doença, embora a presença dos mesmos em indivíduos nos quais a progressão é ausente, atribua um papel preponderante à resposta imune e aos processos inflamatórios, uma vez que a presença da bactéria é insuficiente para a progressividade da doença (CEKICI et al., 2014), sugerindo que a regulação dos mecanismos imunoinflamatórios, juntamente com fatores ambientais, seriam os responsáveis pela suscetibilidade à DPC (RETTORI et al., 2014; UITTO; OVERALL; MCCULLOCH, 2003; SEYMOUR; GEMMELL, 2001; SEYMOUR, 1991).

Durante a infecção bacteriana se verifica o comparecimento de mediadores imunológicos, os quais atuam no desencadeamento dos processos inflamatórios mediante o reconhecimento de produtos de micro-organismos gram-negativos como os LPS (VIEIRA, 2014), que estão presentes no biofilme e induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias como: interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF- α) entre outros (PUMKLIN; BHALANG; PAVASANT, 2016; DI BENEDETTO et al., 2013; LOOS et al., 2000).

Os processos imunológicos também recebem o apoio de outras moléculas como no caso da família de receptores *Toll-Like* (TLR - do Inglês: *Toll-like Receptors* - Receptores do Tipo Toll), os quais são proteínas transmembrana de células fagocitárias. Esses receptores

reconhecem os LPS em função da capacidade de identificação de padrões de moléculas associados aos patógenos (PAMPS - do inglês: *Pathogen-associated Molecular Pattern*) que leva a expressão de genes relevantes para a defesa do hospedeiro (TSUKAMOTO et al., 2018; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

Desse modo, os LPS, TLRs e complexos proteicos atuam em uma cascata de sinalização para expressão de genes de moléculas inflamatórias, por meio da ativação de uma transdução de sinal indutora do fator nuclear *kappa* B (NF κ B – do inglês: *nuclear factor kappa B*), que desempenha função de fator de transcrição de mediadores inflamatórios (SÉFORA-SOUSA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2013; JURK et al., 2002). E dessa forma, promove a coexistência de inúmeros moduladores imunológicos que atuam na mobilização, na migração e na exsudação de células fagocitárias no epitélio juncional e no sulco gengival (DI BENEDETTO et al., 2013; TENG, 2003).

Em meio à variedade de mediadores se ressalta a presença de citocinas pró-inflamatórias, as quais se demonstram como um parâmetro em potencial a ser analisado, em decorrência de maior concentração das mesmas nos fluidos gengivais e no periodonto de indivíduos doentes (TANAKA et al., 2014; EBADIAN et al., 2013). Entre essas, muitas têm sido analisadas em relação à suscetibilidade para as doenças complexas, incluindo a DPC, visto que se percebe um relativo interesse pela IL-1 β , IL-6, IL-8, entre outras, as quais colaboram na mobilização de células de defesa (KORNMAN; PAGE; TONETTI, 1997) e, conseqüentemente, na atividade proteolítica (IZADI BORUJENI; MAYER; EICKHOLZ, 2015) que ocorre na ausência dos inibidores enzimáticos reguladores, em função do desequilíbrio homeostático, o qual possibilita a degradação dos tecidos por enzimas proteolíticas (DE MORAIS et al., 2017).

Em síntese, entende-se que a resposta imunológica aos patógenos ocorre por meio de mediadores inflamatórios que promovem a mobilização de células de defesa, as quais combatem a proliferação bacteriana. As citocinas também estimulam a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs - do inglês: *Matrix Metalloproteinases*) (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; STABHOLZ, SOSKOLNE, 2010; MENG et al., 2007), assim como a diferenciação e ativação osteoclástica (LEE et al., 2010; MIYAZAKI et al., 2000; JIMI et al., 1999), de modo que possibilita a destruição tecidual e a reabsorção óssea (Figura 1). Logo, se reconhece a relevância dos mediadores pró-inflamatórios em doenças complexas como a DPC, na qual se evidencia a destruição dos tecidos de sustentação dos dentes e a reabsorção óssea, que se estabelecem por intermédio da inflamação crônica, a qual caracteriza níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, que atuam em conjunto com a imunidade adquirida e promovem a manutenção e a progressão do quadro clínico.

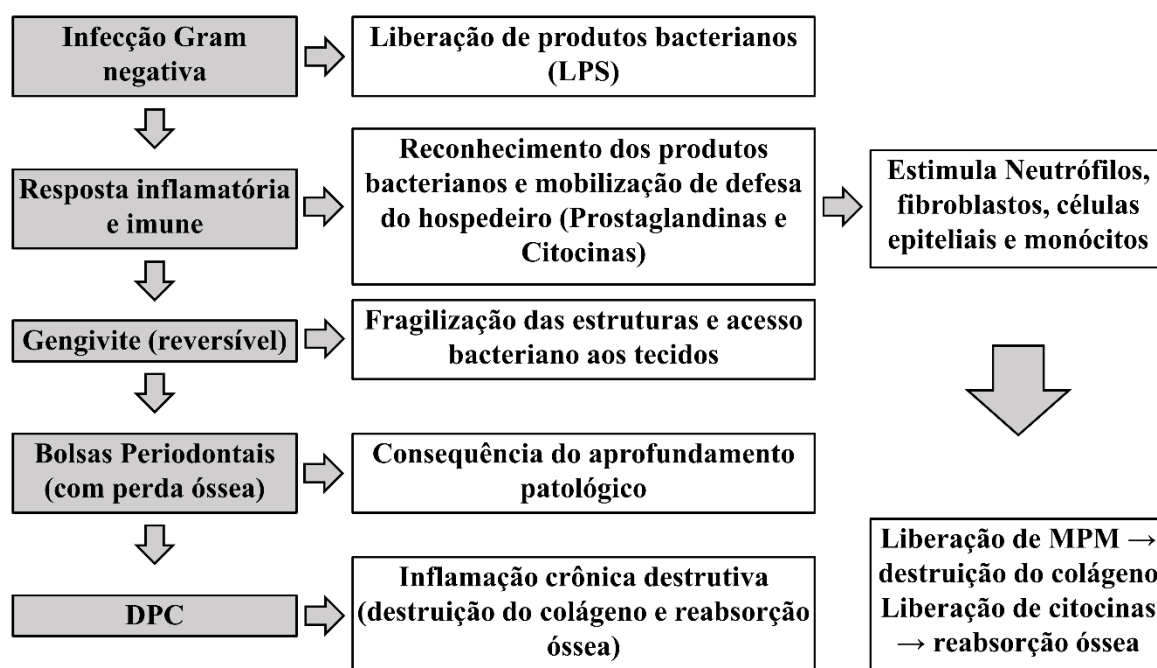


FIGURA 1. Progressão dos eventos de patogênese que encaminham o quadro clínico da doença periodontal crônica.

2.4 Interleucina 1 beta

A IL-1 β consiste em um polipeptídeo não estrutural com cerca de 17kDa, precedido por uma molécula de aproximadamente 35kDa (interleucina pró-inflamatória prototípica 1 β) codificado pelo gene *IL1B*, o qual possui 7 *exons*, localizados no braço longo do cromossomo 2 (2q14.1) (NATIONAL, 2020; HERZYK et al., 1992). Pertence a uma família de citocinas (IL-1F) composta por 11 representantes, dos quais se inclui a interleucina 1 Alfa (IL-1 α) e o receptor antagonista (IL-1Ra) (DINARELLO, 2009). É considerada como um dos principais mediadores da inflamação em função da intensa participação nos processos pró-inflamatórios da imunidade inata, possui atuação em vários tipos celulares, dos quais se incluem as células que realizam reabsorção óssea, além de induzir um grande portfólio de genes (CANTORE et al., 2014; DINARELLO, 2005; GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997).

A produção da IL-1 β ocorre devido a ativação de processos da imunidade inata, de modo que o reconhecimento de patógenos induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Subprodutos dos microrganismos são reconhecidos por células inatas do sistema imune como macrófago e células dendríticas por meio dos receptores TLRs, os quais desencadeiam vias de sinalização que ativam NF κ B que, por sua vez, estimula a produção dos mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-8) e regulação positiva de moléculas co-estimulatórias (KYOTO, 2020a).

Conforme foi descrito, a síntese da IL-1 β , dentre outras citocinas pró-inflamatórias, ocorre por intermédio da expressão de NF κ B, ressaltando que em determinadas condições o processo reverso acontece, de maneira que a IL-1 β induz NF κ B para amplificação da inflamação. Considera-se que a via canônica para NF κ B seja mediada pela IL-1 β , TNF α ou subprodutos bacterianos como os LPS, embora diferentes componentes possam induzir a sua síntese. A interleucina 17, por exemplo, corresponde a um amplificador da resposta imune, de maneira que estimula a produção de NF κ B em células TH17 (do inglês: *Type 17 Helper Lymphocyte* – Linfócito Auxiliar Tipo 17) que, por sua vez, induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias. A interleucina 18 também colabora nos processos inflamatórios, sendo liberada por células dendríticas, de modo que induz a liberação de NF κ B em células TH1 (do inglês: *Type 1 Helper Lymphocyte* – Linfócito Auxiliar Tipo 1) (KYOTO, 2020a).

A IL-1 β tem sido proposta como fator de risco em condições inflamatórias progressivas, devido a sua participação efetiva na indução de mecanismos de destruição tecidual e reabsorção óssea. Condições como a artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e a DP caracterizam-se pela desregulação do sistema imunológico, de forma que a ativação anormal de citocinas pró-inflamatórias colabora com a destruição tecidual desempenhada por células imunológicas, além da reabsorção óssea, no caso da artrite reumatoide e a DP (KYOTO, 2020a; HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; BENATTI et al., 2009).

O processo de reabsorção óssea é desempenhado pelos osteoclastos, que consistem em células multinucleadas formadas a partir da linhagem hematopoiética, mediante a diferenciação de monócitos e macrófagos. A expressão dos fatores de diferenciação pode ser regulada por diferentes vias e moléculas, contudo, os principais meios de sinalização ocorrem por intermédio da ativação de RANK (do Inglês: *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B* - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- B) ou pelo estímulo de mediadores imunológicos (KYOTO, 2020a).

A IL-1 β têm recebido destaque dentre os mediadores imunológicos reguladores da osteoclastogênese, devido a sua participação direta, independente da ativação de RANK. Análises *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a integração da IL-1 β com o desenvolvimento e ativação do osteoclasto, de modo que induz a multinucleação e maturação de células precursoras, as quais serão potencialmente ativas para a reabsorção óssea (LEE et al., 2010; PARK, YIM, 2007; NUKAGA et al., 2004; MIYAZAKI et al., 2000; JIMI et al., 1999). Adicionalmente, ressalta-se a capacidade indutora da IL-1 β na produção de proteases que, em se tratando da DPC, degradam os tecidos de sustentação dos dentes e a matriz extracelular

(HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015; TREVILATTO et al., 2011; BENATTI et al., 2009; GENCO, 1992).

Estudos têm sido realizados com finalidade investigativa acerca da suscetibilidade induzida por polimorfismos de genes da família *IL1* em indivíduos com doenças crônicas inflamatórias. Pondera-se que variantes genéticas interfiram na regulação das citocinas contribuindo para um perfil de suscetibilidade para condições progressivas como a DPC (MOREIRA et al., 2005; GALBRAITH et al., 1999; KORNMAN et al., 1997).

2.5 Interleucina 6

A IL-6 é uma proteína com cerca de 28kDa, expressa pelo gene *IL6*, o qual possui 6 *exons*, localizados no braço curto do cromossomo 7 (7p15.3) (NATIONAL, 2020; REIHMANE; DELA, 2014; SNYDER et al., 2004). Apresenta uma característica pleiotrópica que consiste em desempenhar diversas funções em diferentes tecidos como a produção de proteínas de fase aguda, regulação da reabsorção óssea, entre outras. Em condições de infecção ou reparo tecidual, a IL-6 desempenha papéis pró-inflamatórios, sendo expressa em vários tipos celulares durante o desencadear das lesões nos tecidos (KYOTO, 2020b; ZHANG et al., 2013; MORINHA et al. 2011; IRWIN; MYRILLAS, 1998; MATSUKI, Y; YAMAMOTO, T; HARA, K, 1992).

O processo de síntese da IL-6 ocorre em macrófagos ou em células T por intermédio de uma transdução de sinal desencadeada pelos TLRs de monócitos ou macrófagos que reconheceram a “assinatura biológica” de um patógeno (PAMPs). Por fim, o processo estimula diversas vias de sinalização, inclusive a do NFκB, que constitui em um fator de produção para citocinas inflamatórias como, por exemplo, a IL-6. Moléculas como TNF-α e a IL-1β também ativam fatores de transcrição para IL-6 (KYOTO, 2020b; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Durante o processo inflamatório, a síntese de moléculas como a proteína C reativa, amiloide sérico A, fibrinogênio, hepcidina, RANKL (do Inglês, *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B Ligante), entre outras, conferem à versatilidade da IL-6 e representam a capacidade ampla de ação da mesma, que inclui a sinalização para a atividade imunológica, diferenciação e proliferação de células imunes e não imunes, inibição de substâncias, produção de anticorpos (imunidade adquirida) e desenvolvimento de células T efetoras. Contudo, a atividade pleiotrópica da IL-6 poderá causar

o desenvolvimento de várias doenças, quando se tem uma produção contínua ou desregulada desta citocina (TANAKA; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, 2014).

O aumento das concentrações da IL-6 nos tecidos intensifica a síntese de diversas moléculas que, por sua vez, desencadeiam o desregulamento de diferentes processos correlacionados ou não, os quais poderão gerar um quadro patológico. Isso se mostra factível ao considerarmos que o excesso de fibrinogênio é relacionado com o risco cardiovascular; e que a hepcidina, em grandes concentrações, poderá causar anemia de inflamação; e que o RANKL, em quantidade elevada, poderá causar osteoporose, em função de alta diferenciação de osteoclóstos (TANAKA; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, 2014).

Muitos estudos têm avaliado a associação dos SNPs do gene *IL6* com o desenvolvimento de várias enfermidades com o perfil autoinflamatório, incluindo a DPC (CHATZOPOULOS et al., 2018; SOUZA et al., 2008; SAINZ et al., 2008; IRWIN; MYRILLAS 1998). Acredita-se que o dano tecidual observado na doença esteja associado com os níveis elevados da IL-6, e que o perfil genético individual estaria relacionado com o aumento da expressão do gene *IL6*.

2.6 Interleucina 8

A IL-8 é um mediador quimiotático de 8kDa, codificado pelo gene *CXCL8* e localizado no cromossomo 4 (4q13.3) (NATIONAL, 2016; LI JEON et al., 2002). É responsável pela migração e ativação de leucócitos e, principalmente, neutrófilos (UNIPROT, 2020; KAWASHIMA et al., 2013; LARSEN et al., 1989). Figura-se como um membro da família das quimiocinas que constitui um grupo de pequenas citocinas com peso molecular entre 7 e 15kDa (PALOMINO; MARTI, 2015).

Durante as reações imunológicas, a IL-8 desempenha um papel importante na iniciação e amplificação de reações inflamatórias agudas, processos de inflamação crônica (BORILOVA LINHARTOVA et al., 2013) e na promoção do metabolismo oxidativo (KYOTO, 2020c; SHEN et al., 2013; ZWAHLEN; WALZ; ROT, 1993). É produzida principalmente por monócitos e macrófagos estimulados pela IL-1, TNF- α , NF κ B, entre outros (NOLAN et al., 2013; ELLIOTT et al., 2001; BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1994).

Em condições como artrite reumatoide, psoríase, assim como doenças pulmonares, ocorre uma expressão demasiada da IL-8 que, em conjunto com outros mediadores, causam o quadro inflamatório crônico (KYOTO, 2020c; PALOMINO; MARTI, 2015). Neste contexto, IL-8 representa um risco, em função do recrutamento de neutrófilos, os quais denotam um dano

potencial dos tecidos, em razão da expressão de proteases que degradam a matriz conjuntiva dos tecidos (HIRSCHFELD, 2020).

Em se tratando da DP, a IL-8 se mostra como um objeto relevante de estudo, uma vez que se trata de uma condição inflamatória recorrente que exibe dano tecidual progressivo, o qual poderia se relacionar com o número elevado de neutrófilos nos tecidos gengivais e a consequente atividade proteolítica associada aos mesmos, em decorrência do aumento da concentração de proteases (HIRSCHFELD, 2020). Desse modo, em função das particularidades mencionadas, estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar a relação do perfil genético para o gene *CXCL8* com o desenvolvimento e/ou progressão de condições crônicas inflamatórias como, por exemplo, as doenças periodontais (BISHU et al., 2018; FINOTI et al., 2017; CUI; ZHAO; GUO, 2016; KANG et al., 2009).

2.7 Aspectos Genéticos

Conforme as informações descritas ao longo do texto, as doenças periodontais se caracterizam etiologicamente como enfermidades multifatoriais e de variação contínua, que envolvem uma série de fatores em sua suscetibilidade e expressão do quadro clínico como os fatores microbiológicos, comportamentais, ambientais, sistêmicos e genéticos (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; LAINE et al., 2013; MORINHA et al., 2011; MENG et al., 2007). Contudo, ainda não se tem uma plena compreensão dos mecanismos subjacentes à doença, uma vez que as análises que relacionam os fatores entre si são ausentes ou escassas (YOSHIE et al., 2007; TAKASHIBA; NARUSHI, 2006).

Considera-se que pesquisas voltadas para a identificação antecipada dos fatores poderiam colaborar no reconhecimento de indivíduos propensos, sendo os aspectos genéticos e epigenéticos sugestivos, em função da possibilidade de adequação aos parâmetros descritos. Acredita-se que estes estudos viabilizem o diagnóstico preventivo e modelos de terapia personalizados (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; KINANE; HART, 2003).

Pesquisas em biologia molecular têm reportado o papel preponderante dos genes que regulam mediadores inflamatórios sobre a propensão e progressão da DP em humanos (DIVARIS et al., 2013; MENG et al., 2007;). Variantes alélicas, que alteram a suscetibilidade às doenças, têm sido observadas, de modo que se constituem como um dos principais fatores de causa para as enfermidades complexas, as quais se manifestam como mudanças suaves que alteram levemente a expressão ou função de um produto genético (GOICOECHEA DE JORGE

et al. 2018; RESEARCH, 2005; KINANE; HART, 2003). Essas variantes são denominadas de polimorfismo genético quando representam uma frequência maior ou igual a 1% em uma população (VIJAYALAKSHMI et al., 2010).

As variantes polimórficas são resultantes de diferentes tipos de mutações e podem se manifestar em formas distintas, as quais são usualmente referidas, conforme a alteração que sofreram. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é considerado a forma mais comum, sendo também o mais simples, em função de ocorrência de uma única mutação de base em uma sequência de DNA, a qual substitui um nucleotídeo por outro (TABA; SOUZA; MARIGUELA, 2012). Essas variantes genéticas se demonstram relativamente frequentes nas populações, apesar dos perfis baixos de penetrância, sendo frequentemente avaliados em estudos de associação ampla do genoma (PEREIRA et al., 2018).

Os SNPs se demonstram como potenciais marcadores de suscetibilidade, uma vez que as frequências de genótipos ou alelos podem destoar entre um grupo doente e um grupo saudável em um conjunto amostral ou populacional de indivíduos. Considera-se que exista a possibilidade do emprego de análises funcionais para os genes relacionados com a doença, com o propósito de investigar o papel dos mesmos na etiologia e patogênese da enfermidade (SCHÄFER; JEPSEN; LOOS, 2011; VIJAYALAKSHMI et al., 2010; LOOS; JOHN; LAINE, 2005).

Pesquisadores sugerem que vários SNPs estão relacionados com o desenvolvimento de doenças comuns, as quais também demonstram um perfil genético complexo como no caso da DPC (CHATZOPOULOS et al., 2018; AMAYA et al., 2013; TREVILATTO et al., 2011). Presume-se que um único SNP não seria determinante na suscetibilidade à doença, em razão de que o mesmo pode ser detectado em indivíduos saudáveis ou de baixo risco (TABA; SOUZA; MARIGUELA, 2012; SCHÄFER; JEPSEN; LOOS, 2011; MICHALOWICZ, 1994).

Os polimorfismos também podem ser distinguidos entre variantes alélicas de diferentes *loci*, as quais podem ocorrer em proximidade física em um cromossomo, o que caracteriza um haplo-grupo (haplótipo), uma vez que estes, são herdados em conjunto e sem permuta, entre os cromossomos parentais (SCAREL-CAMINAGA et al., 2011). Adicionalmente, ainda existe a possibilidade de haplótipos de SNPs em genes ou segmentos de DNA, os quais também demonstram a ausência de permuta, decorrente da proximidade dos polimorfismos. Portanto, implica-se que os polimorfismos ou alelos também possam atuar em conjunto na predisposição à doença, por intermédio de um ou mais haplótipos de suscetibilidade (HASHIMOTO et al., 2005).

Complementarmente, também se verifica outras possibilidades de combinações, as quais podem ocorrer entre *loci* de diferentes cromossomos, ou seja, *loci* separados, uma vez que cada variante por si só é, geralmente, incapaz de causar a doença. Entende-se que algumas combinações possam gerar genótipos que aumentem a probabilidade de desenvolver um fenótipo característico para determinada condição. Isso decorre da formação de arranjos específicos entre os polimorfismos (VIJAYALAKSHMI et al., 2010; GONZALES et al., 2004).

Considera-se pertinente o envolvimento dos mediadores mencionados ao longo do texto, com a DPC, uma vez que os mesmos, possuem genes polimórficos em suas sequências de DNA (SCAREL-CAMINAGA et al., 2011; PARKHILL et al., 2000; HART; KORNMAN, 1997; MICHALOWICZ, 1994). Pressupõe-se que os polimorfismos ou haplótipos de SNPs de genes como o *IL1B*, *IL6* e *CXCL8* (SCAREL-CAMINAGA et al., 2011; DE BARROS; FIGUEREDO; FISCHER, 2006) estariam causando alterações nos padrões de regulação e função de seus produtos proteicos, os quais poderiam influenciar na inflamação crônica dos tecidos de sustentação dos dentes (DE BARROS; FIGUEREDO; FISCHER, 2006).

Um dos polimorfismos mais inferidos é o rs1143634 do gene *IL1B* (IL-1 β), o qual foi objeto de estudo das primeiras pesquisas que analisaram a associação de SNPs com a DPC. O mesmo esteve relacionado com a suscetibilidade à DPC em alguns trabalhos (MOREIRA et al., 2005; GALBRAITH et al., 1999; KORNMAN et al., 1997). Contudo, dados de estudos posteriores contrapuseram as constatações das publicações mais antigas, o que gerou desacordos entre os pesquisadores, uma vez que não houve associação entre o polimorfismo e a doença (SAKELLARI et al., 2006; ANUSAKSATHIEN et al., 2003).

Em razão disso, outros SNPs foram pesquisados em nível de associação com diferentes tipos de doenças periodontais como o rs1800795 (PRAKASH et al., 2014) e rs1800796 (HANAI et al., 2015), ambos localizados no gene *IL6*, os quais se demonstraram relacionados com as enfermidades (DE BARROS; FIGUEREDO; FISCHER, 2006; TREVILATTO et al., 2003). Todavia, estas constatações não se mostraram resilientes entre os pesquisadores, em função dos resultados díspares de outros estudos, os quais não se sobrepunham (CHATZOPOULOS et al., 2018; ZHANG et al., 2013; HOLLA et al., 2004).

Publicações que inferiam outras variantes, sejam essas com o gene *IL6* ou em outros genes de citocinas, continuaram a ocorrer de modo que se estabeleceu um plantel de marcadores moleculares plausíveis para a DPC (BISHU et al., 2018; CUI; ZHAO; GUO, 2016; KANG et al., 2009; HOLLA et al., 2004). Entre os possíveis genes candidatos, verificou-se o gene *CXCL8* (IL-8), o qual também tem sido objeto de pesquisas, mediante a análise de seus polimorfismos em relação à predisposição com as doenças periodontais (ANDIA et al., 2013; BORILOVA

LINHARTOVA et al., 2013) como no caso rs4073 e do rs2227306 (NI et al., 2017). Contudo, nem todos os SNPs do gene *CXCL8* têm sido empregados em análises de suscetibilidade a doenças comuns como no caso do rs2227539, o qual se localiza em uma região intrônica que, possivelmente, desempenha um papel regulatório na expressão de genes mediante os processos de *Splicing* alternativo. Considera-se que a presença do polimorfismo poderia gerar alelos diferentes, semelhante a outras pesquisas que envolveram outros genes e polimorfismos (QADDOURAH et al., 2014; WANG et al., 2011; JU et al., 2010; GREENWOOD; KELSOE, 2003).

Desse modo, a continuidade de novas investigações direcionadas à análise de marcadores genéticos de susceptibilidade para doenças comuns, incluindo a DPC, ainda se fazem necessárias. Salienta-se que estes marcadores biológicos se constituem como uma ferramenta biotecnológica que podem contribuir para a consolidação de novos serviços na área da saúde, além de colaborar na compreensão da diversidade genética da população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o envolvimento de polimorfismos dos genes *IL1B*, *IL6* e *CXCL8*, assim como aspectos sociodemográficos e de estilo de vida, com a suscetibilidade à doença periodontal crônica em um grupo de voluntários goianienses.

3.2 Objetivos Específicos

- Observar se ocorrem diferenças na distribuição genotípica dos SNPs rs1143634, rs1800795, rs1800796, rs4073, rs2227306 e rs2227539 nos grupos estudados;
- Verificar se existem diferenças na distribuição das variantes alélicas dos SNPs rs1143634, rs1800795, rs1800796, rs4073, rs2227306 e rs2227539 nos grupos estudados;
- Avaliar a distribuição haplotípica dos SNPs dos genes *IL6* e *CXCL8* entre os grupos estudados;
- Investigar a existência de relação dos aspectos sociodemográficos e/ou de estilo de vida com a suscetibilidade à doença periodontal crônica;
- Analisar a influência das variáveis genéticas na predição e aumento do risco para doença periodontal crônica.

4 MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo consistiu em uma investigação observacional do tipo caso-controle, realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) e no Laboratório de Mutagênese (LABMUT) da Universidade Federal de Goiás (UFG), que foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUC Goiás (Nº de protocolo: 201210267001140). Os indivíduos, que se dispuseram voluntariamente em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I), e responderam um questionário sobre o estilo de vida (APÊNDICE II).

4.1 Descrição do Grupo Amostral

A amostragem foi de caráter não probabilístico, constituída por amostras de conveniência oriundas de cinquenta e um indivíduos com DPC (caso) e cento e um indivíduos saudáveis (controle), os quais residiam no município Goiânia. Os participantes que se voluntariaram foram catalogados segundo o sexo, a idade, o consumo de álcool e a higiene oral. A menoridade civil e o tabagismo foram adotados como critérios de exclusão.

A restrição dos indivíduos tabagistas foi realizada com o propósito de filtrar a análise, uma vez que consiste em uma característica indutora ou pertinente com o risco de afecção (OJIMA; HANIOKA, 2010). Isso permitiu avaliar os aspectos genéticos sem a interferência de um fator indutor, embora ocorram limitações para tal tentativa, em função de impedimento da restrição de outras características como, por exemplo, o etilismo.

4.2 Avaliação pelo Exame Periodontal

Os voluntários deste estudo foram submetidos ao exame clínico denominado de periograma, o qual foi realizado por um odontologista especializado em periodontia, que utilizou uma sonda periodontal milimetrada (modelo semelhante ao 621 da OMS) e espelhos bucais. Empregou-se o modelo de índice periodontal comunitário (IPC) (BRASIL, 2001) como parâmetro de diagnóstico.

As sondas periodontais utilizadas possuíam uma ponta esférica com 0,5mm de diâmetro e uma faixa preta entre 3,5 e 5,5mm, além de anéis com marcações de 8,5 e 11,5mm. Durante a sondagem, a boca foi delineada em seis sextantes para verificação de cada dente (dos

sextantes), os sítios com maior profundidade foram priorizados para o diagnóstico da doença (OLIVEIRA et al. 2015; MOIMAZ et al. 2006).

A perda de inserção clínica de dois ou mais sítios se caracteriza como um dos principais critérios de diagnóstico para periodontite, a qual foi classificada em até três estágios ou níveis de severidade, conforme a profundidade de sondagem, sendo: de até 4mm para o Estágio I, 5mm para o Estágio II e ≥ 6 mm para o Estágio III e para o Estágio IV (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018). É importante ressaltar que no diagnóstico para Estágio IV se inclui a avaliação de outros aspectos, os quais não puderam ser empregados no presente estudo em função de limitações logísticas.

4.3 Obtenção das Amostras e o Isolamento do DNA Genômico

As amostras biológicas foram obtidas via coleta de 4mL de sangue periférico em tubos contendo etilenodiamino tetra-acético (EDTA), realizada por profissional habilitado. O DNA foi extraído a partir do sangue total, utilizando os kits *Ilustra Blood Genomic Mini Spin*[®] (GE healthcare, UK) e *AxyPrep Blood Genomic Prep*TM (Axygen Biosciences, EUA), conforme as orientações dos fabricantes.

4.4 Identificação do Polimorfismo rs1143634 – PCR-RFLP

A partir do DNA extraído foi realizada a reação de PCR (do inglês: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) e, posteriormente, a de RFLP (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), conforme o método descrito por Moreira e colaboradores (2005). Durante o método, o DNA isolado foi amplificado por intermédio da PCR, e os seus produtos de reação foram fragmentados pelo método de RFLP, em um momento posterior. As sequências dos *primers* usados para a PCR e os sítios de restrição para a RFLP, utilizados neste estudo, estão presentes na Tabela 1. É importante ressaltar que a sequência alvo encontra-se no sentido 3'→5'.

TABELA 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e os fragmentos de restrição do *amplicon* de 194pb, referente ao SNP rs1143634 do gene *IL1B*.

<i>IL1B</i>	Sequência (5' → 3')	Fragmentos
<i>Primers</i> rs1143634	5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3 5'-GCTTTTTTGGCTGTGAGTCCCG-3'	194pb
RFLP	Alelo 1 TCGA Alelo 2 TCGA	97, 85, 12pb 182, 12pb

As reações de PCR ocorreram nas seguintes condições: tampão de PCR (10mM Tris-HCl [pH 8,8], 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl₂, 0,1% Triton X-100); 1mM MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 2,0U de Taq DNA polimerase e 2M de *primers*. As condições de termociclagem da PCR foram de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos da reação foram submetidos à separação, em campo elétrico, constante de 10V/cm em um gel de agarose a 1,5% em Tri-Acido-Bórico-EDTA (TBE). A visualização do DNA foi possível mediante a coloração do gel de agarose (Figura 2) em solução de brometo de etídio a 5µg/mL. As imagens foram obtidas por meio da captura em vídeo documentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (BioRad, EUA).

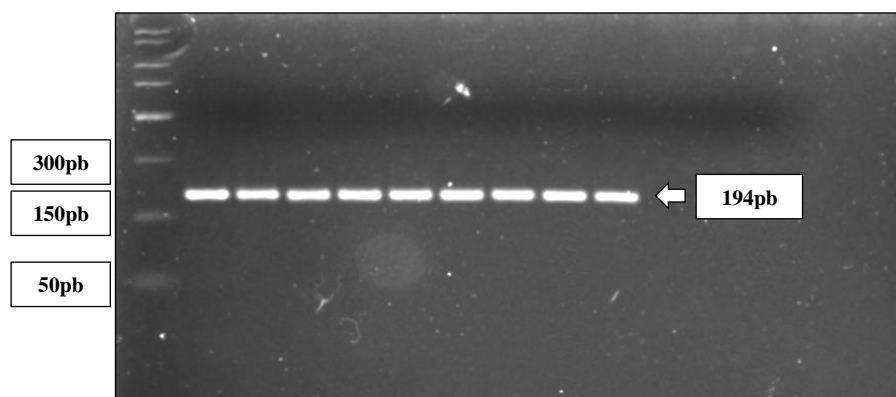


FIGURA 2. Produtos de PCR de 194pb em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

Os produtos da PCR foram encaminhados para a reação de RFLP, sendo tratados com a enzima TaqI[®] (Invitrogen, EUA) a 65°C por 1 hora, para digestão enzimática. Posteriormente, os fragmentos de 12pb + 85pb + 97pb (alelo 1) e 12pb + 182pb (alelo 2) foram obtidos por meio de separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 8% e, em seguida, corados com nitrato de prata a 0,1% (Figura 3).

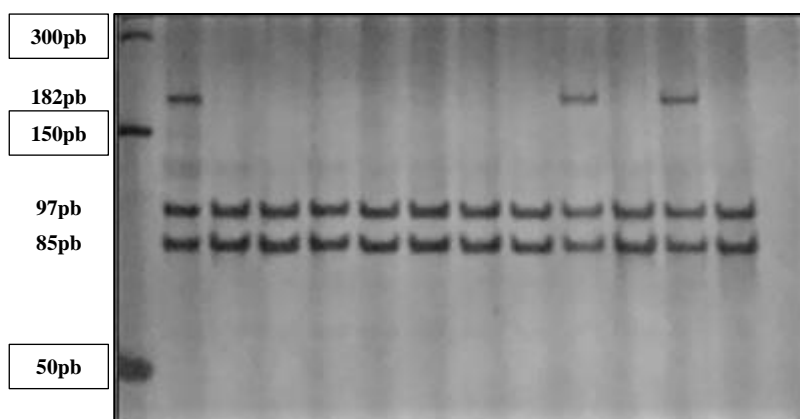


FIGURA 3. Gel de poliacrilamida a 8%, expondo os fragmentos de restrição do produto de PCR. Alelo 1 (A1) = 12pb + 85pb + 97pb e alelo 2 (A2) = 12pb + 182pb, correspondendo a C e T, respectivamente. O fragmento de 12pb não foi detectado para esta metodologia.

4.5 Rastreamento dos SNPs rs1800795, rs1800796, rs4073, rs2227306 e rs2227539

A genotipagem dos SNPs rs1800795, rs1800796, rs4073, rs2227306 e rs2227539 ocorreu por meio do método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que compreende um procedimento de alta sensibilidade para determinar a presença ou ausência de regiões específicas (HOLLAND et al., 1991). No decurso do método, empregou-se sondas *Taqman*[®] e Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, EUA), seguindo a orientação do fabricante.

Durante a qPCR, sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) rastreiam a região polimórfica de interesse, enquanto que as sondas *TaqMan*[®], confeccionadas para cada variante alélica, competem pelo anelamento com os alelos da região, em um *mix* de reação. A sonda que anelar com a sequência alvo é degradada por intervenção da atividade exonuclease 5' → 3' da DNA polimerase, a qual gera a emissão de um sinal de fluorescência, decorrente da composição da sonda. O sinal emitido é detectado pelo filtro óptico do termociclador, o qual possibilita a quantificação em tempo real da amplificação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A Figura 4 mostra um exemplo da discriminação de alelos com a marcação VIC e FAM e a genotipagem realizada em um termociclador *Applied Biosystems StepOnePlusTM Real Time PCR Systems* (*Applied Biosystems*, EUA).

Os parâmetros de termociclagem foram preestabelecidos pelo fabricante por meio do manual *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystem®)*. A reação configurou-se em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 1 minuto a 60° para anelamento e extensão, empregando os componentes apresentados na Tabela 2.

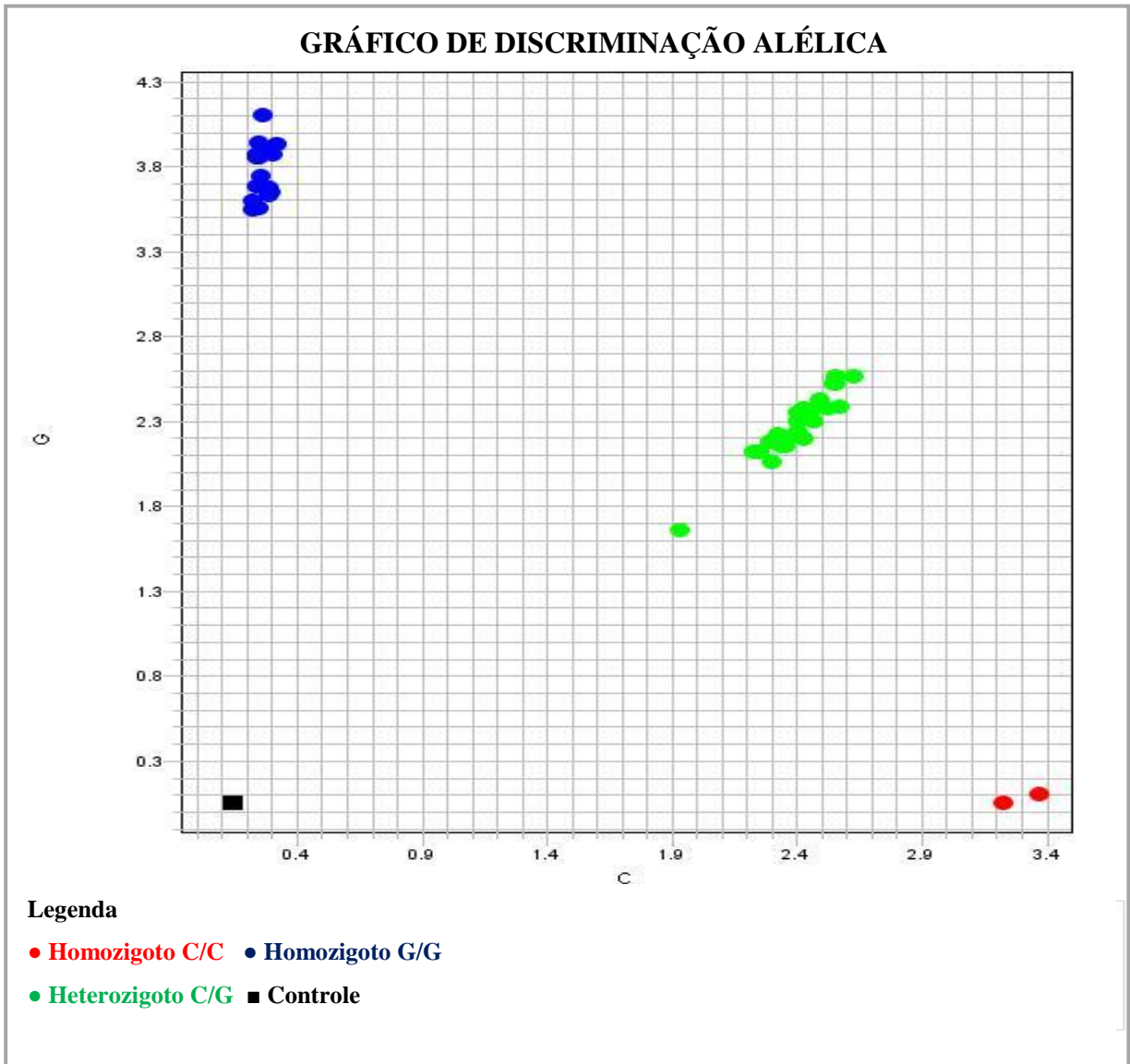


FIGURA 4. Representação gráfica da distribuição dos genótipos de rs1800795 do gene *IL6* após a reação de qPCR. Legenda: Círculos vermelhos = Homocigotos para citosina; Círculos verdes = Heterocigotos guanina/citosina; Círculos azuis = Homocigotos para guanina; Quadrado Preto = Controle Negativo.

TABELA 2. Componentes da reação de qPCR, volume e concentração final na mistura.

Componentes	Volume	Concentração Final
TaqMan Master Mix	5,0 μ L	1X
SNP Genotyping Assay	0,5 μ L	10X
H2O Milli-Q	3,5 μ L	NA
Amostra de DNA	1,0 μ L	20ng/ μ L
Volume Final	10 μ L	

As sequências de oligonucleotídeos marcadas com fluoróforos (sondas) para as reações de qPCR estão disponíveis para a visualização na Tabela 3. Vale ressaltar que todas as sondas foram construídas no sentido 5' \rightarrow 3'.

TABELA 3. Relação das sondas usadas nas reações de qPCR para a obtenção do padrão polimórfico das variantes.

Gene	SNP	Sequência contexto [VIC [®] /FAM [®]]
<i>IL6</i>	rs1800795	ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTT GC[C/G]ATGCTAAAGGACGTCA CATTGCACA
<i>IL6</i>	rs1800796	ATGGCCAGGCAGTTCTACAAC AGCC[C/G]CTCACAGGGAGAGC CAGAACACAGA
<i>CXCL8</i>	rs4073	TTATCTAGAAATAAAAAAGCA TACA[A/T]TTGATAATTCACCA AATTGTGGAGC
<i>CXCL8</i>	rs2227306	AACTCTAACTCTTTATATAGGA AGT[C/T]GTTCAATGTTGTCAGT TATGACTGT
<i>CXCL8</i>	rs2227539	ATCTTAGCAGTCAATTAATGTT AAA[A/T]TGAAGATTTAGAAAA AACTATATAT

VIC[®]/FAM[®] - fluoróforos de aproximadamente 551 e 517nm, respectivamente.

4.6 Análise dos Dados e Interpretação dos Resultados

Os dados obtidos foram tabulados no *Microsoft Office Excel*, 2016, e submetidos aos testes estatísticos nos softwares *IBM SPSS*[®], versão 21.0.0 (*IBM Corporation*, EUA) e o *BioEstat*, versão 5.3. As análises foram realizadas em um intervalo de confiança (IC) de 95%, em um nível de significância de $\leq 0,05$. Em razão do perfil das variáveis, testes não paramétricos foram empregados, quando necessários.

Os genótipos foram submetidos ao cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para verificar a hipótese de equilíbrio gênico. Os mesmos foram, posteriormente, ajustados em função do alelo de menor frequência (alelo de risco), segundo o banco de dados de SNPs (NATIONAL, 2020), para os cálculos de inferência. A distribuição dos dados genéticos, sociodemográficos e de estilo de vida foram inferidas entre os grupos estudados mediante ao teste Qui-Quadrado.

Os testes de Proporção e *odds ratio* foram calculados. No caso do primeiro, para a comparação de uma ou mais partes de uma determinada variável entre os grupos, via Qui-quadrado. Em se tratando do segundo, para estimar associação positiva entre um fator e o evento da doença, com base no incremento observado no risco.

A Regressão Logística Binária foi empregada para obtenção de modelos equacionais explicativos da relação dos fatores genéticos com a doença, verificando-se a predição de genótipos, que continham os SNPs avaliados neste estudo, sobre a variável dependente (DPC). As abordagens incluíram tanto modelos com uma única variável independente (único SNP) por vez, assim como uma modelagem combinada entre duas variáveis independentes (fator interação entre dois SNPs), quando necessário.

Por fim, as frequências haplotípicas foram obtidas por meio do *software Arlequin*, versão 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) e submetidas a análise do Qui-Quadrado (comparação entre os grupos). A análise de desequilíbrio de ligação foi realizada por meio do *software Haploview* versão 4.2 (BARRETT et al., 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados clínicos e sociodemográficos obtidos se encontram disponíveis na Tabela 4, a qual mostra as frequências e distribuições das variáveis entre os controles e os indivíduos com DPC. O parâmetro clínico utilizado descreveu o nível da perda de inserção e o estágio da doença.

TABELA 4. Valores quantificados das variáveis sociodemográficas, estilo de vida, aspectos clínicos entre os grupos estudados e seus respectivos valores de *p* (quando aplicáveis).

Características		Grupos		<i>p</i>
		Controle n (%)	DPC n (%)	
Sexo	Masculino	47 (46,5%)	23 (45,1%)	1,00 ^d
	Feminino	54 (53,5%)	28 (54,9%)	
Idade	<20	20 (19,8%)	14 (27,5%)	0,50 ^d
	20-30	51 (50,5%)	28 (43,1%)	
	31-40	11 (10,9%)	8 (15,7%)	
	>41	19 (18,8%)	7 (13,7%)	
Consumo de Álcool	Etilista	62 (61,4%)	27 (52,9%)	0,40 ^d
	Não Etilista	39 (38,6%)	24 (47,1%)	
Uso do Fio Dental	Sim	62 (82,7%)	15 (65,2%)	0,08 ^d
	Não	13 (17,3%)	8 (34,8%)	
Freq. Escovação	1x/dia	1 (1,4%) ₁	3 (14,3%) ₂	0,04 ^d
	≥2x/dia	68 (98,6%) ₁	18 (85,7%) ₂	0,01 ^e
Nível Clínico de perda de Inserção (Profundidade de Sondagem)	1 - 2mm (4mm) ^a	-	26 (51,0%)	-
	3 - 4mm (5mm) ^b	-	20 (39,2%)	-
	≥ 5mm (6mm) ^c	-	5 (9,8%)	-

a: Estágio I; b: Estágio II; c Estágio III; d: valor de *p* da análise da distribuição (Qui-Quadrado); e: valor de *p* do teste de proporção (Qui-Quadrado), onde cada número subscrito(1, 2) indica um subconjunto de grupo; n: valores contados entre os grupos referente as variáveis analisadas; *p*: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso.

Os resultados indicaram a ausência de efeito das variáveis sexo, idade, etilismo e uso do fio dental na causalidade à DPC. Diferenças significativas foram observadas em se tratando da distribuição das frequências de escovação ($p=0.04$), detectando-se uma tendência significativa ($p=0.01$) no acometimento da doença por parte dos indivíduos, que escovam menos de duas vezes ao dia. Desse modo, entende-se que a frequência de escovação maior ou igual a duas vezes ao dia influencia na diferenciação entre os grupos, se mostrando uma variável importante na DPC.

O impacto dos fatores ambientais na propensão à DPC é amplamente reconhecido. Aspectos como condições de higiene bucal (placa bacteriana), tabagismo, estresse e fatores sistêmicos podem intensificar o quadro inflamatório da doença (STABHOLZ et al, 2010). A visão difundida na comunidade científica reconhece o papel relevante da higiene oral na prevenção da DPC, sendo a placa bacteriana resultante da higiene oral limitada e pouco frequente (DEVJI, 2017). Vale ressaltar que os níveis de placa têm sido relacionados à propensão à doença, embora isso não se aplique, de forma restrita, a todos os tipos de periodontite (STABHOLZ et al, 2010).

No presente estudo, os parâmetros de higiene bucal utilizados foram categóricos, de forma que foram avaliadas as taxas de frequência de escovação e uso do fio dental, obtendo-se resultados que corroboraram com pensamento científico vigente. Os dados obtidos reforçaram a importância dos hábitos de higiene oral na prevenção à DPC, posto que a escovação pouco frequente esteve estatisticamente associada à doença, conforme os resultados de outros trabalhos, os quais obtiveram constatações semelhantes, além da detecção do aumento do risco entre duas a cinco vezes mais, referente a higiene oral pobre (LERTPIMONCHAI et al., 2017; ZIMMERMANN et al., 2015).

É importante ressaltar o papel da higiene oral na progressão à DPC, uma vez que o avanço acelerado da perda óssea pode decorrer de uma baixa regularidade nos hábitos de escovação e uso do fio dental, que reflete na longevidade e sucesso dos tratamentos (AMOO-ACHAMPONG et al., 2018; DEVJI, 2017; GREENE, 1963). Reporta-se que a redução do risco foi observada em consequência de uma escovação regular por Lertpimonchai e colaboradores (2017).

Em relação a investigação dos aspectos genéticos, a distribuição das frequências genóticas (não ajustada) e alélicas foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos para os SNPs rs1143634 (*IL1B*) e rs2227539 (*CXCL8*). Estes apresentaram maiores frequências dos genótipos contendo o alelo de risco no grupo DPC. A Tabela 5 expõe os resultados das análises de distribuição (genótipos e alelos) e do HWE.

TABELA 5. Frequência genotípica e alélica dos grupos para cada SNP estudado, valores de p referente a análise do HWE e ao teste Qui-Quadrado (análise da distribuição).

SNP	Grupos		p	
	Controle n (%)	DPC n (%)		
rs1143634				
Genótipo	CC	68 (67,3%)	25 (49,0%)	0,05*
	CT	26 (25,7%)	23 (45,1%)	
	TT	7 (6,9%)	3 (5,9%)	
Alelos	C	162 (80,2%)	73 (71,6%)	0,08
	T	40 (19,8%)	29 (28,4%)	
HWE (p)		0,06	0,73	
rs1800795				
Genótipo	GG	39 (38,6%)	13 (25,5%)	0,27
	GC	55 (54,5%)	34 (66,7%)	
	CC	7 (6,9%)	4 (7,8%)	
Alelos	G	133 (65,8%)	58 (58,8%)	0,21
	C	69 (34,2%)	41 (41,2%)	
HWE (p)		0,05*	<0,05*	
rs1800796				
Genótipo	GG	60 (59,4%)	21 (41,2%)	0,07
	CG	40 (39,6%)	30 (58,8%)	
	CC	1 (1,0%)	0 (0,0%)	
Alelos	G	160 (79,2)	72 (70,6)	0,10
	C	42 (20,8)	30 (29,4)	
HWE (p)		0,06	<0,05*	
rs4073				
Genótipo	AA	25 (24,8%)	17 (33,3%)	0,53
	AT	50 (49,5%)	22 (43,1%)	
	TT	26 (25,7%)	12 (23,5%)	
Alelos	A	100 (49,5%)	56 (54,9%)	0,40
	T	102 (50,5%)	46 (45,1%)	
HWE (p)		1,00	0,40	
rs2227306				
Genótipo	CC	53 (52,5%)	22 (43,1%)	0,52
	CT	41 (40,06%)	24 (47,1%)	
	TT	7 (6,9%)	5 (9,8%)	
Alelos	C	147 (72,8%)	68 (66,7%)	0,30

	T	55 (27,2%)	34 (33,3%)	
HWE (<i>p</i>)		<0,05*	<0,05*	
rs2227539				
Genótipo	TT	79 (78,2%)	32 (62,7%)	0,04*
	TA	22 (21,8%)	19 (37,3%)	
Alelos	T	180 (89,1%)	83 (81,4%)	0,06
	A	22 (10,9%)	19 (18,6%)	
HWE (<i>p</i>)		0,60	0,18	

n: valores contados entre os grupos referente aos genótipos de cada SNP analisado; *p*: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso; *: valor de *p* significativo ($\leq 0,05$).

Os genótipos ajustados em função do alelo de risco das variantes rs1143634 (*IL1B*), rs1800796 (*IL6*) e rs2227539 (*CXCL8*) também apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na distribuição entre os grupos. As frequências se dispuseram semelhante às análises não ajustadas (genótipos), de maneira que os genótipos que continham os alelos de risco mostraram-se prevalentes no grupo DPC. Esses resultados se fazem relevantes, visto que os genótipos são de indivíduos da mesma população, e foram agrupados segundo o diagnóstico para DPC. Desse modo, colaborando com a possibilidade de associação de genótipos e/ou alelos com a propensão à doença. Os dados de distribuição e frequência dos genótipos (ajustados em função do alelo de risco) encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6. Frequência genotípica ajustada em função do alelo de risco e valor de *p* obtido da análise de distribuição (Qui-Quadrado).

SNP	Genótipo	Grupos		<i>p</i>
		Controle n (%)	DPC n (%)	
rs1143634	CC	68 (67,3%)	25 (49,0%)	0,03*
	CT/TT	33 (32,7%)	26 (51,0%)	
rs1800795	GG	39 (38,6%)	13 (25,5%)	0,11
	GC/CC	62 (61,4%)	38 (74,5%)	
rs1800796	GG	60 (54,4%)	21 (41,2%)	0,03*
	GC/CC	41 (40,6%)	30 (58,8%)	
rs4073	AA	25 (24,8%)	17 (33,3%)	0,26
	AT/TT	76 (75,2%)	34 (66,7%)	
rs2227306	CC	53 (52,5%)	22 (43,1%)	0,27
	CT/TT	48 (47,5%)	29 (56,9%)	
rs2227539	TT	79 (78,2%)	32 (62,7%)	0,04*
	TA/-	22 (21,8%)	19 (37,3%)	

n: valores contados entre os grupos referente aos genótipos de cada SNP analisado; *p*: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas serem devido ao acaso.

As frequências de haplótipos do gene *IL6* (rs1800795 e rs1800796), assim como para o gene *CXCL8* (rs4073, rs2227306 e rs2227539) não demonstraram diferenças na distribuição ($p>0,05$) entre os grupos. O desequilíbrio de ligação também não foi constatado entre as variantes mencionadas. Assim, não houve detecção de indícios com a hipótese de suscetibilidade genética por intermédio de haplogrupos para os indivíduos goianienses avaliados. A Tabela 7 expõe os dados das frequências haplotípicas e valores de p obtidos da análise do Qui-Quadrado.

TABELA 7. Frequências dos Haplótipos dos genes *IL6* (rs1800795 e rs1800796), *CXCL8* (rs4073, rs2227306 e rs2227539) resultados da análise de distribuição, entre os grupos, mediante o teste Qui-Quadrado.

Haplótipos	Grupos		p
	Controle n (%)	DPC n (%)	
<i>IL6</i>			
CC	28 (13,9%)	26 (25,5%)	0,07
GG	119 (58,9%)	56 (54,9%)	
CG	41 (20,3%)	16 (15,7%)	
GC	14 (6,9%)	4 (3,9%)	
<i>CXCL8</i>			
TTC	87 (43,1%)	36 (35,3%)	0,53
AAT	19 (9,4%)	14 (13,7%)	
TAT	2 (1,0%)	4 (3,9%)	
ATT	55 (27,2%)	27 (26,5%)	
ATC	26 (12,9%)	15 (14,7%)	
TAC	1 (0,5%)	1 (1,0%)	
TTT	12 (5,9%)	5 (4,9%)	

n: valores contados entre os grupos referente aos haplótipos analisados; p : probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas serem devido ao acaso.

A análise de Regressão Logística Binária detectou ($p<0,05$) coeficientes de 80% para o alelo T (rs1143634), 70% para o C (rs1800796) e 80% para o A (rs2227539) na predição para a doença. A estimativa do *odds ratio* obteve valores significativos para os SNPs rs1143634 e rs1800796. Detectou-se para cada alelo T (rs1143634) e C (rs1800796), quando presente em seus respectivos *loci*, um incremento de 2,1 veze mais no risco para DPC, com intervalos de confiança de 1,1-4,3 e 1,1-4,1, respectivamente. O alelo A (rs2227539) também apresentou um incremento 2,1 vezes mais no risco à DPC, mas não significativo (IC=1,0-4,5).

Adicionalmente, o modelo de Regressão Logística Binária que combina duas variáveis independentes (interação de fatores) foi empregado para os polimorfismos rs1143634 e

rs1800796, devido ao incremento no risco, detectado anteriormente para ambos. Os resultados foram significativos ($p < 0,05$) obtendo-se um coeficiente de regressão de 1,2 e o *odds ratio* de 3,4 (IC=1,4-8,4), que por sua vez, indica o efeito aditivo das variáveis mencionadas, quando combinadas, no aumento da predição e do risco para a DPC. As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados das análises de Regressão Logística e do *odds ratio*.

TABELA 8. Resultados da análise de Regressão Logística Binária, onde a variável dependente, grupos, foi calculada em função dos genótipos ajustados (SNPs). A análise inclui o cálculo do *odds ratio*.

SNP	Genótipo	Grupos		B	p	Exp(B)	IC 95%
		Controle n (%)	DPC n (%)				
rs1143634	CC	68 (67,3%)	25 (49,0%)	0,8	0,03*	2,1	1,1-4,3*
	CT/TT	33 (32,7%)	26 (51,0%)				
rs1800795	GG	39 (38,6%)	13 (25,5%)	0,6	0,11	1,8	0,9-3,9
	GC/CC	62 (61,4%)	38 (74,5%)				
rs1800796	GG	60 (54,4%)	21 (41,2%)	0,7	0,03*	2,1	1,1-4,1*
	GC/CC	41 (40,6%)	30 (58,8%)				
rs4073	AA	25 (24,8%)	17 (33,3%)	-4,0	0,27	0,7	0,3-1,4
	AT/TT	76 (75,2%)	34 (66,7%)				
rs2227306	CC	53 (52,5%)	22 (43,1%)	0,4	0,28	1,5	0,7-2,9
	CT/TT	48 (47,5%)	29 (56,9%)				
rs2227539	TT	79 (78,2%)	32 (62,7%)	0,8	0,04*	2,1	1,0-4,5
	TA/-	22 (21,8%)	19 (37,3%)				

n: valores contados entre os grupos referente aos genótipos de cada SNP analisado; p: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso; *: valor de p significativo ($\leq 0,05$); B: Coeficiente de Regressão; Exp(B): Exponencial do coeficiente de Regressão ou *odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança do *odds ratio*.

TABELA 9. Resultados da análise de Regressão Logística Binária (fatores interação), onde a variável dependente, grupos, foi calculada em função dos SNPs rs1143634 e rs1800796 combinados.

SNPs	B	p	Exp(B)	IC 95%
rs1143634 e rs1800796	1.2	0.01*	3.4	1.4-8.4*

n: valores contados entre os grupos referente aos genótipos de cada SNP analisado; p: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso; *: valor de p significativo ($\leq 0,05$); B: Coeficiente de Regressão; Ex(B): Exponencial do coeficiente de Regressão ou *odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança do *odds ratio*.

Os resultados descritos indicaram o envolvimento de polimorfismos genéticos na casuística da DPC. Os alelos de menor frequência das variantes rs1143634 (*IL1B*), rs1800796 (*IL6*) e 2227539 (*CXCL8*) apresentaram distribuições significativas entre os grupos e uma maior prevalência nos indivíduos doentes.

A IL-1 β (*IL1B*) é um mediador pró-inflamatório indutor na expressão dos genes da IL-6 e IL-8, além de outros mediadores imunológicos que, em inflamação recorrente, colaboram na destruição da matriz conjuntiva dos tecidos de sustentação dos dentes e reabsorção óssea (SONG et al., 2019). Maiores concentrações da IL-1 β em fluido salivar têm sido quantificadas em indivíduos com DPC, conforme o nível de severidade da doença (SÁNCHEZ et al., 2013), além de taxas elevadas de transcritos do gene *IL1B* em pacientes com DPC e a doença crônica renal (BRAOSI et al., 2012). O aumento de secreção da IL-1 β esteve associado com o alelo T do polimorfismo rs1143634 em uma análise *in vitro*, de modo que foi observado um efeito alelo-dosagem, no qual os heterozigotos (CT) produziram mais IL-1 β do que os homozigotos selvagens (CC) e menos que os homozigotos mutantes (TT) (POCIOT et al., 1992).

No presente estudo, os genótipos com o alelo T (rs1143634) estiveram associados na suscetibilidade à DPC, de maneira que o incremento do risco e o efeito preditivo foram observados para a doença. Estes resultados corroboraram com os dados de Moreira e colaboradores (2005), o qual analisou uma população brasileira no Estado de Minas Gerais e detectou o alelo T como um fator de risco para DPC. Outras pesquisas avaliaram a suscetibilidade à DPC sob o efeito do alelo T (rs1143634), como no estudo de López et al. (2009), que reportou a associação significativa dos genótipos CT e TT em uma população chilena, assim como Lavu e colaboradores (2015), em uma população do Sul da Índia, o qual obteve uma frequência elevada do alelo T em indivíduos com DPC.

O papel do alelo T (rs1143634) na avaliação de risco para a DPC ainda é controverso, visto que alguns estudos têm destacado a sua implicação na suscetibilidade a doença (MAJUMDER et al., 2019; MANSO et al., 2017; AMIRISETTY et al., 2015; FERREIRA et al., 2008; GALBRAITH et al., 1999), enquanto outros têm reportado a ausência de relação do mesmo com a condição (SETTY et al., 2018; TREVILATTO et al., 2011; SAKELLARI et al., 2006). Estas divergências têm sido atribuídas às variações da frequência de polimorfismos genéticos de acordo com o perfil étnico da população estudada, assim como os parâmetros empregados durante o diagnóstico (LÓPEZ et al., 2005; KINANE; HART, 2003; GREENSTEIN; HART, 2002).

Abordagens alternativas têm ganhado notoriedade, como o trabalho realizado por Yin e colaboradores (2016), que realizou um estudo de metanálise com dados disponíveis na literatura entre 2008 a 2014, no qual se avaliou a heterogeneidade entre as publicações e obteve uma significativa associação do alelo T (rs1143634) à DPC, com um aumento de 1,5 vezes mais no risco. Semelhantemente, a metanálise realizada por Da Silva e colaboradores (2018), entre 1998 a 2016, reportou um aumento significativo do risco em 1,4 vezes mais para DPC em decorrência

do alelo T, o qual foi indicado como fator de risco. O estudo também incluiu uma abordagem estratificada, a qual demonstrou uma relação significativa do referido alelo com etnias caucasianas, asiáticas e populações mistas (miscigenadas).

Diferentes polimorfismos da interleucina 1 têm sido estudados em relação à suscetibilidade genética em se tratando das doenças periodontais. As primeiras análises envolveram um conjunto amplo de variantes não funcionais (LAINE; CRIELAARD; LOOS, 2012), embora a influência de polimorfismos da região promotora na gravidade da doença (DPC), em diferentes grupos étnicos, tenha sido relatada, posteriormente (WU et al., 2015). Segundo Loos e colaboradores (2005), as primeiras pesquisas com variantes dos genes *IL1B* e *TNFA* reportaram que os polimorfismos genéticos aumentam a expressão de suas respectivas proteínas, contribuindo para a inflamação crônica da periodontite. Sabe-se que, de acordo com o banco de dados de SNPs (NATIONAL, 2020), o rs1143634 representa uma variante genética de codificação sinônima que, por sua vez, sugere a ausência de interferência no comportamento e função da proteína IL-1 β . No entanto, foi reportado por outras pesquisas que polimorfismos sinônimos podem causar inativação do sítio de *splicing* do doador nativo, ocasionando um códon de parada precoce ou um salto do *exon*, o qual resulta em um mRNA (do inglês: *Message Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucleico Mensageiro) mais curto e, conseqüentemente, uma proteína truncada que, provavelmente, será degradada ou funcionalmente inativa (KATNENI et al., 2019; BELLONE et al., 2006; THI TRAN et al., 2005). Desse modo, corroborando com o cenário em que o rs1143634 teria impacto no funcionamento da IL-1 β , sendo capaz de influenciar no acometimento de condições progressivas.

Assim como a IL-1 β , a citocina IL-6 também participa da resposta imune a DPC, uma vez que se apresenta em grandes concentrações no fluido crevicular gengival (NOH et al., 2013) com efeitos pleiotrópicos na inflamação que, possivelmente, estimulam a reabsorção óssea osteoclástica (TANAKA; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, 2014). Estudos têm reportado o aumento do risco e a suscetibilidade a doenças inflamatórias, condicionados por polimorfismos da região promotora do gene *IL6* (BARARTABAR et al., 2018; LI et al., 2015; TREVILATTO et al. 2003) que, por sua vez, reforça o conceito de participação de variantes genéticas na progressão e no quadro inflamatório crônico da DPC (XIAO et al., 2009).

Entre os polimorfismos, o rs1800796 possui ampla notoriedade entre pesquisas que avaliam a associação da IL-6 com as condições periodontais. O alelo G (rs1800796) é reconhecido como um possível fator de risco, de maneira que um modelo genético recessivo do mesmo é perfilado na participação da patogênese (SHI, 2017; SONG et al., 2013; SHAO et al.,

2009; HOLLA et al., 2004). Contudo, essas constatações contrapõem os dados do presente estudo, o qual quantificou uma frequência significativa de genótipos contendo o alelo C associado ao incremento no risco e à predição de 70% para a DPC.

Xiao e colaboradores (2009) salientam que ainda não há evidências suficientes para atribuir ao alelo C (rs1800796) um papel protetor, decorrente da distribuição não significativa do mesmo, em pesquisas realizadas com populações da Ásia e da Europa que incluíram indivíduos com DPC (CHATZOPOULOS et al., 2018; ZHANG et al., 2013). Ressalta-se, também, a análise de Ferrari e colaboradores (2003) que detectou o aumento da atividade da IL-6 *in vitro*, condicionada pelo alelo C (rs1800796), a qual influencia no incremento dos níveis de proteína C reativa que, por sua vez, constitui um marcador de reabsorção óssea. Segundo o mesmo (FERRARI et al., 2003), sugere-se que a variante mencionada esteja implicada com doenças crônicas.

Algumas análises demonstraram a influência do alelo C (rs1800796) em doenças progressivas, como no estudo de Giampietro e colaboradores (2010), no qual os genótipos GC e CC foram associados à osteoporose com um incremento 2,5 vezes mais no risco, e Melo et al. (2020) que, por sua vez, detectaram o envolvimento do alelo C com o aumento dos níveis da IL-6 em pacientes com artrite reumatoide, além da associação dos genótipos GC e CC com a condição. Contudo, dados de outras pesquisas têm evidenciado a disparidade de perspectiva quanto à influência do papel do alelo C nas condições inflamatórias, como no estudo de Fragozo et al. (2010), que reportou um papel protetor de genótipos CC em indivíduos com a doença coronária aguda, assim como Zhao, Li e Li (2019), que detectaram a associação do genótipo GG com o aumento do risco para DPC. Desse modo, o impacto do rs1800796 nas condições inflamatórias, incluindo a DPC, ainda é inconclusivo em função das controversas entre as pesquisas, embora se reconheça que o perfil genético ou a distribuição dos genes dos grupos estudados seja a razão dos resultados díspares (HOLLA et al., 2004).

Não menos importante, a quimiocina IL-8 desempenha um papel pró-inflamatório quimiotático que mobiliza leucócitos e células inflamatórias para os sítios de inflamação em condições autoimunes, inclusive as de caráter crônico. Estudos têm reportado o efeito de quimiocinas no dano conjuntivo de condições inflamatórias crônicas, em decorrência ao aumento observado nos níveis de concentrações teciduais da proteína IL-8 (DALDEGAN; TEIXEIRA; TALVANI, 2005; BOLSTER et al., 1997; PANTELIDIS et al., 1997).

O incremento dos níveis da IL-8 nos tecidos gengivais também tem sido reportado durante a progressão da DPC (FINOTI et al., 2017; JACOB; NATH; PATEL, 2014; GAMONAL et al., 2001). Em razão disso, presume-se que a mesma potencialize os processos

inflamatórios e cause destruição tecidual (PAUL; VICTOR; PRAKASH, 2012), visto que os polimorfismos genéticos em regiões reguladoras implicariam no aumento da produção e atividade dos produtos proteicos (ORR; CHANOCK, 2008).

Os polimorfismos do gene *CXCL8* têm sido relacionados com a suscetibilidade a condições crônicas e inflamatórias em estudos com grupos populacionais brasileiros e chineses (BISHU et al., 2018; CUI; ZHAO; GUO, 2016; KANG et al., 2009). O rs4073 é um dos SNPs mais analisados quanto à propensão a doenças periodontais, em função de um amplo respaldo de associação em pesquisas que envolveram as condições mencionadas (CHEN et al., 2016; ZHANG et al., 2014; ANDIA et al., 2011; HOÇOYA; JARDINI, 2010), embora isso não se tenha repetido no presente estudo.

Por outro lado, o rs2227539 é uma variante intrônica do gene *CXCL8* pouco abordada em pesquisas que avaliam gene candidato em relação às patogenias. Neste estudo, o mesmo se mostrou associado à DPC em razão da detecção significativa de genótipos contendo o alelo A em indivíduos doentes, com predição de 80%, embora o incremento no risco não tenha sido estatisticamente significativo. Acredita-se que a ausência do genótipo AA, nos grupos estudados, tenha influenciado na significância dos resultados, em se tratando do incremento no risco, uma vez que cada alelo A poderia ter efeito aditivo na suscetibilidade à DPC.

Desse modo, conjectura-se que o alelo A (rs2227539) contribua no desequilíbrio homeostático mediante a regulação positiva do gene *CXCL8*, a qual aumenta os níveis do produto proteico. Finoti e colaboradores (2017) ponderam que os níveis elevados da IL-8 estariam relacionados com o dano tecidual, decorrente de mobilização desproporcional dos neutrófilos, que resulta na atividade proteolítica e a consequente destruição conjuntiva (ROSALES; QUEROL, 2017).

As constatações obtidas permitem um paralelo com análises que envolveram outros genes e polimorfismos, as quais reportaram a interferência de variantes intrônicas na regulação de transcritos com implicação na homeostase em condições patológicas, como também no metabolismo de substâncias exógenas (QADDOURAH et al., 2014; WANG et al., 2011; JU et al., 2010; GREENWOOD; KELSOE, 2003). Desse modo, contribuindo para novas pesquisas e discussões acerca da participação do rs2227539 na suscetibilidade e desfecho da DPC e demais condições complexas, uma vez que é uma variante pouco estudada.

Em resumo, o presente estudo reforça a participação dos fatores genéticos na suscetibilidade à DPC, devido a associação de alelos de menor frequência dos genes *IL1B* (rs1143634 T), *IL6* (rs1800796 C) e *CXCL8* (rs2227539 A), os quais foram constatados como preditores da doença. Destaque para os alelos T (rs1143634) e C (rs1800796), os quais foram

associados com o aumento do risco, quando inferidos individualmente e em conjunto. Conjectura-se que o efeito das variantes mutantes na regulação gênica colabore com o desequilíbrio homeostático mediante o quadro autoimune de inflamação recorrente (crônica), o qual promove a perda conjuntiva e óssea dos tecidos de sustentação dos dentes. Ressalta-se, ainda, o impacto da higiene oral na propensão e controle da periodontite, visto que houve associação da escovação pouco frequente com a tendência de acometimento à condição, embora a ausência de significância estatística das outras variáveis e demais polimorfismos genéticos tenham sido relatados nesta pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- As variantes genéticas rs1143634 (T), rs1800796 (C) e rs2227539 (A) mostraram-se associadas com a DPC. Os demais polimorfismos rs1800795, rs2227306 e rs4073 não apresentaram relação com a condição;
- Os haplótipos dos SNPs do gene *IL6* (rs1800795 e rs1800796) e do gene *CXCL8* (rs4073, rs2227306 e rs2227539) não demonstraram associação com a DPC;
- A escovação dos dentes está relacionada com a patologia, visto que foi relatada uma frequência significativa de indivíduos doentes que escovam menos de duas vezes por dia, a qual condicionou uma propensão ao desenvolvimento da DPC. Os demais parâmetros sociodemográficos e de estilo de vida não demonstraram associação com a doença no presente estudo;
- Cada unidade do alelo T (rs1143634) e C (rs1800796) causa um incremento no risco para doença em cerca de duas vezes mais, e três vezes mais quando combinados (uma unidade de cada em seus respectivos *loci*);
- Os polimorfismos genéticos rs1143634 (T), rs1800796 (C) e rs2227539 (A) apresentaram efeito preditivo para DPC. O aumento da predição foi observado quando os SNPs rs1143634 (T) e rs1800796 (C) foram combinados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R. F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 22, p. 379–390, 2006.
- AMAYA, M. P. et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 1, p. 71–78, 2013.
- AMIRISETTY, R. et al. Interleukin 1 β (+3954, -511 and -31) polymorphism in chronic periodontitis patients from North India. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 73, n. 5, p. 343–347, 2015.
- AMOO-ACHAMPONG, F. et al. Complex patterns of response to oral hygiene instructions: longitudinal evaluation of periodontal patients. **BMC oral health**, v. 18, n. 1, p. 72, 2018.
- ANDIA, D. C. et al. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 2, p. 211–7, fev. 2013.
- ANUSAKSATHIEN, O. et al. Distribution of interleukin-1beta(+3954) and IL-1alpha(-889) genetic variations in a Thai population group. **J Periodontol**, v. 74, n. 12, p. 1796–1802, 2003.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. **Revista Periodontia**, v. 17(2), p. 7–13, 2007.
- ANDIA, D. C. et al. Interleukin-8 Gene Promoter Polymorphism (rs4073) May Contribute to Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 6, p. 893–899, 2011.
- ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 1–6, dez. 1999.
- ARNAR, D. O.; PALSSON, R. Genetics of common complex diseases: a view from Iceland. **European Journal of Internal Medicine**, v. 41, p. 3–9, 2017.
- ARORA, N.; MISHRA, A.; CHUGH, S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 1, p. 9–13, 2014.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Advances in immunology**, v. 55, p. 97–179, 1994.
- BAKER, P. J.; ROOPENIAN, D. C. Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 11, p. 1157–1167, 2002.

- BARARTABAR, Z. et al. The relationship between 174 G/C and -572 G/C of IL-6 gene polymorphisms and susceptibility of celiac disease in the Iranian population. **Gastroenterology Review**, v. 13, n. 4, p. 293–298, 2018.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BECKER, F. et al. Genetic testing and common disorders in a public health framework: how to assess relevance and possibilities. Background Document to the ESHG recommendations on genetic testing and common disorders. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 19 Suppl 1, p. S6-44, abr. 2011.
- BELLONE, E. et al. An abnormal mRNA produced by a novel PMP22 splice site mutation associated with HNPP. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 538–540, 2006.
- BENATTI, B. et al. Inflammatory and bone-related genes are modulated by aging in human periodontal ligament cells. **Cytokine**, v. 46, n. 2, p. 176–181, 2009.
- BIJANZADEH, M. The recurrence risk of genetic complex diseases. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2017.
- BISHU, S. et al. The –251 A/T Polymorphism in the IL8 Promoter is a Risk Factor for Acute Pancreatitis. **Pancreas**, v. 47, n. 1, p. 87–91, jan. 2018.
- BOLSTER, M. B. et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 4, p. 743–751, abr. 1997.
- BORILOVA LINHARTOVA, P. et al. Haplotype Analysis of Interleukin-8 Gene Polymorphisms in Chronic and Aggressive Periodontitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- BOURGEOIS, D.; BOUCHARD, P.; MATTOUT, C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, n. 3, p. 219–227, 2007.
- BRAOSI, A. P. R. et al. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. **Cytokine**, v. 60, n. 1, p. 76–82, out. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à saúde. SB Brasil 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em: 3 out. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. Projeto SB 2000: condições de saúde bucal da população

brasileira no ano 2000: manual do examinador/ Secretaria de políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Área Técnica de Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BROWN, L. J.; LÖE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 2, n. 1, p. 57–71, jun. 1993.

BURTON, P.R. et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661–678, 2007.

CANTORE, S. et al. Cytokine gene polymorphisms associate with microbiological agents in periodontal disease: our experience. **International journal of medical sciences**, v. 11, n. 7, p. 674–9, jan. 2014.

CASTRO, M. V. M.; DUARTE, C. A. Classificação atual das doenças periodontais. Medcenter.com Odontologia, 2002. Disponível em: <http://files.odontoeducacao.webnode.com.br/200000013-45de946d8f/Classifica%C3%A7%C3%A3o%20atual%20das%20doen%C3%A7as%20periodontais.pdf>. Acessado em: 8 ago. 2018.

CATON, J. G. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30–November 2, 1999. **Annals of periodontology**, v. 4, n. 1, p. i, 1–112, dez. 1999.

CATON, J. G. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of periodontology**, v. 89, n. March, p. 1–8, 2018.

CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 64, n. 1, p. 57–80, fev. 2014.

CHATZOPOULOS, G. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphisms and the risk of further periodontal disease progression. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. e11, p. 1–11, 2018.

CHEN, Y. et al. Association between interleukin 8 –251 A/T and +781 C/T polymorphisms and osteosarcoma risk in Chinese population: a case–control study. **Tumor Biology**, v. 37, n. 5, p. 6191–6196, 2016.

CHOLEWA, M.; MADZIARSKA, K.; RADWAN-OCZKO, M. The association between periodontal conditions, inflammation, nutritional status and calcium-phosphate metabolism disorders in hemodialysis patients. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, n. 0, p. 1–8, 2018.

CORTELLINI, P.; TONETTI, M. S. Clinical and radiographic outcomes of the modified minimally invasive surgical technique with and without regenerative materials: A randomized-

- controlled trial in intra-bony defects. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 4, p. 365–373, 2011.
- CUI, Y. X.; ZHAO, H.; GUO, H. Q. Role of IL-8 rs4073 and rs2227306 polymorphisms in the development of primary gouty arthritis in a Chinese population. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.
- DA SILVA, F. R. P. et al. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: Results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. **Gene**, v. 668, n. April, p. 97–106, 2018.
- DALDEGAN, M. B.; TEIXEIRA, M. M.; TALVANI, A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 9, p. 1359–1365, set. 2005.
- DE BARROS, F. C.; FIGUEREDO, C. M. S.; FISCHER, R. G. Polimorfismo de citocinas relacionadas ao processo inflamatório periodontal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 21, p. 171–180, 2006.
- DE COO, A. et al. Assessment of genotyping tools applied in genetic susceptibility studies of periodontal disease: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v. 92, n. February, p. 38–50, 2018.
- DE MORAIS, E. F. et al. Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. **J Periodont Res**, n. July, p. 1–8, 2017.
- DEBRET, G. et al. Genetic susceptibility to a complex disease: the key role of functional redundancy. **History and philosophy of the life sciences**, v. 33, n. 4, p. 497–514, 2011.
- DEVJI, T. Moderate-quality evidence shows a strong association between inadequate oral hygiene and periodontitis. **Journal of the American Dental Association**, v. 148, n. 11, p. e161, 2017.
- DI BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519–50, jan. 2009.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 β . **Critical Care Medicine**, v. 33, n. Suppl, p. S460–S462, dez. 2005.
- DIVARIS, K. et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: A genome-wide association study. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 11, p. 2312–2324, 2013.

- EBADIAN, A. R. et al. Gene Polymorphisms of TNF- α and IL-1 β Are Not Associated with Generalized Aggressive Periodontitis in an Iranian Subpopulation. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 12, n. December, p. 345–351, 2013.
- EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. **Journal of dental research**, v. 91, n. 10, p. 914–20, 2012.
- ELLIOTT, C. L. Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 8, p. 787–790, 2001.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, maio, 2010.
- FERRARI, S. L. et al. Two Promoter Polymorphisms Regulating Interleukin-6 Gene Expression Are Associated with Circulating Levels of C-Reactive Protein and Markers of Bone Resorption in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 1, p. 255–259, 2003.
- FERREIRA, S. B. et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. **Infection and immunity**, v. 76, n. 8, p. 3725–34, 2008.
- FINOTI, L. S. et al. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 22, p. e6932, 2017.
- FLEMMIG, T. F. Periodontitis. **Annals of periodontology**, v. 4, n. 1, p. 32–8, dez. 1999.
- FRAGOSO, J. M. et al. The Interleukin 6 - 572 G>C (rs1800796) Polymorphism Is Associated with the Risk of Developing Acute Coronary Syndrome. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 14, n. 6, p. 759–763, 2010.
- GALBRAITH, G. M. et al. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 26, n. 1996, p. 705–709, 1999.
- GAMONAL, J. et al. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 36, n. 3, p. 194–203, jun. 2001.
- GARRISON, S. W.; NICHOLS, F. C. LPS-elicited secretory responses in monocytes: Altered release of PGE2 but not IL-1/ β in patients with adult periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 24, n. 2, p. 88–95, 1989.

- GEMMELL, E.; MARSHALL, R. I.; SEYMOUR, G. J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 112–143, jun. 1997.
- GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **Journal of periodontology**, v. 63, p. 338–55, 1992.
- GIAMPIETRO, P. F. et al. The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: A pilot study utilizing the marshfield clinic personalized medicine cohort. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 3, p. 467–477, 2010.
- GOICOECHEA DE JORGE, E. et al. Common and rare genetic variants of complement components in human disease. **Molecular Immunology**, n. June, p. 0–1, 2018.
- GONZALES, J. R. et al. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 5, p. 384–389, 2004.
- GREENE, J. C. Oral Hygiene and Periodontal Disease. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 53, n. 6, p. 913–922, 1963.
- GREENSTEIN, G.; HART, T. C. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 73, n. February, p. 231–247, 2002.
- GREENWOOD, T. A.; KELSOE, J. R. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. **Genomics**, v. 82, n. 5, p. 511–520, 2003.
- HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 23 jan. 2015.
- HANAI, Y. et al. Relationships between IL-6 gene polymorphism, low BMD and periodontitis in postmenopausal women. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 4, p. 533–539, 2015.
- HART, T. C.; KORNMAN, K. S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 202–215, 1997.
- HASHIMOTO, K. et al. Susceptibility alleles and haplotypes of human leukocyte antigen DRB1, DQA1, and DQB1 in autoimmune polyglandular syndrome type III in Japanese population. *Hormone Research*, v. 64, n. 5, p. 253–260, 2005.
- HERZYK, D. J. et al. Sandwich ELISA formats designed to detect 17 kDa IL-1 β significantly underestimate 35 kDa IL-1 β . *Journal of Immunological Methods*, v. 148, n. 1–2, p. 243–254, jan. 1992.
- HIENZ, S. A.; PALIWAL, S.; IVANOVSKI, S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

- HIRSCHFELD, J. Neutrophil Subsets in Periodontal Health and Disease: A Mini Review. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 1–7, 2020.
- HIRSCHHORN, J. N. et al. A comprehensive review of genetic association studies. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 45–61, abr. 2002.
- HOÇOYA, L.; JARDINI, M. Polimorfismo genético associado à doença periodontal na população brasileira: revisão de literatura. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 5, p. 305–310, 2010.
- HOLLA, L. I. et al. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. **The Journal of periodontology**, v. 75, n. 1, p. 30–36, 2004.
- HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931–945, 21 out. 2004.
- HOLLAND, P.M. et al. Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-]3' Exonuclease Activity of Thermus-Aquaticus Dna-Polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991.
- HOLTFRETER, B. et al. Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV). **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 3, p. 211–219, 2010.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM; THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1299–320, 2005.
- IRWIN, C. R.; MYRILLAS, T. T. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. **Oral diseases**, v. 4, n. 1, p. 43–7, 28 mar. 1998.
- IZADI BORUJENI, S.; MAYER, M.; EICKHOLZ, P. Activated matrix metalloproteinase-8 in saliva as diagnostic test for periodontal disease? A case–control study. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 6, p. 665–672, 2015.
- JACOB, P. S.; NATH, S.; PATEL, R. P. Evaluation of interleukin-1 β and 8 in gutka chewers with periodontitis among a rural Indian population. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 44, n. 3, p. 126–133, 2014.
- JIMI, E. et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. **Experimental cell research**, v. 93, p. 84–93, 1999.
- JOHNSON, N. W. et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 15, n. 5, p. 276–282, 1988.

- JU, H. et al. SERPINE1 intron polymorphisms affecting gene expression are associated with diffuse-type gastric cancer susceptibility. **Cancer**, v. 116, n. 18, p. 4248–4255, 15 set. 2010.
- JURK, M. et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. **Nature immunology**, v. 3, n. 6, p. 499, 2002.
- KANG, J. M. et al. The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on Helicobacter pylori-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 43, n. 5, p. 420–428, maio 2009.
- KATNENI, U. K. et al. Splicing dysregulation contributes to the pathogenicity of several F9 exonic point variants. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2019.
- KAWASHIMA, A. et al. Effect of formoterol on eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8-stimulated neutrophils. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 161, n. suppl 2, p. 10–15, 2013.
- KIM, J. H. et al. Effect of biphasic electrical current stimulation on IL-1 β -stimulated annulus fibrosus cells using in vitro microcurrent generating chamber system. **Spine**, v. 38, n. 22, p. 1368–1376, 2013.
- KINANE, D. F.; HART, T. C. Genes and Gene Polymorphisms Associated With Periodontal Disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 6, p. 430–449, 1 nov. 2003.
- KINANE, D. F.; SHIBA, H.; HART, T. C. The genetic basis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 39, p. 91–117, 2005.
- KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–14, 2017.
- KORNMAN, K. S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 1, p. 72–77, jan. 1997.
- KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 33–53, 1997.
- KRASSOWSKI, M. et al. ActiveDriverDB: Human disease mutations and genome variation in post-translational modification sites of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D901–D910, 2018.
- KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. KEGG data base: interleukin 1 beta. 2020a. Disponível em: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K04519. Acessado em 06 ago. 2020.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. KEGG data base: interleukin 6. 2020b. Disponível em: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K05405. Acessado em 06 ago. 2020.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. KEGG data base: interleukin 8. 2020c. Disponível em: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko:K10030. Acessado em 17 ago. 2020.

LAINE, M. L. et al. Modeling Susceptibility to Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 1, p. 45–50, 2013.

LAINE, M. L.; CRIELAARD, W.; LOOS, B. G. Genetic susceptibility to periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 58, n. 1, p. 37–68, fev. 2012.

LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2037–2048, 1994.

LARSEN, C. G. et al. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 243, n. 4897, p. 1464–6, 17 mar. 1989.

LAVU, V. et al. Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis: a genetic association study. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 19, n. 4, p. 175–81, 2015.

LEE, Y.-M. et al. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. **International Immunology**, v. 22, n. 10, p. 805–816, 1 out. 2010.

LERTPIMONCHAI, A. et al. The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International dental journal**, v. 67, n. 6, p. 332–343, 2017.

LI JEON, N. et al. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 826–830, 2002.

LI, L. et al. IL-6-174G/C and IL-6-572C/G polymorphisms are associated with increased risk of coronary artery disease. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8451–8457, 2015.

LINDHE, J.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. **Journal of clinical periodontology**, v. 10, n. 4, p. 433–442, 1983.

LÖE, H. et al. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **Journal of clinical periodontology**, v. 13, n. 5, p. 431–45, maio, 1986.

- LÖE, H. et al. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. **Journal of periodontology**, v. 49, n. 12, p. 607–20, dez. 1978.
- LOOS, B. G. et al. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 10, p. 1528–34, out. 2000.
- LOOS, B. G.; JOHN, R. P.; LAINE, M. L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. SUPPL. 6, p. 159–179, 2005.
- LÓPEZ, N. J.; JARA, L.; VALENZUELA, C. Y. Association of Interleukin-1 Polymorphisms With Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 2, p. 234–243, 2005.
- LÓPEZ, N. J.; VALENZUELA, C. Y.; JARA, L. Interleukin-1 Gene Cluster Polymorphisms Associated With Periodontal Disease in Type 2 Diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 10, p. 1590–1598, out. 2009.
- MACARTHUR, J. et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D896–D901, 2017.
- MAGNUSSON, I.; LINDHE, J. Current concepts in diagnosis and treatment of periodontitis. **Seminars in orthodontics**, v. 2, n. 1, p. 13–20, 1996.
- MAJUMDER, P. et al. Interleukin gene polymorphisms in chronic periodontitis: A case-control study in the Indian population. *Archives of Oral Biology*, v. 101, n. March, p. 156–164, maio 2019.
- MANSO, J. A. X. et al. Verificação Genotípica Do Polimorfismo Rs1143634 Do Gene IL1B Em Indivíduos Com a Doença Periodontal Crônica. **Revista Periodontia**, v. 27, n. 02, p. 27–33, 2017.
- MARK BARTOLD, P.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 203–217, 2013.
- MATSUKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HARA, K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. **Immunology**, v. 76, n. 1, p. 42–47, 1992.
- MAZIAK, W. Is uncertainty in complex disease epidemiology resolvable? **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 10–13, 2015.
- MAZUREK-MOCHOL, M. et al. IL-1 β rs1143634 and rs16944 polymorphisms in patients with periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, v. 98, n. November 2018, p. 47–51, 2019.

- MELO, T. S. et al. Evaluation of Interleukin 6 Polymorphisms and Its Association With Rheumatoid Arthritis in Brazilian Women. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 129, n. 1, p. e160, 2020.
- MENG, H. et al. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontology* **2000**, v. 43, n. 1, p. 133–159, 2007.
- MICHALOWICZ, B. S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 65, n. 5 Suppl, p. 479–88, maio, 1994.
- MICHALOWICZ, B. S. Genetic and inheritance considerations in periodontal disease. *Current Opinion in Periodontology*., p. 11-17, 1993.
- MIYAZAKI, T. et al. Reciprocal role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *The Journal of cell Biology*, v. 148, n. 2, p. 333–342, 2000.
- MOIMAZ, S. A. S.; SALIBA, N. A.; ZINA, L. G. Condição periodontal durante a gestação em um grupo de mulheres brasileiras. *Cienc Odontol Bras*, v. 9, n. 4, p. 59–66, 2006.
- MOREIRA, P. R. et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*, v. 40, p. 306–311, 2005.
- MORINHA, F. et al. Detection and characterization of interleukin-6 gene variants in *Canis familiaris*: Association studies with periodontal disease. *Gene*, v. 485, n. 2, p. 139–145, 2011.
- MÜLLER, B. et al. Improved prediction of complex diseases by common genetic markers: state of the art and further perspectives. *Human Genetics*, v. 135, n. 3, p. 259–272, 2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library of Medicine (US). Gene CXCL8 C-X-C motif chemokine ligand 8 [Homo sapiens (human)]. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576#top>. Acessado em 29 ago. 2018.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library of Medicine (US). Gene IL1B interleukin 1 beta [Homo sapiens (human)]. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>. Acessado em 27 fev. 2020.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library of Medicine (US). Data base SNP. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Acessado em 27 fev. 2020.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library of Medicine (US). Gene *IL6* Interleukin 6 [Homo sapiens (human)]. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>. Acessado em 06 ago. 2020.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, v. 11, n. 2, p. 72–80, 2017.

- NI, X. B. et al. Comprehensive analysis of interleukin-8 gene polymorphisms and periodontitis susceptibility. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 48996–49004, 2017.
- NOH, M. K. et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 3, p. 847–851, 2013.
- NOLAN, J. D. et al. PTU-198 Serum FGF19 Levels are Related to Disease Activity in Ileal Crohn's Disease. **Gut**, v. 62, n. June, p. 304907, 2013.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.
- NUKAGA, J. et al. Regulatory Effects of Interleukin-1 β and Prostaglandin E 2 on Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand. **Journal of Periodontology**, n. February, p. 249–259, 2004.
- NUTO, S. D. A. S.; NATIONS, M. K.; COSTA, Í. D. C. C. Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 681–690, 2007.
- OFFENBACHER, S.; BARROS, SP.; BECK, JD. Rethinking periodontal inflammation. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1577–84, 2008.
- OJIMA, M.; HANIOKA, T. Destructive effects of smoking on molecular and genetic factors of periodontal disease. **Tobacco Induced Diseases**, v. 8, n. 1, p. 4, 2010.
- OLIVEIRA, M. R. G. DE et al. RPS (Registro Periodontal Simplificado): Método rápido e simples na identificação precoce da doença periodontal. **Odontologia Clínico Científica**, v. 14, n. 1, p. 555–558, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Oral health. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>. Acessado em: 09/06/2015.
- ORR, N.; CHANOCK, S. Common genetic variation and human disease. **Advances in genetics**, v. 62, n. 08, p. 1–32, 2008.
- PALOMINO, D. C. A. T.; MARTI, L. C. AVALHEIR. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.
- PANTELIDIS, P. et al. Up-regulation of IL-8 secretion by alveolar macrophages from patients with fibrosing alveolitis: a subpopulation analysis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 108, n. 1, p. 95–104, abr. 1997.
- PAPAPANOU, P. N.; SUSIN, C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 45–51, 2017.

- PARK, H.; YIM, M. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses PGE2-induced osteoclast formation by lowering osteoclast progenitor cell viability. **Archives of pharmacal research**, v. 30, n. 4, p. 486–492, 2007.
- PARKHILL, J M et al. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 27, n. 9, p. 682–9, 2000.
- PAUL, A.; VICTOR, D.; GANA PRAKASH, P. Role of Interleukin-8 in Periodontal Disease. **International Journal of Clinical Dental Science**, v. 3, n. 2, 2012.
- PAULANDER, J. et al. Intra-oral pattern of tooth and periodontal bone loss between the age of 50 and 60 years. A longitudinal prospective study. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 62, n. 4, p. 214–22, 2004.
- PEREIRA, S. A. et al. Antagonistic effect of IL1 variants in periodontitis and external apical root resorption: Evidence from a literature review. **Archives of Oral Biology**, v. 95, n. February, p. 195–201, 2018.
- PICOLOS, D.K. et al. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 10, p. 1055–1061, 2005.
- PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809–20, 19 nov. 2005.
- POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European journal of clinical investigation**, v. 22, n. 6, p. 396–402, 1992.
- PRAKASH, G. et al. Role of TNF-A, IL-6 and IL-4 with the susceptibility to chronic periodontitis in North Indian population: a multi-analytic approach. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. Suppl 1, p. P72, 2014.
- PRESHAW, P. M.; BISSETT, S. M. Periodontitis. Oral Complication of Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 42, n. 4, p. 849–867, 2013.
- PRESTES, J. et al. Papel da Interleucina-6 como um sinalizador em diferentes tecidos durante o exercício físico. *Fitness & performance journal*, n. 6, p. 348–353, 2006.
- PUMKLIN, J.; BHALANG, K.; PAVASANT, P. Hypoxia enhances the effect of lipopolysaccharide-stimulated IL-1 β expression in human periodontal ligament cells. **Odontology**, v. 104, n. 3, p. 338–346, 2016.
- QADDOURAH, R. H. et al. IL-10 gene promoter and intron polymorphisms and changes in IL-10 secretion in women with idiopathic recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, v. 29, n. 5, p. 1025–1034, 1 maio 2014.

- RAZZOUK, S.; TERMECHI, O. Host genome, epigenome, and oral microbiome interactions: toward personalized periodontal therapy. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 9, p. 1266–71, 2013.
- REDDY, B. V. R. et al. Hygiene hypothesis and periodontitis--a possible association. **Medical hypotheses**, v. 82, n. 1, p. 60–3, jan. 2014.
- REIHMANE, D.; DELA, F. Interleukin-6: Possible biological roles during exercise. **European Journal of Sport Science**, v. 14, n. 3, p. 242–250, 3 abr. 2014.
- RESEARCH, S. AND T. C. OF A. A. OF P. Informational paper: implications of genetic technology for the management of periodontal diseases. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 5, p. 850–7, maio, 2005.
- RETTORI, E. et al. Host Neuro- Immuno-Endocrine Responses In Periodontal Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 29, p. 4749–4759, 2014.
- RONDEROS, M.; PIHLSTROM, B. L.; HODGES, J. S. Periodontal disease among indigenous people in the Amazon rain forest. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 11, p. 995–1003, 2001.
- ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Neutrophil Role in Periodontal Disease. In: Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis. [s.l.] InTech, 2017. v. ip. 13.
- SAINZ, J. et al. Genetic variants of IL6 gene promoter influence on C-reactive protein levels but are not associated with susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis in haematological patients. **Cytokine**, v. 41, n. 3, p. 268–78, 2008.
- SAKELLARI, D. et al. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, p. 765–770, 2006.
- SÁNCHEZ, G. A. et al. Salivary IL-1 β and PGE 2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1112–1117, dez. 2013.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, P.E. et al. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. **Oral Diseases**, v. 17, n. 5, p. 522–529, 2011.
- SCAREL-CAMINAGA, R. M. et al. Haplotypes in the Interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 292–302, 2011.
- SCHÄFER, A. S.; JEPSEN, S.; LOOS, B. G. Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. 2, p. 103–7, fev. 2011.

- SÉFORA-SOUSA, M.; DE ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 617–626, 2013.
- SETTY, S. et al. Association of Interleukin-1 β + 3954 (Rs1143634) Gene Polymorphism in Periodontal Healthy and Chronic Periodontitis Patients Association of Interleukin- 1 β + 3954 (Rs1143634) Gene Polymorphism in Periodontal Healthy and Chronic Periodontitis Patients. **Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 17, p. 58–63, 2018.
- SEYMOUR, G. J. Importance of the host response in the periodontium. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 421–426, 1991.
- SEYMOUR, G. J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: Where to from here? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59, n. 3, p. 167–173, 2001.
- SHAO, M. et al. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 10, n. 12, p. 920–7, 2009.
- SHEN, X. H. et al. Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation. **International Immunopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 261–267, 2013.
- SHI, D. Interleukin-6-572C/G polymorphism is associated with the risk of chronic periodontitis. *Biomedical Research (India)*, v. 28, n. 15, p. 6637–6639, 2017.
- SNYDER, E. E. et al. The Human Obesity Gene Map: The 2003 Update. **Obesity Research**, v. 12, n. 3, p. 369–439, mar. 2004.
- SOFAER, J. A. Genetic approaches in the study of periodontal diseases. **Journal of clinical periodontology**, v. 17, n. 7 Pt 1, p. 401–8, ago. 1990.
- SONG, G. G. et al. Association between tumor necrosis factor- α promoter –308 A/G, –238 A/G, interleukin-6 –174 G/C and –572 G/C polymorphisms and periodontal disease: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 5191–5203, 2013.
- SONG, H.-K. et al. Reversine inhibits MMP-3, IL-6 and IL-8 expression through suppression of ROS and JNK/AP-1 activation in interleukin-1 β -stimulated human gingival fibroblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 108, n. August, p. 104530, dez. 2019.
- SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94–99, 2008.

- STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, W. A.; SHAPIRA, L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontology** 2000, v. 53, n. 90, p. 138–53, jun. 2010.
- STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189–197, 2018.
- TABA JR, M.; SOUZA, S. L. S.; MARIGUELA, V. C. Periodontal disease: a genetic perspective. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. spe1, p. 32–38, 2012.
- TABOR, H. K.; RISCH, N. J.; MYERS, R. M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: Practical considerations. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 5, p. 391–397, 2002.
- TAKASHIBA, S.; NARUISHI, K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. **Periodontology** 2000, v. 40, n. 2006, p. 94–106, 2006.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–76, jan. 2003.
- TANAKA, K. et al. Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 4, p. 227–33, 2014.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.6(10), p. 1-16, 2014.
- TELES, R. et al. Modelling changes in clinical attachment loss to classify periodontal disease progression. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 5, p. 426–434, 2016.
- TENG, Y.-T. A. the Role of Acquired Immunity and Periodontal Disease Progression. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 237–252, 1 jul. 2003.
- TETTAMANTI, L. et al. Genetic susceptibility and periodontal disease: a retrospective study on a large italian sample. **ORAL & implantology**, v. 10, n. 1, p. 20–27, 2017.
- THI TRAN, H. T. et al. A G-to-A transition at the fifth position of intron-32 of the dystrophin gene inactivates a splice-donor site both in vivo and in vitro. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 85, n. 3, p. 213–219, jul. 2005.
- TOMASI, C.; WENNSTRÖM, J. L.; BERGLUNDH, T. Longevity of teeth and implants - A systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 35, n. S1, p. 23–32, 2008.
- TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMANN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of periodontology**, v. 89, n. February, p. S159–S172, 2018.

- TREVILATTO, P. C. et al. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. **Archives of oral biology**, v. 56, n. 1, p. 54–62, jan. 2011.
- TREVILATTO, P. C. et al. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 5, p. 438–442, maio 2003.
- TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Inflammation. 5^a edição ed. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH, 1997.
- TSUKAMOTO, H. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK α -IRF3 axis activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 26, p. 10186–10201, 2018.
- UITTO, V. J.; OVERALL, C. M.; MCCULLOCH, C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. **Periodontol 2000**, v. 31, n. 213, p. 77–104, 2003.
- UNIPROT. Data base: interleukin 8. 2020. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10145>. Acessado em 17 ago. 2020.
- VAITHILINGAM, R. D. et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: Relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 6, p. 683–695, 2014.
- VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W. H.; JOARDER, M. A.; BEGUM, A. Prevalence and severity of periodontal diseases and dental caries in Bangladesh. **International dental journal**, v. 46, n. 2, p. 76–81, abr. 1996.
- VIEIRA, R. W. Cardiovascular and periodontal diseases. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 29, n. 1, p. VII–IX, 2014.
- VIJAYALAKSHMI, R. et al. Genetic polymorphisms in periodontal diseases: An overview. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, n. 4, p. 568, 2010.
- WANG, D. et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. **The pharmacogenomics journal**, v. 11, n. 4, p. 274–86, ago. 2011.
- WIEBE, C. B.; PUTNINS, E. E. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology - An update. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 66, n. 11, p. 594–597, 2000.
- WILLIAMS, D. M. The research agenda on oral health inequalities: the IADR-GOHIRA initiative. **Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 23 Suppl 1, n. suppl 1, p. 52–9, jan. 2014.

- WU, X. et al. Association of interleukin-1 gene variations with moderate to severe chronic periodontitis in multiple ethnicities. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 1, p. 52–61, fev. 2015.
- XIAO, L. et al. Association among interleukin-6 gene polymorphism, diabetes and periodontitis in a Chinese population. **Oral Diseases**, v. 15, n. 8, p. 547–553, nov. 2009.
- XING, Z. et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 311–320, 1998.
- XU, W.; LARBI, A. Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. **Experimental Gerontology**, v. 107, n. November 2017, p. 98–101, 2018.
- YIN, W. T.; PAN, Y. P.; LIN, L. Association between IL-1 α rs17561 and IL-1 β rs1143634 polymorphisms and periodontitis: A meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.
- YOSHIE, H. et al. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 43, p. 102–32, 2007.
- ZHANG, N. et al. Analysis of interleukin-8 gene variants reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for chronic periodontitis in the Han population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- ZHANG, Y. et al. Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. **Cancer Research**, v. 73, n. 20, p. 6359–6374, 2013.
- ZHAO, B.; LI, X.; LI, R. Genetic Relationship Between IL-6 rs1800796 Polymorphism and Susceptibility to Periodontitis. **Immunological Investigations**, v. 48, n. 3, p. 268–282, 2019.
- ZIMMERMANN, H. et al. Is frequency of tooth brushing a risk factor for periodontitis? A systematic review and meta-analysis. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 116–127, abr. 2015.
- ZOU, W.; BAR-SHAVIT, Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 7, p. 1211–1218, 2002.
- ZWAHLEN, R.; WALZ, A.; ROT, A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. **International review of experimental pathology**, v. 34 Pt B, p. 27–42, 1993.

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **“Doença Periodontal Crônica em Adultos – A Relação do Polimorfismo das Interleucinas 1 β , 8 e 16”**. Meu nome é Renato Hannum sou o pesquisador responsável. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Renato Hannum nos telefones: (62) 8457-9798 ou (62) 3946-1443 ou através do e-mail: hannumm@hotmail.com . Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia-Goiás.

A doença periodontal é uma doença multifatorial que ataca os tecidos gengivais. Entre os fatores causais se acredita que há participação do fator genético. Este estudo tentará demonstrar que a doença periodontal (periodontite) está associada a um caráter genético em seu desenvolvimento.

Serão formados dois grupos: pacientes com periodontite (em sua fase ativa) e pacientes sem periodontite (grupo controle). O sangue periférico será colhido por profissionais treinados e será retirado da veia na região do braço. O material do participante será armazenado e estocado no banco de dados do Núcleo de Pesquisas Replicon, localizado no departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Todo procedimento será realizado com cautela para evitar qualquer dano ao voluntário, incluindo assepsia local, uso de agulhas e seringas descartáveis. A punção de vasos periféricos está associada a um risco muito pequeno e é quase livre de complicações. Podendo ocorrer hematoma local (colecção (ou seja, acúmulo) de sangue no tecido), na maioria dos casos a situação reverte espontaneamente e dor ao toque no local, que desaparecerá espontaneamente. Será extraído o DNA das células sanguíneas (leucócitos) para a pesquisa do fator genético.

Riscos e Benefício do Estudo: O sangue periférico será obtido por profissionais treinados e será retirado por punção venosa na região do antebraço. Todo o procedimento seguirá as precauções de rotina estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde do Brasil. Todo o material usado será estéril e descartável. A punção de vasos periféricos está associada a um risco muito pequeno, com raros episódios de complicações graves, como a septicemia. Sendo mais frequente a ocorrência de hematomas locais subcutâneos, que se reverte espontaneamente. A percepção de dor é variada para cada paciente, embora seja relatada como dor discreta e ao toque. A sensação desaparece espontaneamente. O benéfico do presente estudo encontra-se

descrito na justificativa acima. A priori, a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes à evolução da periodontite promoverá uma melhor abordagem de diagnóstico e prognóstico, que direcionará a terapêutica e a prevenção. Assim, contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados.

O Senhor (a) voluntário terá toda garantia de acompanhamento e assistência, caso necessite durante o período do estudo, tendo a liberdade em se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem penalidades ou prejuízo ao cuidado com a sua saúde. Há também a garantia do sigilo de dados, que assegura a privacidade dos participantes voluntários quanto às informações confidenciais envolvidas na pesquisa.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Renato Hannum sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

APÊNDICE II

Questionário

Título do projeto: Doença Periodontal Crônica em Adultos – A Relação do Polimorfismo das Interleucinas1 β , 8 e 16

IDENTIFICAÇÃO	
Data de Nascimento: ___/___/___	Idade: _____ anos Peso: _____ Kg
Altura: _____ m	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Endereço: _____	
Nº _____	
Bairro: _____	Cidade: _____ Estado: _____
Telefone: (_____) _____	Celular: (_____) _____
Email: _____	

Estado Civil:	
<input type="checkbox"/> Solteiro	<input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Viúvo <input type="checkbox"/> Separado <input type="checkbox"/>
Outro: _____	
Escolaridade:	
<input type="checkbox"/> E. Fundamental	<input type="checkbox"/> E. Médio <input type="checkbox"/> E. Superior <input type="checkbox"/> E. Técnico <input type="checkbox"/>
Outros: _____	
Profissão: _____	

ESTILO DE VIDA	
1-Possui alguma Doença?:	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Quais: _____	

2-Possui algum defeito de nascimento/ desordem genética hereditária?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Quais: _____	

3-Histórico Familiar de: <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Alergias <input type="checkbox"/> Hipertensão <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/>	
Aborto <input type="checkbox"/>	Alterações Congênitas <input type="checkbox"/>
Outros: _____	
6-Possui Filho(s)?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Se sim quantos?: _____	
Se sim, algum apresenta problemas de saúde?: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não.	
Se _____	sim, _____ qual(is): _____

7-Teve algum filho com nascimento prematuro: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	

8-O (A) Sr. (a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente pelo menos por 1 ano? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Se sim, quantos por dia?: _____	
9-Parou faz quanto tempo?: _____	

10-Faz consumo de bebidas alcoólicas?: Sim Não.

Se sim, com qual frequência em números (1X,2X,3X):

Diariamente; dias na semana; dias no mês; Sazonalmente(datas especiais).

Quantidade em copos, latas, garrafas: _____

11-Ex-etilista (alcoólatra)?: Sim Não

Se sim, fazia uso de bebida? :

Diariamente; dias na semana; dias no mês; Sazonalmente(datas especiais). Quantidade em copos, latas, garrafas: _____

12-Pratica exercícios físicos?: Sempre As vezes Nunca

13-Faz uso de algum medicamento?: Sim Não.

Se Sim

qual(is)?: _____

14-Possui dependência Química? (Uso de algum tipo de Drogas ilícitas): Sim Não.

Se Sim

qual(is)?: _____

15-Possui histórico de dependência Química na Família?: Sim Não.

16- O (A) Sr. (Sra.) faz uso do fio dental?: Sim Não.

Se sim, com qual frequência (1X, 2X, 3X):

Ao dia; Na semana; No mês; Esporadicamente (pouco).

17- Quantas vezes ao dia realiza a escovação dos dentes (1X, 2X, 3X)? :

18- Com que frequência comparece a clínica odontológica para consultas?

Uma vez ao ano; Duas vezes ao ano; Regularmente; Esporadicamente (pouco).

19- Já realizou algum tratamento odontológico? Sim Não.

Se sim, para qual finalidade? : _____

20- Algum relato recente de sangramento gengival durante a higienização oral? : Sim Não.

21- Possui histórico de gengivite? Sim Não.

ANEXOS

PERIOGRAMA

Data _____

Paciente Sobrenome _____

Nome _____

Data de Nascimento _____

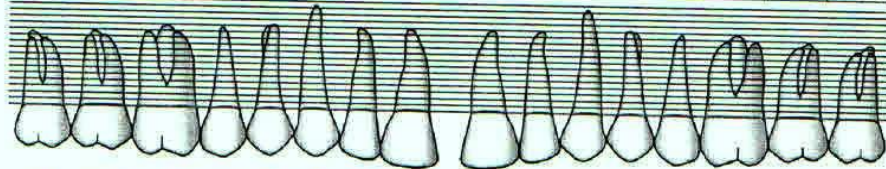
Exame Inicial

Reavaliação

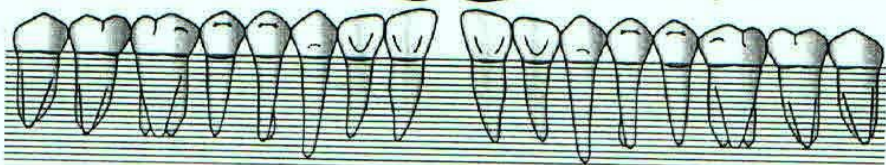
Profissional _____

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Mobilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implante																
Furca																
Sangramento à sondagem																
Placa																
Margem gengival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidade de sondagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Vestibular



Palatina

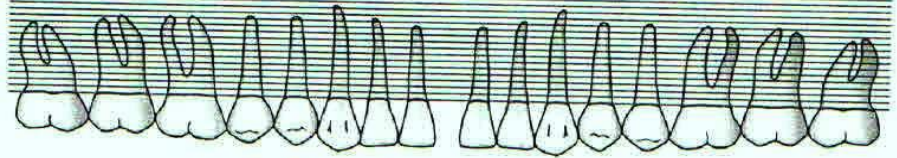


Margem gengival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidade de sondagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa																
Sangramento à sondagem																
Furca																
Nota																

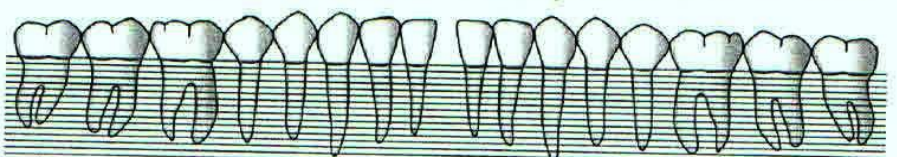
Média da profund. de sondagem = 0 mm Média do nível de inserção = 0 mm 0% Placa 0% Sangramento à sondagem

Nota																
Furca																
Sangramento à sondagem																
Placa																
Margem gengival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidade de sondagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lingual



Vestibular



Margem gengival	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profundidade de sondagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa																
Sangramento à sondagem																
Furca																
Implante																
Mobilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

VERIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO POLIMORFISMO RS1143634 DO GENE *IL1B* EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA

Genotypic Verification rs1143634 polymorphism *IL1B* gene in Individuals with Chronic Periodontal Disease

João Antonio Xavier Manso³, Thiago Athayde Leite¹, Lilian de Souza Teodoro², Fernanda Ribeiro Godoy³, Emília Oliveira Alves Costa⁴, Lysa Bernardes Minasi⁶, Renato Hannum⁵, Alex Silva da Cruz⁶, Cláudio Carlos da Silva⁶, Aparecido Divino da Cruz⁶.

¹ Graduado em Ciências Biológicas Modalidade Médica pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás

² Mestranda em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás

³ Doutorandos em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás - UFG

⁴ Pós-doutoranda da Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás

⁵ Professor pesquisador da Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da PUC Goiás

⁶ Professores pesquisadores da Escola de Ciências Agrárias e Biológicas – PUC Goiás

Recebimento: 08/11/16 - Correção: 18/01/17 - Aceite: 15/02/17

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar a frequência do polimorfismo rs1143634 do gene *IL1B* em indivíduos com a doença periodontal crônica (DPC) e a relação do mesmo com o risco de afecção. Foram analisadas 39 amostras de um grupo de indivíduos diagnosticados com DPC, sendo 77% com nível leve, 21% com o nível moderado e 3% com o nível severo, apresentando uma média de idade de 43,26. Durante o estudo foram utilizadas as técnicas de PCR e RFLP para o rastreamento do SNP (Do Inglês, *Single nucleotide polymorphism* - Polimorfismo de Núcleo Único) rs1143634, verificando-se diferenças significativas ($p < 0,0001$) e uma redução absoluta de risco de 53,8% referente à presença do alelo C, indicando o alelo T como um fator de risco. No entanto, este resultado também sugere a possibilidade da participação de outros fatores, uma vez que a redução obtida foi pouco acima de 50%, e deste modo, poderia apontar para o envolvimento de elementos relacionados aos hábitos de vida (higiene bucal, tabagismo e etilismo) e/ou outros aspectos genéticos, considerando que o gene *IL1B* entre outros mediadores implicados com a patogênese da DPC possuem várias regiões polimórficas.

UNITERMOS: Interleucina-1beta, Polimorfismo Genético, Periodontite Crônica.. R Periodontia 2017; 27: 27-33.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm se visto a importância do papel da genética na Medicina por meio das alterações na prática médica que são influenciadas pelo esclarecimento de genomas característicos para doenças, assim como em função do uso de ferramentas para o diagnóstico e previsão de risco abrangendo enfermidades raras e comuns (Varmus, 2002). Além disto, tem sido constatado que uma parcela considerável das doenças possui uma base genética, incluindo-se entre estas a periodontite (doença periodontal crônica) e, devido a isso, conjectura-se que um maior entendimento dos fundamentos genéticos envolvidos em uma patologia possam contribuir para o aumento da compreensão dos aspectos etiológicos de uma doença

(Kinane *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2015).

Dentre as manifestações clínicas que acometem a saúde bucal, a doença periodontal crônica (DPC) é uma das mais comuns apresentando uma classificação difícil devido à quantidade de fatores a serem observados. Estima-se que a DPC acometa entre 40 a 60% da população adulta, quando se considera o nível moderado de severidade (Preshaw *et al.*, 2012) e que a mesma, incluindo os seus três níveis de gravidade cause um impacto negativo na qualidade de vida das pessoas (Meusel *et al.*, 2015), podendo atuar como fator de risco para outras doenças (Pessoa *et al.*, 2011; Preshaw *et al.*, 2012; Braosi *et al.*, 2012).

A doença periodontal (DP) caracteriza-se como um fenômeno complexo multifatorial de etiologia microbiana envolvendo fatores genéticos e ambientais, os quais poderão

modular a infecção gengival, ocasionando um grupo de doenças inflamatórias, incluindo periodontite e gengivite, uma vez que a placa bacteriana que acumula entre os dentes, penetra o suco gengival afetando os tecidos de sustentação causando inflamações recorrentes (Socransky & Haffajee, 1992; Arora *et al.*, 2014).

Atualmente, a classificação empregada para as doenças periodontais, é a de 1999, que por sua vez abrange novas categorias como no caso das doenças gengivais, mas havendo exclusões de doenças que se sobreponham, além da renomeação de outras, como no caso da "Periodontite do Adulto", a qual passou a ser "Periodontite Crônica", que exhibe três níveis de severidade: leve, moderada e severa (Armitage, 1999; Highfield, 2009).

Em se tratando do curso do processo patológico da DPC, observa-se que a resposta clínica ao tratamento difere entre os pacientes, pois, existe uma variabilidade individual na resposta inflamatória diante do desafio microbiológico, a qual é determinada por fatores genéticos ou por sua interação com fatores ambientais, assim como aqueles relacionados com os hábitos do indivíduo, por exemplo, a higiene bucal (Offenbacher *et al.*, 2008).

As citocinas são os agentes funcionais mediadores da resposta inflamatória, contudo, reporta-se que as interleucinas (citocinas) contribuem na patogênese de diversas doenças crônicas, inclusive nos processos de reabsorção óssea, observados na periodontite, estimulando a atividade osteoclástica (Burgener *et al.*, 2010; Preshaw & Taylor, 2011). Pociot e colaboradores (1992) relataram a associação do alelo 2 (T) do gene *IL1B* (posição +3954) com o potencial aumento da produção de interleucina 1 β (IL-1 β), descrevendo uma relação entre o polimorfismo do gene que codifica a IL-1 β (+3954) e a crescente severidade da periodontite. A IL-1 β desempenha funções importantes na ativação e maturação dos osteoclastos, desencadeando ações sistêmicas em todo organismo e potencializando os efeitos da reabsorção óssea (Dewhirst *et al.*, 1985; Al-Qawasmi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2010; Trevilatto *et al.*, 2011).

De acordo com Page (1991) o aumento do número de bactérias periodontais na superfície dento-gengival pode resultar na penetração destas e de seus subprodutos nos tecidos gengivais, provocando uma resposta inflamatória com produção de mediadores inflamatórios (Finoti *et al.*, 2013). Estudos realizados por Guzman e colaboradores (2003) confirmaram que o genótipo contendo o alelo (T) para o polimorfismo rs1143634 referente ao gene *IL1B* está associado com a DPC. Contudo esta enfermidade é considerada multifatorial e ainda não é totalmente compreendida (Page, 1991; Guzman *et al.*, 2003; Genco & Borgnakke, 2013).

Ao investigar a potencial relação entre DPC e sua susceptibilidade genética decorrente do genótipo da IL-1 β , espera-se obter resultados que permitam estabelecer tal associação. Além disso, tem-se demonstrado que a susceptibilidade da DPC poderá favorecer um indicador de prognóstico real para o paciente, proporcionando uma melhor qualidade de vida, que possibilita um atendimento customizado ao paciente (Kinane & Hart, 2003).

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo rs1143634 em indivíduos portadores da doença periodontal crônica avaliando a possibilidade de um alelo de risco para doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi de caráter transversal e descritivo, sendo conduzida no Núcleo de Pesquisa Replicon, Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Descrição do grupo amostral

Referente ao delineamento, devido à dificuldade de se conseguir uma quantidade razoável de participantes que atendessem os requisitos mínimos, optou-se por uma amostragem não probabilística, constituída por amostras de conveniência oriundas de 39 indivíduos portadores da doença periodontal crônica (DPC), sendo estes, pacientes de uma clínica odontológica de Goiânia, residentes da região metropolitana da mesma cidade, que por sua vez se voluntariaram. Estes participantes foram catalogados segundo sexo e idade (30 - 55 anos), adotando a menoridade civil, o tabagismo e o diabetes como critérios de exclusão.

A eliminação mediante os dois últimos aspectos citados, foi adotada com a intenção de filtrar a análise, uma vez que constituem como características indutoras (Ojima & Hanioka, 2010) ou relacionadas com o risco de afecção (Preshaw *et al.*, 2012), sendo que, para este estudo uma das finalidades prioritárias foi avaliar os aspectos genéticos de modo a tentar isolá-los, embora ocorram limitações para tal tentativa, devido a impossibilidade de cancelamento de outras características, como por exemplo, o etilismo.

Os participantes deste estudo foram submetidos a avaliação do periograma, o qual foi realizado por profissional especializado em periodontia, que por sua vez utilizou uma sonda periodontal milimetrada, empregando-se o modelo de índice periodontal comunitário (IPC) (Brasil. Ministério da Saúde, 2001), sendo cada dente dos sextantes avaliados, mas priorizando os sítios de maior profundidade para diagnosticar e classificar os níveis de severidade da doença, além disso, os

voluntários também foram submetidos à coleta de sangue periférico.

No tocante aos dados descritivos, o grupo amostral apresentou uma média de idade de 43,26 (\pm 6,88), a tabela 1 exibe outras informações, referentes as variáveis: sexo, idade, nível clínico de inserção (nível de severidade).

Extração e Isolamento do DNA genômico

O DNA foi extraído através de amostras biológicas obtidas mediante a coleta de 4mL de sangue periférico em EDTA, a extração ocorreu a partir do sangue total, utilizando o *kit Illustra Blood Genomic Mini Spin®* (GE healthcare, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

Descrição dos métodos de Amplificação e RFLP

O DNA isolado foi amplificado por PCR (Do inglês: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase). Os protocolos para as reações de PCR foram otimizados a partir dos métodos sugeridos na literatura (Mellati *et al.*, 2007). Depois de amplificados, os produtos de PCR foram fragmentados pelo método de RFLP (Do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), cujos protocolos foram descritos por Drożdżik e colaboradores (2006).

As sequências dos *primers* usados para a PCR e os sítios de restrição para a RFLP utilizados neste estudo, estão presentes na Tabela 2.

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS: SEXO, IDADE E NÍVEL CLÍNICO DE INSERÇÃO (NÍVEL DE SEVERIDADE).

Variável	N	%
Sexo		
Masculino	27	69
Feminino	12	31
Idade		
30 - 35	7	18
35 - 40	8	21
40 - 45	8	21
45 - 50	8	21
50 - 55	8	21
Nível clínico de inserção (Nível da doença)		
1 a 2mm (Leve)	30	77
3 a 4mm (Moderada)	8	21
\geq 5mm (Severa)	1	3

TABELA 2. SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E O SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DO SNP RS1143634 USADO NO ESTUDO SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA A DPC, USANDO COMO MARCADOR O GENE *IL1B*.

<i>IL1B</i>	Sequência (5' → 3')	Fragmentos
<i>Primers</i> rs1143634	5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3'	194pb
	5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3'	
RFLP	Alelo 1 TCGA	97, 85, 12 pb
	Alelo 2 TCGA	182, 12 pb

Protocolos de Amplificação da PCR e de RFLP

As reações de PCR foram realizadas, seguindo as condições: tampão de PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8,8], 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl₂, 0,1% Triton X-100); 1 mM MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 2,0 U de Taq DNA polimerase e 2M de primers.

As condições de termociclagem da PCR foram de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C (368, 15K) por 5 minutos (300 segundos), 35 ciclos de desnaturação a 94°C (367, 15K) por

30 segundos, anelamento a 55°C (328, 15K) por 30 segundos, extensão a 72°C (345, 15K) por 30 segundos, uma extensão final de 72°C (345, 15K) por 5 minutos (300 segundos).

Os produtos de PCR foram avaliados submetendo-se o *amplicom* a separação em campo elétrico constante de 10V/cm em um gel de agarose a 1,5% em Tri-Acido-Bórico-EDTA (TBE). A visualização do DNA foi possível mediante a coloração do gel em solução de brometo de etídio a 5µg/mL (0,005kg/

m³). As imagens foram capturadas com a utilização do sistema de vídeo-documentação-VDS[®] (Amersham Bioscience, EUA). Os produtos da PCR foram submetidos a reação de RFLP, digeridos com TaqI[®] (Invitrogen, EUA) a 65°C (338,15K) por 1 hora (3600 segundos). Os produtos resultantes de 12pb + 85pb + 97pb (alelo 1) e 12pb + 182pb (alelo 2) foram separados por eletroforese em gel de poliácridamida a 8%, corados com nitrato de prata.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (Nº de protocolo: 201210267001140). As pessoas que concordaram voluntariamente em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As frequências foram obtidas por meio de contagem direta, posteriormente, os dados foram avaliados através do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e do teste de Risco Relativo utilizando o software BioEstat 5.3[®].

RESULTADOS

Neste estudo, todos os amplicons apresentaram-se de acordo com o tamanho esperado. A Figura 1 mostra o conjunto de 12 indivíduos participantes do estudo, e os

resultados da PCR.

Durante este estudo, 39 amostras foram amplificadas por PCR, em duplicatas. Após a PCR, as amostras foram submetidas à reação de RFLP, para a identificação do polimorfismo rs1143634 (C/T) do gene *IL1B* (IL-1β). Os produtos resultantes desta reação, 12pb + 85pb + 97pb (Alelo 1 corresponde à C selvagem) e 12pb + 182pb (Alelo 2 corresponde à T mutante) podem ser observados conforme a Figura 2.

Após a reação de RFLP, as 39 amostras apresentaram fragmentos conforme o esperado para ambos os alelos, porém, com a exceção do fragmento de 12pb, o qual não pode ser observado devido ao estabelecimento de uma otimização mínima para genotipagem, que por sua vez permitiu o reconhecimento dos alelos, de forma legítima, sem a necessidade de obter todos os fragmentos de restrição, uma vez que os fragmentos de 97pb e 85pb do alelo 1 e o fragmento de 182 do alelo 2 já eram suficientes para a distinção entre as formas alternativas do gene *IL1B*.

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1143634 (C/T) da interleucina 1β estão descritas na Tabela 3, estando consistentes com a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A Tabela 4 apresenta a distribuição alélica e

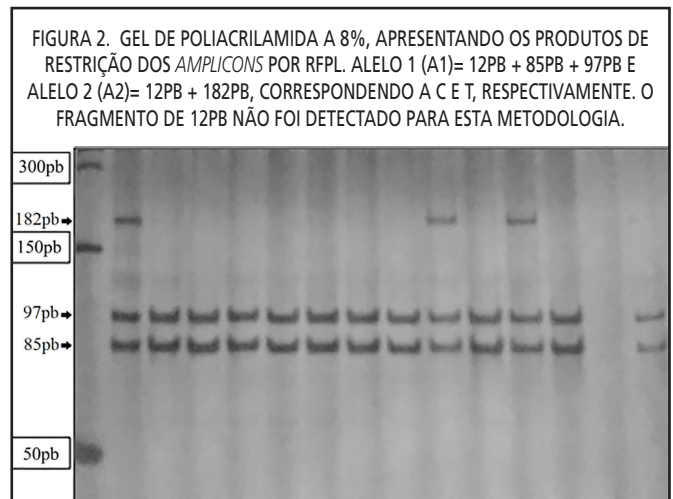
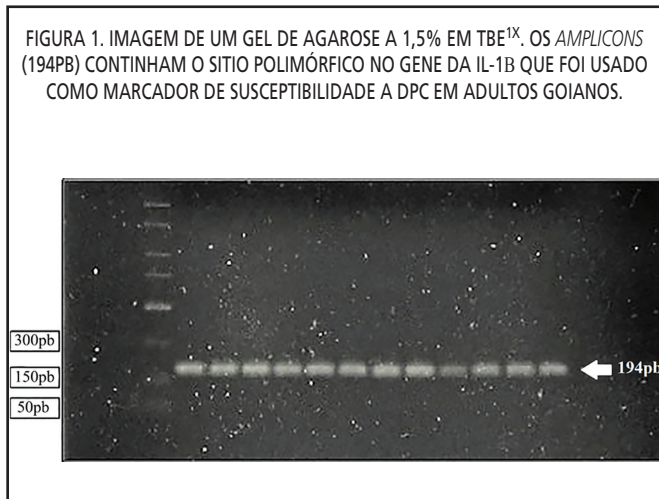


TABELA 3. FREQUÊNCIA ALÉLICA, GENOTÍPICA E VALOR DE *p* OBTIDO ATRAVÉS DO TESTE QUI-QUADRADO (χ²) EMPREGADO NA ANÁLISE DE HWE.

Fr. Alélica		Fr. Genotípica			HWE
C	T	CC	CT	TT	<i>p</i>
60/78 (77%)	18/78 (23%)	22/39 (56%)	16/39 (41%)	1/39 (3%)	0,33

Legenda: HWE – equilíbrio de Hardy-Weinberg, *p* – valor de *p*

TABELA 4. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA ALÉLICA SEGUNDO O TESTE DE RISCO RELATIVO.

Alelos	Eventos	Total	RR	IC	RAR	<i>p</i>
T	18	78	0,30	0,20-0,46	53,84%	<0,0001
C	60					

Legenda: RR – risco relativo, IC – intervalo de confiança, RAR – redução absoluta do risco, *p* – valor de *p*

a análise do *Risco Relativo* (RR).

A análise de RR demonstrou diferenças significativas ($p < 0,0001$), apresentando uma redução absoluta do risco (RAR) 53,84% referente a presença do alelo C na região polimórfica para ao SNP rs1443634, ou seja, indivíduos portadores do alelo 1 (C) apresentam um fator de proteção para desenvolvimento da DPC, sugerindo uma possível susceptibilidade a DPC para as pessoas que possuem o alelo 2 (T) em seu genótipo.

DISCUSSÃO

Por se tratar de uma doença multifatorial e complexa a associação de um marcador genético de susceptibilidade a DPC contribui para os indivíduos em função dos alelos polimórficos. Segundo Morsani e colaboradores (2011), indivíduos homocigotos para o alelo T produzem quatro vezes mais IL-1 β em suas células fagocitárias, sendo duas vezes mais em heterocigotos (CT) em relação aos indivíduos homocigotos para o alelo C. Deste modo, o polimorfismo rs1443634 pode estar relacionado com a progressão e severidade da DPC.

Os estudos de Archana e colaboradores (2012) demonstraram que o alelo 2 (T) da IL-1 β (rs1143634) está relacionado com os níveis de agressividade sendo estatisticamente significativos entre os genótipos avaliados na população no Sul da Índia em 60 Indivíduos com DPC. Em outros países, estudos populacionais demonstraram que a prevalência do polimorfismo rs1443634 em relação à susceptibilidade a DPC apresenta ampla variação nas populações, sendo menos frequente, por exemplo, a incidência deste SNP na população chinesa do que na população europeia (Armitage *et al.*, 2000; Hodge *et al.*, 2001).

Entre outros estudos, não foi possível demonstrar a associação entre os polimorfismos alélicos da IL-1 β e o desenvolvimento da DPC, sobretudo para periodontite apical. Alguns destes estudos foram conduzidos em pacientes brasileiros (Moreira *et al.*, 2005; Sakellari *et al.*, 2006; Trevalatto *et al.*, 2011). No entanto, o estudo de Morsani e colaboradores (2011) relatou diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos polimorfismos genéticos da IL-1 β entre os pacientes com periodontite apical crônica (70,6%) e os controles com periápice saudável (24,6%) para a população estadunidense avaliada.

Assim, como observado no presente estudo, outras pesquisas têm corroborado com resultados que atribuem o envolvimento do alelo 2 (T) para o polimorfismo rs1443634, encontrando diferenças significativas na distribuição alélica e genotípica, em populações brasileiras e estrangeiras (Galbraith

et al., 1999; Moreira *et al.*, 2005; Lavu *et al.*, 2015).

Alguns pesquisadores têm atribuído as discrepâncias nos resultados ao perfil étnico das populações, uma vez que a ausência de sobreposição dos dados é observada entre muitos dos trabalhos publicados. Acredita-se que tais discordâncias sejam oriundas da miscigenação exclusiva de cada população, uma vez que são pertencentes a áreas geográficas distintas (Greenstein & Hart, 2002; Godinho *et al.*, 2008; Ebadian *et al.*, 2013). Deste modo, considera-se que um ou mais elementos atuem individualmente como fator de risco em cada população, de modo a elucidar a distribuição desigual da DPC e embora a IL-1 β tenha um papel relevante na patogenia, compreende-se que fatores ambientais e sociais, hábitos de vidas e a ausência de atendimento odontológico especializado, colaborem para o aumento da suscetibilidade individual e severidade da doença. É importante ainda ressaltar que há uma variedade de genes que podem estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da DPC, estando alguns no cluster do gene da IL-1 β e também que a doença pode ser uma patogenia poligênica (Trevalatto *et al.*, 2011).

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo indica o alelo T (rs1443634) como possível fator de risco para DPC, uma vez que a constatação da redução do risco relativo foi atribuída à presença do alelo C. Acredita-se que outros genes, assim como, diferentes polimorfismos, estejam envolvidos na patogênese da DPC, devido à existência de diversos mediadores atuando nos processos inflamatórios.

Agradecimentos

Aos Professores, funcionários e alunos do laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás, pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa e por disponibilizar os equipamentos e o espaço para o desenvolvimento deste estudo; ao coordenador do projeto, Prof. Renato Hannum, M.Sc., pela iniciativa desta pesquisa e demais contribuições; Aos pacientes que participaram deste estudo; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG, pelo fomento desta pesquisa.

ABSTRACT

The current work aimed to determine the allelic frequency regarding the SNP rs1443634 in the *IL1B* gene of individuals with chronic periodontal disease (CPD) and the potential to predict the relative risk for the condition. Thus, 39 patients,

with a mean age of 43.26, diagnosed with CPD were clinically distributed according the level of disease in low level (77%), moderate (21%), and severe (3%). In order to genotype the SNP, PCR and RFLP methodologies were used. Allele C in rs1143634 was related to an absolute relative risk reduction of 53.8%, showing statistically significant difference ($p < 0.0001$). On the other hand, the presence of T in rs1143634 can be considered a risk factor for CPD. Additional to the results

from the current study, the participation of other factors, since reduction obtained was slightly above 50%, suggested to involvement others elements including and life style (oral hygiene, smoking, and alcoholism) and the genetic risk when considering the roll of *IL1B* gene in the pathogenesis of CPD.

UNITERMS: Interleukin-1beta, Polymorphism, Genetic, Chronic Periodontitis


REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Varmus H. Getting ready for gene-based medicine. *N Engl J Med.* 2002 Nov 7;347(19):1526–7.
- 2- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005 Jan;39:91–117.
- 3- Price AL, Spencer CCA, Donnelly P. Progress and promise in understanding the genetic basis of common diseases. *Proc R Soc B.* 2015;1–10.
- 4- Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan 6;55(1):21–31.
- 5- Meusel DRDZ, Ramacciato JC, Motta RHL, Brito Junior RB, Florio FM. Impact of the severity of chronic periodontal disease on quality of life. *J Oral Sci.* 2015;57(2):87–94.
- 6- Pessoa L, Galvão V, Santos-Neto L. Periodontal disease as a risk factor for cardiovascular disease: Suggestion of a further link in systemic lupus erythematosus. *Med Hypotheses.* Elsevier Ltd; 2011;77(2):286–9.
- 7- Braosi APR, de Souza CM, Luczyszyn SM, Dirschnabel AJ, Claudino M, Olandoski M, et al. Analysis of IL1 gene polymorphisms and transcript levels in periodontal and chronic kidney disease. *Cytokine.* Elsevier Ltd; 2012 Oct;60(1):76–82.
- 8- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992 Apr;63(4 Suppl):322–31.
- 9- Arora N, Mishra A, Chugh S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. *J Indian Soc Periodontol.* 2014 Jan;18(1):9–13.
- 10- Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1–6.
- 11- Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009;11–26.
- 12- Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1577–84.
- 13- Burgener B, Ford AR, Situ H, Fayad MI, Hao JJ, Wenckus CS, et al. Biologic Markers for Odontogenic Periradicular Periodontitis. *J Endod.* 2010 Aug 7;36(8):1307–10.
- 14- Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38(SUPPL. 11):60–84.
- 15- Pociot F, Mølviig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992 Jun;22(6):396–402.
- 16- Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol.* 1985; 135: 2562-2568.
- 17- Al-Qawasmi RA, Hartsfield KJ, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. *J Dent Res.* 2003;82(5):356–60.
- 18- Lee Y-M, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Int Immunol.* 2010 Oct 1;22(10):805–16.
- 19- Trevilatto PC, De Souza Pardo AP, Scarel-Caminaga RM, De Brito RB, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, et al. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Arch Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2011;56(1):54–62.
- 20- Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res.* 1991 May;26(3):230–42.
- 21- Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SCT, Teixeira SRL, Braidó GV V, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Dec 8;32(12):1501–9.
- 22- Guzman S, Karima M, Wang H-Y, Dyke TE Van. Association Between Interleukin-1 Genotype and Periodontal Disease in a Diabetic Population. *J Periodontol.* 2003 Aug;74(8):1183–90.
- 23- Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):59–94.

- 24- Kinane DF, Hart TC. Genes and Gene Polymorphisms Associated With Periodontal Disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003 Nov 1;14(6):430–49.
- 25- Ojima M, Hanioka T. Destructive effects of smoking on molecular and genetic factors of periodontal disease. *Tob Induc Dis.* 2010;(Table 1):1–8.
- 26- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. Projeto SB 2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual do examinador/ Secretaria de políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Área Técnica de Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- 27- Mellati E, Arab HR, Tavakkol-Afshari J, EbadianAR, Radvar M. Analysis of -1082 IL-10 gene polymorphism in Iranian patients with generalized aggressive periodontitis. *Med Sci Monit.* 2007; 13(11): CR510–R514.
- 28- Drożdżik a, Kurzawski M, Safronow K, Banach J. Polymorphism in interleukin-1beta gene and the risk of periodontitis in a Polish population. *Adv Med Sci.* 2006;51 Suppl 1:13–7.
- 29- Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic Predisposition to Persistent Apical Periodontitis. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):455–9.
- 30- Archana P, Kumar TSS, Panishankar K, Salman Aa, Saraswathi P, Kumarasamy P. Association between interleukin-1 gene polymorphism and severity of chronic periodontitis in a south Indian population group. *J Indian Soc Periodontol.* 2012;16(2):174.
- 31- Armitage GC, Wu Y, Wang H-Y, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low Prevalence of a Periodontitis-Associated Interleukin-1 Composite Genotype in Individuals of Chinese Heritage. *J Periodontol.* 2000 Feb;71(2):164–71.
- 32- Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001;28:430–436.
- 33- Moreira PR, De Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontol Res.* 2005;40:306–11.
- 34- Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol.* 2006;33:765–70.
- 35- Siqueira JF, Rôças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC. Relationship Between Fcy Receptor and Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod.* 2009 Sep;35(9):1186–92.
- 36- Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(1996):705–9.
- 37- Lavu V, Venkatesan V, Venkata Kameswara Subrahmanya Lakka B, Venugopal P, Paul SFD, Rao SR. Polymorphic Regions in the Interleukin-1 Gene and Susceptibility to Chronic Periodontitis: A Genetic Association Study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Apr;19(4):175–81.
- 38- Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002;73(February):231–47.
- 39- Godinho NMO, Gontijo CC, Diniz MECG, Falcão-Alencar G, Dalton GC, Amorim CEG, et al. Regional patterns of genetic admixture in South America. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2008 Aug;1(1):329–30.
- 40- Ebadian AR, Radvar M, Afshari JT, Sargolzaee N, Brook A, Ganjali R, et al. Gene Polymorphisms of TNF- α and IL-1 β Are Not Associated with Generalized Aggressive Periodontitis in an Iranian Subpopulation. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2013;12(December):345–51.

Endereço para correspondência:
Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Av. Universitária, 1069 – Leste Universitário
CEP: 74605010 – Goiânia – GO – Brasil
E-mail: joao.xm@hotmail.com

Dashboard - Genetics and Molecular Research

 Copyright 2002-2020 | Genetics and Molecular Research - FUNPEC-RP | Developed by Bytebio

ANALYSIS OF THE EFFECT OF GENETIC AND NON-GENETIC FACTORS ON THE SUSCEPTIBILITY TO CHRONIC PERIODONTAL DISEASE IN A SAMPLE OF VOLUNTEERS FROM GOIÂNIA, BRAZIL.



Submission id: 18568

Select fee: Total (submission + publication)

Efeito do polimorfismo rs1143634 (+3954 C > T) e de fatores ambientais na suscetibilidade à doença periodontal crônica**Effect of rs1143634 (+3954 CT) polymorphism and environmental factors on susceptibility to chronic periodontal disease**

DOI:10.34117/bjdv6n3-047

Recebimento dos originais: 29/02/2020

Aceitação para publicação: 04/03/2020

João Antonio Xavier Manso

Biólogo e Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, Doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade pela Universidade Federal de Goiás – UFG
Instituição: Núcleo de Pesquisas Replicon – NPR, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Endereço: Rua 235, número 40, Área 4, Bloco L, PUC Goiás, Leste Universitário, Goiânia - GO. CEP: 74605 – 050
E-mail:mansojax@gmail.com

Jakeline Soares Fortes

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, Mestranda do programa de pós-graduação em Genética – MGENE da PUC Goiás
Instituição: Núcleo de Pesquisas Replicon – NPR, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Endereço: Rua 235, número 40, Área 4, Bloco L, PUC Goiás, Leste Universitário, Goiânia - GO. CEP: 74605 – 050
E-mail:jakeelines@gmail.com

Sabrina Sara Moreira

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, Mestranda do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás – UFG
Instituição: Núcleo de Pesquisas Replicon – NPR, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Endereço: Rua 235, número 40, Área 4, Bloco L, PUC Goiás, Leste Universitário, Goiânia - GO. CEP: 74605 – 050
E-mail:sabrina.sara.ssm@gmail.com

Renato Hannum

Graduação em Odontologia pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, especialização em Periodontia pela Associação Brasileira de Odontologia – ABO e Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás
Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas
Endereço: Rua 235, 15 - Setor Leste Universitário, Goiânia - GO, 74605-050
E-mail:hannumm@hotmail.com

Calebe Bertolino Marins de Campos

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás, Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás – UFG. Doutorando em Biologia Molecular e Genética pela UFG

Instituição: Núcleo de Pesquisas Replicon – NPR, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Endereço: Rua 235, número 40, Área 4, Bloco L, PUC Goiás, Leste Universitário, Goiânia - GO. CEP: 74605 – 050
E-mail:calebe.campos26@gmail.com

Alex Silva da Cruz

Bacharel em Zootecnia pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Mestre e Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás - UFG.

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás,
Escola de Ciências Agrárias e Biológicas
Endereço: Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia - GO, 74605-010
E-mail:a.silva.cruz@hotmail.com

Lysa Bernardes Minasi

Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica e Mestrado em Genética, ambos pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás. Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás - UFG.

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás,
Escola de Ciências Agrárias e Biológicas
Endereço: Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia - GO, 74605-010
E-mail:minasilb@gmail.com

Cláudio Carlos da Silva

Graduado em Ciências Biológicas - Mod. Médica pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás. Mestre em Biologia e Doutor em Biologia Celular e Molecular, ambos pela Universidade Federal de Goiás - UFG.

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás,
Escola de Ciências Agrárias e Biológicas
Endereço: Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia - GO, 74605-010
E-mail:dasilva.genetica@gmail.com

Aparecido Divino da Cruz

Graduado em Ciências Biológicas Modalidade Médica pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás, mestre e doutor em Biologia Molecular pela University of Victoria, Columbia Britânica, Canadá

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Goiás,
Escola de Ciências Agrárias e Biológicas
Endereço: Av. Engler, s/n - Jardim Mariliza, Goiânia - GO, 74605-010
E-mail:acruz@pucgoias.edu.br

RESUMO

As doenças periodontais compreendem a um grupo de patologias orais infecciosas, inflamatórias e comuns: incluindo gengivite e periodontite, sendo altamente prevalentes na população humana. No caso da periodontite, caracteriza-se pela a perda progressiva de inserção conjuntiva, ocasionando-se o detrimento do elemento dentário. Dentre os diversos fatores envolvidos, destaca-se a atividade de agentes patológicos primários gram-negativos que desencadeiam os processos inflamatórios mediante a resposta imunológica do hospedeiro por meio da liberação de citocinas como a IL-1 β , a qual participa da imunidade inata. Contudo, tem se discutido a interferência de fatores genéticos, uma vez que muitas citocinas possuem genes polimórficos, o que levanta a hipótese de que a variabilidade genética estaria relacionada com a suscetibilidade para o desenvolvimento da periodontite, atuando em conjunto com os fatores ambientais. O objetivo deste estudo foi investigar a relação do polimorfismo genético rs1143634 (*IL1B*), além de diferentes fatores ambientais na suscetibilidade à doença periodontal crônica. No presente estudo, foram avaliados 94 indivíduos, destes, 35 apresentavam a condição e 59 eram saudáveis. O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR-RFLP para amplificação da região de interesse e tratamento posterior com a enzima de restrição específica, permitindo a obtenção dos fragmentos de restrição (genotipagem). Os genótipos se demonstraram em concordância com a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram detectadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos considerando os genótipos e a frequência de consultas odontológicas, constatando-se o aumento do risco e predição para ambas as variáveis. Os resultados reforçam a participação de fatores genéticos e ambientais na suscetibilidade à doença periodontal crônica.

Palavras-Chave: Interleucina-1beta; Variação Genética; Doenças crônicas; Tecido Periapical.

ABSTRACT

Periodontal diseases comprise a group of infectious, inflammatory and common oral pathologies: including gingivitis and periodontitis, being highly prevalent in the human population. In the case of periodontitis, it is characterized by the progressive loss of conjunctive insertion, causing the detriment of the dental element. Among the various factors involved, the activity of gram-negative primary pathological agents that trigger inflammatory processes through the host's immune response through the release of cytokines such as IL-1 β , which participates in innate immunity, stands out. However, the interference of genetic factors has been discussed, since many cytokines have polymorphic genes, which raises the hypothesis that genetic variability would be related to susceptibility to the development of periodontitis, acting in conjunction with environmental factors. The aim of this study was to investigate the relationship of rs1143634 (*IL1B*) genetic polymorphism, in addition to different environmental factors in susceptibility to chronic periodontal disease. In the present study, 94 individuals were evaluated, of these, 35 had the condition and 59 were healthy. The extracted DNA was submitted to the PCR-RFLP technique for amplification of the region of interest and subsequent treatment with the specific restriction enzyme, allowing the obtaining of the restriction fragments (genotyping). The genotypes were shown to be in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium hypothesis. Significant differences ($p \leq 0.05$) were detected between the groups considering the genotypes and the frequency of dental consultations, with

an increase in risk and prediction for both variables. The results reinforce the participation of genetic and environmental factors in the susceptibility to chronic periodontal disease.

Keywords: Interleukin-1beta; Genetic Variation; Chronic Disease; Periapical Tissue.

1 INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, os grupos de pesquisadores em genética e genômica voltaram suas atenções para o entendimento dos mecanismos de doenças comuns, uma vez que as mesmas possuem uma ampla inserção na área da saúde (BECKER et al., 2011; ARNAR; PALSSON, 2017).

As doenças periodontais caracterizam-se como um grupo de enfermidades inflamatórias comuns que inclui a gengivite e a periodontite, acometendo até 90% da população humana. Apresenta origem multifatorial, embora a infecção por microrganismos seja a causa primária mediante o acúmulo da placa bacteriana na região do sulco gengival, acompanhada da resposta imunológica do hospedeiro. Em indivíduos suscetíveis, esta situação poderá progredir para condição inflamatória crônica destrutiva (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; KINANE; HART, 2003; PIHLSTROM et al., 2005; HUGOSON; NORDERYD, 2008; PRESHAW et al., 2012; OFFENBACHER et al., 2016).

A doença periodontal crônica (DPC) é uma das condições mais comuns que acometem o periodonto, a qual ocorre em distribuição desigual com incidência somente em alguns indivíduos e em sítios específicos, os quais passam por destruição tecidual avançada (LINDHE et al., 2005; MEUSEL et al., 2015). Durante a patogênese, verifica-se a presença do biofilme, devido ao comparecimento de bactérias e a consequente produção de lipopolissacarídeos (LPS) que induzem as células a produzirem citocinas como a interleucina 1 (IL-1), a qual desencadeia respostas inflamatórias ativadoras de pré-clastos que promovem o acionamento de osteoclastos, os quais farão a reabsorção do tecido ósseo, ocasionando a perda do elemento dentário (ROSKAMP et al., 2006; TREVILATTO et al., 2011; AMEJEIRA et al., 2017).

Estudos têm mencionado a alta sensibilidade dos ossos a IL-1 que, por sua vez, participa tanto na formação quanto na reabsorção desses tecidos e também atua como fator de ativação de osteoclasto, integrando etapas distintas do desenvolvimento desta célula, *in vitro* e *in vivo*. A formação do osteoclasto é mediada pela IL-1, a qual estimula a síntese de prostaglandinas E2 (PGE2) em osteoblasto de modo que aumenta a expressão do receptor ativador do fator nuclear *kappa*-B ligante (RANKL), o qual poderá causar a maturação do

osteoclasto e a reabsorção óssea subsequente (NUKAGA et al., 2004; PARK; YIM, 2007; LEE et al., 2010).

Segundo Roskamp e colaboradores (2006), a interleucina 1 *beta* (IL-1 β) é a citocina mais operante envolvida no processo de reabsorção óssea, mediando os sinais de reabsorção para os osteoclastos e segundo os estudos de Nukaga e colaboradores (2004), estimulando a expressão de RANKL (COSTA et al., 2018).

O papel da IL-1 na patogênese da DPC tem sido apresentado como preponderante, caracterizando-a como indutor mais potente da reabsorção óssea. Reporta-se o aumento dos níveis de IL-1 β no fluido crevicular gengival e no periodonto de pacientes com DPC, presumindo-se que a variação nos níveis de citocinas poderia contribuir na suscetibilidade à doença. Estas diferenças podem ser parcialmente originadas, por alelos de genes de citocinas, visto que existem vários polimorfismos genéticos dos genes do *cluster* da IL-1 (POCIOT et al., 1992; KORNMAN et al., 1997; GORE et al., 1998; GALBRAITH et al., 1999; MOREIRA et al., 2005; JING; ZHANG, 2015).

Variantes genéticas na sequência de bases nucleotídicas ocorrem em uma frequência maior que 1% nas populações. Os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNPs) consistem na variação de uma única base nitrogenada ou nucleotídeo em um sítio particular (TAYLOR et al., 2004; CONSORTIUM, 2012; MA; GAO, 2018). Os SNPs podem causar alterações no código genético, o qual consiste na relação da sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a proteína correspondente, e deste modo, a modificação do genótipo pode interferir no fenótipo, quando se tem transformações na função proteica. Essas alterações podem ter influência no nível de secreção de substâncias, gerando variações na resposta imunológica frente a uma contaminação bacteriana (KORNMAN; DI GIOVINE, 1998; HE et al., 2014).

De acordo com Xu e colaboradores (2013), o alelo T do polimorfismo rs1143634 (+3954 C > T) está relacionado com várias doenças inflamatórias, de modo que promove o aumento de secreção da IL-1 β , presumindo que o mesmo também possa estar envolvido na DPC. Em vista disso, considera-se o rs1143634 como um parâmetro em potencial para a análise da suscetibilidade genética à DPC.

2 OBJETIVO

Investigar a relação do SNP rs1143634 (+3954 C > T) do gene *IL1B* (IL-1 β), além de aspectos ambientais na suscetibilidade à doença periodontal crônica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 GRUPO AMOSTRAL

O presente estudo consisti em uma análise de caso-controle, a qual optou-se por uma amostragem não probabilística composta por 94 amostras de conveniência de voluntários, distribuindo-se em 35 para o grupo caso (DPC) e 59 para grupo controle (saudáveis), os quais foram procedentes dos municípios da região metropolitana de Goiânia, Goiás, Brasil. Aspectos como a menoridade (menos de 18 anos) e tabagismo foram considerados como critérios de exclusão para os grupos. Os indivíduos dos dois grupos foram submetidos a exame clínico denominado periograma, realizado por um profissional capacitado, utilizando a sonda periodontal milimetrada, seguindo o índice periodontal comunitário (IPC) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), sendo cada dente dos sextantes avaliado, mas priorizando os locais de maior profundidade para diagnosticar e classificar os níveis de gravidade da doença.

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

As amostras biológicas foram obtidas mediante a coleta de 4 mL de sangue periférico por punção venosa, sendo armazenadas em tubos com EDTA (Etilenodiaminotetracético). O DNA genômico foi extraído e purificado a partir de 300µL de sangue total, utilizando o *kit* comercial *illustra blood® mini colun* (GE Healthcare, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação ocorreu através da análise em espectrofotometria de luz por meio do uso do quantificador *NanoVue Plus® Spectrophotometer* (GE Healthcare, EUA), conforme as orientações do fabricante.

3.3 REAÇÃO DE PCR-RFLP

O rastreamento do polimorfismo *rs1143634* (+3954 C > T) do gene *IL1B*, foi realizado mediante a técnica de PCR-RFLP, também conhecida como sequência clivada polimórfica amplificada (RASMUSSEN, 2012), a qual foi adaptada da metodologia de Moreira et al. (2005). O método também recebeu a inclusão dos *primers* descritos por Gore e colaboradores (1998) para amplificação de um fragmento de 194pb na fita reversa de DNA (3'→5').

Para a reação de PCR (*polymerase chain reaction*), foram adicionados 5µL do DNA extraído em uma mistura contendo: 5µL de tampão de PCR 10X, 1µL de um *Mix* de d'NTPs a 10mM (cada), 1µL de cada *primer* a 10 µM (cada), 0,4µL de *Taq DNA Polimerase Platinum®* (Invitrogen, EUA) 5U/µL, completando volume até 50µL com H₂O Mili-Q

autoclavada. A termociclagem ocorreu em seguida mediante o aparelho *Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, EUA) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 53°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg; por fim um ciclo referente à extensão final a 72°C por 5 min. Logo após, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose e corados com brometo de etídio (0,05%) para análise em vídeo documentador.

Posteriormente, alíquotas de 2,5µL dos produtos de PCR foram submetidas à técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) com 5U de *Taq I* (cada) (*Invitrogen*, EUA) a 65°C por uma hora, sendo os produtos separados em gel de poliacrilamida (8%) e corados com nitrato de prata (0,1%), com o propósito de originar os fragmentos 97, 85, 12 e 12 (pb), referindo-se aos alelos C e T respectivamente para o SNP *rs1443634*.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados mediante ao uso do programa *Microsoft Office Excel 2016*. A análise estatística dos dados ocorreu, empregando-se inicialmente o teste de *Equilíbrio de Hard Weinberg*, o qual avaliou o equilíbrio dos genótipos e a frequência dos alelos para os grupos estudados. Os testes Qui-Quadrado (χ^2) e Exato de Fisher foram empregados para a análise inferencial das variáveis entre os grupos. As análises de Odds Ratio (OR) e Regressão Logística Binária (RLB) foram empregadas conforme a necessidade, utilizadas para inferir o risco e a predição das variáveis, respectivamente. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$ (5% de significância). Os testes estatísticos utilizados fazem parte do sistema computacional *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows 10 e do software *BioEstat v.5.3®*.

4 RESULTADOS

Dentre as 94 amostras estudadas, 57% foram provenientes de indivíduos do sexo feminino e 43% do sexo masculino, a tabela 1 expõe a frequência dos sexos entre os grupos, mais a média e o desvio padrão da idade dos voluntários.

Tabela 1. Frequência entre os sexos nos grupos controle e caso, além da média e desvio padrão para ambos.

Grupo	Sexo		Total (%)	Idade Média ± DP
	Feminino (%)	Masculino (%)		
Controle	62,7	37,3	100,0	24,6 ± 7,9
Caso	48,6	51,4	100,0	25,6 ± 8,4

DP: desvio padrão.
 Fonte: O Autor (2020).

Os genótipos dos grupos caso e controle demonstraram-se consistentes com a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Durante a análise inferencial, o alelo de menor frequência, segundo os bancos de dados de SNPs, foi admitido como possível fator de risco, de modo que os genótipos CT e TT foram agrupados e confrontados com CC. A distribuição dos genótipos mostrou-se estatisticamente distinta ($p \leq 0,05$) entre os grupos, verificando-se uma frequência maior dos genótipos CT e TT em indivíduos doentes, embora não se tenha detectado diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para as frequências alélicas.

A distribuição das frequências das demais variáveis apresentaram-se, em sua maioria, uniformes ($p > 0,05$), detectando-se diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), somente, quando considerado as consultas odontológicas, de modo que o grupo controle apresentou uma frequência maior. A distribuição das frequências genotípicas e demais variáveis encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição das frequências das variáveis estudadas e valores de p obtidos mediante os testes χ^2 e Exato de Fisher.

Variável		Controle	Caso	P
Genótipo	CC	42 (71,2%)	17 (48,6%)	0,05
	CT/TT	17 (28,8%)	18 (51,4%)	
	Total	59 (100,0%)	35 (100,0%)	
Alelos	C	97 (82,2%)	51 (72,9%)	0,13
	T	21 (17,8%)	19 (27,1%)	
	Total	118 (100,0%)	70 (100,0%)	
Consultas Odontológicas	1x por ano	24 (72,7%)	4 (30,8%)	0,03
	> 1x por ano	6 (18,2%)	2 (15,4%)	
	< 1x por ano	3 (9,1%)	7 (53,8%)	
	Total	33 (100,0%)	13 (100,0%)	
Uso do Fio dental	Nunca	3 (9,4%)	1 (9,1%)	0,96
	< 1x por dia	7 (21,9%)	2 (18,2%)	
	≥ 1x por dia	22 (68,8%)	8 (72,7%)	
	Total	32 (100,0%)	11 (100,0%)	
Escovação	1x por dia	1 (3,2%)	2 (16,7%)	0,08
	< 1x por dia	30 (96,8%)	10 (83,3%)	
	Total	31 (100,0)	12 (100,0%)	
Consumo de Álcool	Não	33 (55,9%)	21 (60,0%)	0,83
	Sim	26 (44,1%)	14 (40,0%)	
	Total	59 (100,0%)	35 (100,0%)	

p : probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso.

Fonte: O Autor (2020).

A estimativa OR detectou um aumento significativo do risco de 1,6 (2,6; IC: 1,1 ± 6,2) vezes para o alelo T, o qual foi observado em maior frequência em indivíduos doentes. Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas em relação a frequência de consultas odontológicas, evidenciando-se o aumento do risco 2,6 (3,6) vezes e um intervalo

de confiança de $1,5 \pm 8,5$. Todavia não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas quando se inferiu as frequências das outras variáveis observadas, no presente estudo.

Adicionalmente, a análise de RLB detectou uma predição significativa ($p \leq 0,05$) da doença por efeito dos genótipos contendo o alelo T, obtendo-se um coeficiente de regressão de 0,96. De modo semelhante, a frequência de consultas odontológicas também apresentou dados significativos ($p \leq 0,05$) verificando-se um coeficiente de regressão de 1,29. Os dados completos da análise de RLB encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da análise de Regressão Logística Binária, incluindo o cálculo de risco (OR).

Variável	B	P	Exp(B)	IC (95%)
rs1143634	0,96	0,03	2,6	1,1 \pm 6,2
Consulta Odontológica	1,29	<0,01	3,6	1,1 \pm 8,5

B: Coeficiente de Regressão (predição); *p*: probabilidade das diferenças (ou efeito) observadas entre os grupos serem devido ao acaso; Exp (B): valor Odds ratio (chance de risco); IC: Intervalo de Confiança.

Fonte: O Autor (2020).

5 DISCUSSÃO

Durante o final da década de 90, pesquisas com finalidade investigativa acerca das doenças periodontais em associação com fatores de riscos genéticos do sistema imune inato ganharam uma maior notoriedade (KORNMAN et al., 1997; GORE et al., 1998; GALBRAITH et al., 1999). Contudo, isso ocorreu de modo a considerar os fatores ambientais em conjunto com os elementos genéticos, supondo que a suscetibilidade pode ser influenciada por uma quantidade determinada de ambos os elementos (MICHALOWICZ, 1994).

Foi avaliado no presente estudo, a associação do polimorfismo do gene funcional da IL-1 β , o rs1143634 (+3954 C > T), com a DPC, além também das variáveis sociodemográficas, que caracterizam-se como um parâmetro ambiental de análise na casuística da doença. Os dados obtidos evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, quanto à distribuição dos genótipos e a frequência de visitas ao consultório odontológico. Para ambas as variáveis, observou-se valores significativos para o

aumento do risco, quando comparada as distribuições entre os grupos (caso e controle), além da predição significativa para a doença.

O presente estudo reforça a participação da IL-1 β na suscetibilidade a DPC por meio da associação do alelo T do rs1143634 com a condição, constatando-se o aumento do risco de 2,6 vezes e uma predição de 96%. Conjectura-se que as variantes genéticas interfiram na regulação gênica, conforme relatado por Pociot et al. (1992), promovendo o aumento dos níveis da IL-1 β , que colabora para o quadro crônico autodestrutivo mediante a indução de atividades proteolíticas nos tecidos de sustentação dos dentes (NASCIMENTO et al., 2006).

Os genótipos contendo o alelo T apresentaram uma frequência de 37% (35/94) na distribuição geral, mostrando-se mais prevalentes no grupo composto por indivíduos doentes. Frequência aproximada ao estudo de Moreira e colaboradores (2005), que quantificou uma porcentagem de 33% (18/54) de genótipos CT e TT, o qual obteve-se diferenças significativas na distribuição, além de uma maior prevalência no grupo caso, indicando o alelo T como fator de risco. No estudo de Trevilatto e colaboradores (2011), os genótipos contendo o alelo T foram quantificados em 31% (35/113) da amostragem, mas não houve diferenças significativas na distribuição.

Em se tratando de pesquisas mais recentes, o estudo de Lavu e colaboradores (2015) reportou diferenças significativas na distribuição dos genótipos em uma população indiana, a qual foi observada uma frequência de 55% (220/400) de CT e TT, além de uma maior prevalência no grupo composto por indivíduos doentes. Em um outro estudo, realizado na Polônia, Mazurek-Mochol e colaboradores (2019) reportou uma frequência de 44% (158/356) dos genótipos GA e AA (corresponde a CT e TT na fita reversa), não detectando-se diferenças significativas.

Mediante ao que foi relatado por este e outros estudos, percebe-se que ainda existem dissonâncias que se contrapõem. Segundo Ebadian et al. (2013), isso pode ser atribuído a variedade (tipos) de doenças periodontais existentes; aos tamanhos de amostras desiguais; e as variações de frequência de genótipos em populações de diferentes origens, considerando que pesquisas realizadas pelo mundo têm verificado uma prevalência variável do alelo T. Acredita-se que os fatores de risco atuem de modo isolado em cada população (TREVILATTO et al, 2011) esclarecendo-se a distribuição desigual dos genótipos entre os estudos realizados, embora estes considerem, de modo geral, o mesmo fenótipo (DPC).

A participação dos elementos ambientais também se mostrou relevante no presente estudo. Relata-se que o atendimento (consulta) odontológico esteve associado a DPC, devido

a detecção do aumento do risco 3,6 vezes e uma predição de 129% para a doença. Constatções que são coesas com levantamentos realizados por outras pesquisas que, de modo geral, destacam a necessidade da assistência odontológica entre outras, em se tratando de condições patológicas orais (KATSOULIS e tal., 2012; OGAWA et al., 2013).

Deste modo, ressalta-se a participação não menos importante dos fatores ambientais no desfecho da DPC, visto que aspectos como classes sociais, higiene oral inadequada e a carência de atendimento odontológico especializado potencialmente contribuem para o aumento da suscetibilidade individual e severidade da doença (TREVILATTO et al., 2011), embora o presente estudo não relate significância para a maioria das variáveis ambientais testadas.

Acredita-se que o alelo T (rs1143634), assim como a baixa regularidade nos cuidados odontológicos especializados, estejam envolvidos com a causa e progressão da doença, consistindo, ambos, em fatores de risco. Contudo, a análise de outras variantes genéticas aspirantes, além outras variáveis ambientais, como cooperadoras da doença, são imprescindíveis, uma vez que múltiplos fatores encontram-se envolvidos, inclusive a poligenia (Trevilatto et al., 2011; ISAZA-GUZMÁN et al. 2016). Ressalta-se que a compreensão do potencial de envolvimento dos fatores genéticos na DPC ainda se demonstra como relevante, uma vez que podem contribuir no desenvolvimento de diagnósticos de maior eficiência (HANNUM et al., 2015).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os genótipos contendo o alelo T do polimorfismo rs1143634 (+3954 C > T) e a baixa frequência de acompanhamento odontológico especializado relacionam-se com a suscetibilidade para à DPC, visto que o aumento do risco e predição foram constatados para a condição. Ressalta-se que outros genes com diferentes polimorfismos podem estar envolvidos na patogênese da doença periodontal crônica, uma vez que existem diversos mediadores atuando nos processos inflamatórios. A necessidade de mais estudos na identificação de polimorfismos de genes da resposta do hospedeiro, assim como análise de expressão dos mesmos e da influência das condições ambientais, podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade genética e ambiental à DPC.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da PUC-Goiás, por disponibilizar os equipamentos e o espaço para o desenvolvimento deste estudo. Aos alunos, estagiários, professores e técnicos, por suas contribuições durante as etapas de desenvolvimento. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

AMEIJEIRA, P. et al. Periodontal disease as a potential factor of migraine chronification. *Medical Hypotheses*, v. 102, p. 94–98, 2017.

ARNAR, D. O.; PALSSON, R. Genetics of common complex diseases: a view from Iceland. *European Journal of Internal Medicine*, v. 41, p. 3–9, 2017.

BECKER, F. et al. Genetic testing and common disorders in a public health framework: how to assess relevance and possibilities. Background Document to the ESHG recommendations on genetic testing and common disorders. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 19 Suppl 1, p. S6-44, abr. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. Projeto SB 2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual do examinador/ Secretaria de políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Área Técnica de Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

CONSORTIUM, T. 1000 G. P. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, v. 135, n. V, p. 0–9, 2012.

COSTA, L. C. et al. Chronic Periodontitis and RANKL/OPG Ratio in Peri-Implant Mucosae Inflammation. *Brazilian dental journal*, v. 29, n. 1, p. 14–22, 2018.

EBADIAN, A. R. et al. Gene polymorphisms of TNF- α and IL-1 β are not associated with generalized aggressive periodontitis in an Iranian subpopulation. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, v. 12, n. 4, p. 345–51, 28 ago. 2013.

GALBRAITH, G. M. et al. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 26, n. 1996, p. 705–709, 1999.

GORE, E. A. et al. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 25, n. 10, p. 781–785, out. 1998.

HANNUM, R. et al. Lack of association between IL-10 -1082G / A polymorphism and chronic periodontal disease in adults. *Genetics and Molecular Research and Molecular Research*, v. 14, n. 4, p. 17828–17833, 2015.

HE, F. et al. Interleukin-6 receptor rs7529229 T/C polymorphism is associated with left main coronary artery disease phenotype in a Chinese population. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 4, p. 5623–5633, 2014.

HUGOSON, A.; NORDERYD, O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *Journal of clinical periodontology*, v. 35, n. 8 Suppl, p. 338–45, set. 2008.

ISAZA-GUZMÁN, D. M. et al. Determination of NLRP3 (rs4612666) and IL-1B (rs1143634) genetic polymorphisms in periodontally diseased and healthy subjects. *Archives of Oral Biology*, v. 65, p. 44–51, 2016.

JING, C.; ZHANG, J.-Q. Association between interleukin gene polymorphisms and risk of recurrent oral ulceration. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 6838–6843, 2015.

KATSOULIS, J. et al. Oral and general health status in patients treated in a dental consultation clinic of a geriatric ward in Bern, Switzerland. *Gerodontology*, v. 29, n. 2, p. 602–610, 2012.

KINANE, D. F.; HART, T. C. Genes and Gene Polymorphisms Associated With Periodontal Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 14, n. 6, p. 430–449, 1 nov. 2003.

KORNMAN, K. S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 24, n. 1, p. 72–77, jan. 1997.

KORNMAN, K. S.; DI GIOVINE, F. S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, v. 3, n. 1, p. 327–338, 1998.

LEE, Y.-M. et al. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International Immunology*, v. 22, n. 10, p. 805–816, 1 out. 2010.

LINDHE J, et al. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MA, Q.; GAO, Z. A simple and ultrasensitive fluorescence assay for single-nucleotide polymorphism. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 410, n. 13, p. 3093–3100, maio 2018.

MAZUREK-MOCHOL, M. et al. IL-1 β rs1143634 and rs16944 polymorphisms in patients with periodontal disease. *Archives of Oral Biology*, v. 98, n. October 2018, p. 47–51, 2019.

MICHALOWICZ, B. S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 65, n. 5 Suppl, p. 479–88, maio 1994.

MOREIRA, P. R. et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*, v. 40, p. 306–311, 2005.

NASCIMENTO, G. J. F. DO et al. Mecanismo, Classificação e Etiologia das Reabsorções Radiculares. *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, v. 47, n. 3, p. 17–22, 21 fev. 2006.

NUKAGA, J. et al. Regulatory Effects of Interleukin-1 β and Prostaglandin E 2 on Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand. *Journal of Periodontology*, n. February, p. 249–259, 2004.

OFFENBACHER, S. et al. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Human molecular genetics*, v. 25, n. 10, p. 2113–2129, 2016.

OGAWA, K. et al. A retrospective analysis of periodontitis during bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 6, p. 1020–1024, 2013.

PARK, H.; YIM, M. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses PGE2-induced osteoclast formation by lowering osteoclast progenitor cell viability. *Archives of pharmacal research*, v. 30, n. 4, p. 486–492, 2007.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. *Lancet*, v. 366, n. 9499, p. 1809–20, 19 nov. 2005.

POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *European journal of clinical investigation*, v. 22, n. 6, p. 396–402, jun. 1992.

PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, v. 55, n. 1, p. 21–31, 6 jan. 2012.

RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. [s.l: s.n.]. p. 315–334. 2012.

ROSKAMP, L.; VAZ, R.; LIMA, J. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. *Rev. bras. alerg. imunopatol*, p. 250–255, 2006.

TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; DONALDSON, P. T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000*, v. 35, p. 158–82, jan. 2004.

TREVILATTO, P. C. et al. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Archives of oral biology*, v. 56, n. 1, p. 54–62, jan. 2011.

XU, J. et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 2013.