



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Renata Botelho Antunes Pacheco

**Associação do polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a periodontite crônica
severa**

Rio de Janeiro

2008

Renata Botelho Antunes Pacheco

Associação do polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a periodontite crônica severa

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Coorientadora: Prof.^a Dra. Jacyara Maria Brito Macedo

Rio de Janeiro

2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

P116 Pacheco, Renata Botelho Antunes.
Associação do polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a periodontite crônica severa / Renata Botelho Antunes. – 2008.
48 f.

Orientadores: Ricardo Guimarães Fischer, Jacyara Maria Brito Macedo

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

1. Periodontite crônica. 2. Polimorfismo genético. 3. Interleucina-1.
I. Fischer, Ricardo Guimarães. II. Macedo, Jacyara Maria Brito. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV.
Título.

CDU
616.314

Bibliotecária: Adriana Caamaño CRB7/5235

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renata Botelho Antunes Pacheco

Associação do polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a periodontite crônica severa

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2008.

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Guimaraes Fischer
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof.^a Dra. Jacyara Maria Brito Macedo
Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof.^a Dra. Marilisa Lugon Ferreira Terezan
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof.^a Dra. Denise Gomes da Silva
Universidade UNIGRANRIO

Rio de Janeiro

2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: Fabrício, meu marido, Luiz e Enyr, meus pais pelo amor e dedicação incondicionais.

Aos meus filhos amados, Davi e Mel, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Àqueles que foram especiais e essenciais à conclusão deste estudo.

Ao meu marido Fabrício, que é peça fundamental em minhas conquistas, obrigada pelo amor e companheirismo.

Ao meu filho Davi, luz da minha vida.

À minha filha muito amada Mel.

Aos meus pais Luiz e Enyr, por toda uma vida de dedicação, amor, incentivos.

À minha tia Edenir, presente em todos os momentos importantes da minha vida.

À minha grande amiga e irmã Magali pela sua paciência, dedicação e amor.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fisher e Prof.^a Dra. Jacyara Maria Brito Macedo pela amizade, incentivo e por dividirem comigo seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo, por sua amizade e exemplo de profissionalismo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO-UERJ).

Aos amigos da turma de mestrado, Bernardo Campos, Fabiana Cervo, Rafaela Andrade, Raquel Florêncio e Susyane Antunes.

Às meninas do laboratório: Amanda, Lia, Adriana, Michele, Paula, Priscila, o meu muito obrigado.

Aos pacientes que colaboraram neste estudo tornando possível sua realização.

Aos meus queridos amigos, pela força e compreensão.

Muito Obrigada!

Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons, porém há os que lutam toda a vida: estes são os imprescindíveis.

Bertold Brecht

RESUMO

PACHECO, Renata Botelho Antunes. *Associação do polimorfismo do gene IL-1B (+3954) e a periodontite crônica severa*. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação do polimorfismo do gene de IL-1B (+3954) na periodontite crônica severa em comparação com pacientes saudáveis. Como estudo associado, foram avaliadas as frequências genótípicas e alélicas do gene IL-1B com relação à alteração (C > T) (alelo C > alelo T) na população geral com história de doença periodontal não diagnosticada. Participaram 186 pacientes do Estado do Rio de Janeiro, 50 com periodontite crônica severa (PC) ($51,16 \pm 5,37$), 35 periodontalmente saudáveis (grupo controle (C)) ($43,97 \pm 9,60$) e 101 da população geral (PG) ($51,06 \pm 15,52$). Os ácidos dextrorribonucleicos (DNAs) correspondentes ao grupo PG faziam parte de um banco de amostras já existentes. Neste grupo, que se encontra em equilíbrio, a prevalência do genótipo CT (genótipo heterozigoto polimórfico) foi de 53% e a frequência do alelo C foi de 0,59, não tendo sido observada qualquer diferença nos subgrupos de brancos e não brancos. Os DNAs dos integrantes do grupo PC e controle foram obtidos através da coleta de células epiteliais bucais raspadas da parte interna da bochecha com *swab*. A região contendo o polimorfismo de interesse foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando um par de oligonucleotídeos específico para flanquear o *locus* +3954 de IL-1B. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima *TaqI* (enzima de restrição), e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A frequência do alelo T no grupo de periodontite crônica severa foi significativamente maior do que no grupo controle. As frequências do alelo T nos subgrupos de periodontite crônica severa separados de acordo com a cor da pele e o hábito de fumar foram significativamente maiores nos brancos e nos tabagistas quando comparadas com os valores obtidos no grupo controle. Nossos dados sugerem que o alelo T³⁹⁵⁴ de IL-1B pode ser considerado um indicador de risco para ocorrência de periodontite crônica, particularmente em brancos e tabagistas, nessa amostra de indivíduos do Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Polimorfismo. Interleucina-1. Periodontite.

ABSTRACT

PACHECO, Renata Botelho Antunes. *Interaction of IL1B (+3954) gene and chronic periodontitis severe*. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The aim of this study was to evaluate the importance of the IL-1B (+3954) polymorphism for severe chronic periodontitis in comparison with healthy patients. Genotypic and allelic frequencies related to this polymorphism were also evaluated in a general population with unknown periodontal status. Of a total of 186 selected patients from Rio de Janeiro State, 50 had severe chronic periodontitis (PC) ($51,16 \pm 5,37$), 35 were controls (C) ($43,97 \pm 9,60$) e 101 were from the general population (PG) ($51,06 \pm 15,52$). DNA samples of the GP group belong to a DNA collection previously constructed In such group, which is equilibrium, the prevalence of the CT genotype was 53% and the allele frequency was 0,59. No difference was observed between whites and non-whites. DNA samples from patients belonging to CP and C groups were obtained after collecting buccal epithelial cells from the inner portion from the cheek with a *swab*. The region containing the polymorphism of interest was amplified by the PCR technique (polymerase chain reaction) using a pair of specific flanking oligonucleotides of the *locus* +3954 of IL-1B gene. PCR products were digested by *TaqI* enzyme and analyzed by 8% polyacrylamide gel and electrophoresis. The T allele frequency in severe chronic periodontitis group was significantly higher as compared to the control group. T allele frequencies in CP subgroups divided by skin color and smoking habit were significantly higher in whites and smokers as compared to the control group. Our results suggest that the T³⁹⁵⁴ allele of *IL-1B* may be considered a risk indicator for the occurrence of severe chronic periodontitis in this group of individuals from Rio de Janeiro State.

Keywords: Polymorphism. Interleukin-1. Periodontitis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados gerais da população estudada	26
Tabela 2 -	Parâmetros periodontais nos grupos periodontite crônica severa (n = 50) e controle (n = 35)	30
Tabela 3 -	Distribuição genotípica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a raça	32
Tabela 4 -	Frequência alélica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a raça	32
Tabela 5 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)	33
Tabela 6 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados de acordo com a raça	33
Tabela 7 -	Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados pelo hábito de fumar	34
Tabela 8 -	Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)	34
Tabela 9 -	Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados de acordo com a raça	35
Tabela 10 -	Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados pelo hábito de fumar	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Grupo controle
CC	Genótipo homozigoto não-polimórfico
CT	Genótipo heterozigoto polimórfico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN- γ	Interferon γ
IC	Intervalo de confiança
IG	Índice gengival
IL-1	Interleucina -1
IL1A	Gene da interleucina 1 ^a
IL1B	Gene da interleucina 1B
IL 1RA	Gene do receptor antagonista de IL-1
IL-1ra	Receptor antagonista da interleucina -1
IL-1 α	Interleucina -1alfa
IL-1 β	Interleucina -1beta
IL-4	Interleucina-4
IP	Índice de placa
ISS	Índice de sangramento à sondagem
NIC	Nível de inserção à sondagem
OR	<i>odds ratio</i>
PAG	Periodontite associada ao genótipo
PBS	Profundidade de bolsa à sondagem
PC	Periodontite crônica severa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PG	População geral
PUC	Pontifícia Católica do Rio de Janeiro
RFLP	Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TT	Genótipo homozigoto polimórfico

UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VNTR	Número variável de repetições <i>in tandem</i>
UNESA	Universidade Estácio de Sá

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Doença Periodontal	15
1.2	Família Interleucina -1 (IL-1)	16
1.3	Polimorfismos genéticos das IL-1	17
1.4	Polimorfismo genético IL-1B (+3954) e sua importância para a periodontite crônica	18
2	PROPOSIÇÃO	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Seleção da amostra	24
3.2	Considerações éticas	24
3.3	Questionário, exame clínico e radiográfico	24
3.4	Coleta de células epiteliais e extração de DNA genômico	26
3.5	Análise do polimorfismo (+3954) do gene IL-1B	27
3.5.1	<u>Amplificação da região do gene de IL-1B contendo o polimorfismo +3954 (C>T) por reação em cadeia da polimerase (Reação em cadeia da polimerase PCR)</u>	27
3.5.2	<u>Confirmação da amplificação da região contendo o polimorfismo IL-1B (+3954)</u>	28
3.5.3	<u>Análise do polimorfismo (+3954) do gene IL-1B por Taq I RFLP (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição)</u>	28
3.6	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Caracterização do grupo de estudo	30
4.2	Distribuições genotípica e alélica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a cor da pele	30
4.3	Distribuições genotípica e alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)	33
5	DISCUSSÃO	36

CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – Termo de Consentimento assinado pelo paciente	45
APÊNDICE B – Questionário utilizado para coletar dados referentes ao paciente	47
ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)	48

INTRODUÇÃO

A doença periodontal tem sido descrita como uma doença de natureza multifatorial, resultado de uma interação complexa entre microrganismos patogênicos e a defesa do hospedeiro, e seu desenvolvimento pode ser modificado por fatores locais, sistêmicos, ambientais e genéticos (HART; KORMAN, 1997).

De acordo com estudos de prevalência, a periodontite crônica é o tipo de doença periodontal que ocorre com maior frequência, atingindo cerca de 30% da população adulta. Existem várias formas da periodontite crônica, que pode ser classificada de acordo com a extensão e severidade dos sítios afetados (FLEMMIG, 1999), sendo que as formas avançadas são encontradas em 15 a 20% da população (PAPAPANOU; WENNESTION; GRÖNDAHL, 1989).

Quanto maior o número de fatores de risco presentes, maior é a probabilidade de o paciente desenvolver uma doença periodontal mais severa. Dentre os diversos fatores de risco, o fumo se destaca por aumentar a frequência e a severidade da periodontite, diminuir a cicatrização pós-cirúrgica e, em geral, diminuir as defesas do hospedeiro por todo o corpo (BERGSTROM; PREBER, 1994). Fatores como higiene bucal deficiente, diabetes mellitus (SALVI *et al.*, 1997) e estresse social (MONTEIRO DA SILVA *et al.*, 1998) também têm influência negativa sobre a cavidade bucal do paciente.

Os fatores genéticos parecem não modificar a suscetibilidade à doença periodontal, sugerindo que quanto maior a suscetibilidade genética de um paciente maior o risco de desenvolver uma doença mais severa. De fato, estudos em gêmeos (MICHALOWICZ *et al.*, 1991a) evidenciaram a predisposição genética a doenças periodontais, indicando que o risco de periodontite crônica tem um componente hereditário importante. No entanto, a gengivite é uma resposta geral e comum e provavelmente não está associada a genes específicos.

Polimorfismos genéticos dos genes de IL-1, que influenciam sua produção por monócitos, foram associados à severidade da periodontite crônica (GORE *et al.*, 1998; KORNMAN *et al.*, 1997). Esta correlação é biologicamente plausível devido ao papel central da IL-1 no metabolismo do colágeno, na destruição óssea e em outros processos inflamatórios (NAKAYA *et al.*, 1997; STASHENKO *et al.*, 1991a; TATAKIS, 1993). A partir deste estudo os polimorfismos genéticos da IL-1 têm sido amplamente pesquisados em portadores de periodontite (DIEHL *et al.*, 1999; LAINE *et al.*, 2001; SOCRANSKY *et al.*, 2000).

A família de IL-1 tem sido mapeada no cromossomo humano 2 e é composta pelos genes IL-1A (gene da interleucina 1A), IL-1B (gene da interleucina 1B) e IL-1RN (gene do receptor antagonista de IL-1). Inúmeras variações genéticas caracterizam esta família e a composição genotípica associada às periodontites mais severas compreendem os polimorfismos IL-1B (+3954) e IL-1A (-889) (KORMAN *et al.*, 1997). No Chile (LÓPEZ; JARA; VELENZUELA, 2005) e na Alemanha (WAGNER *et al.*, 2007), observou-se que indivíduos com o genótipo positivo da IL-1 (+3954) têm um risco significativamente maior de desenvolver esse tipo de periodontite. Entretanto, estudos realizados na China (ARMITAGE *et al.*, 2000), na Grécia (SAKELLARI *et al.*, 2003), na Tailândia (ANUSAKSATHIEN *et al.*, 2003) e no Brasil (TREVILATTO *et al.*, 2003) não evidenciaram qualquer associação entre a composição genotípica e a suscetibilidade ou o grau de severidade para a periodontite crônica.

Além dos resultados contraditórios descritos na literatura em relação à possível associação entre polimorfismos genéticos da IL-1 e a predisposição e severidade da doença periodontal, tem sido observado que populações distintas apresentam diferenças nas frequências das variantes polimórficas de diversos genes. É importante destacar também que os estudos nesta área envolvendo a população brasileira são ainda em número muito pequeno.

Dessa forma, nosso objetivo foi analisar as distribuições alélica e genotípica da IL-1B (+3954) em pacientes residentes no Estado do Rio de Janeiro, visando estabelecer possíveis associações entre esse polimorfismo genético e o desenvolvimento da periodontite crônica severa.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença Periodontal

As doenças periodontais têm como agente etiológico primário a placa bacteriana que libera toxinas (tais como lipopolissacarídeos), nos tecidos gengivais. Desta forma, inicia-se uma série de processos que modificam a atividade das células dos tecidos periodontais e alertam o sistema imunológico sobre um desafio infeccioso que está em progresso. Diversas substâncias imunológicas e inflamatórias do hospedeiro são produzidas e liberadas em resposta a tal desafio com intenção de proteger contra a infecção e eventualmente promover o processo de cicatrização. Entretanto, a resposta excessiva do sistema imunológico a estes fatores tóxicos, pode resultar na destruição dos tecidos periodontais. O processo inflamatório quando se restringe aos tecidos marginais, é designado de gengivite, e quando evolui para uma forma destrutiva que leva a perda do aparato de sustentação dos dentes, é designado de periodontite.

De acordo com a Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999), a periodontite pode ser classificada em periodontite crônica e periodontite agressiva. Embora a periodontite crônica tenha início e continuidade através da placa bacteriana, mecanismos de defesa do hospedeiro, inerentes ao paciente, exercem um papel decisivo na patogenia e na suscetibilidade da doença. Portanto, a ação de bactérias não pode ser considerada como causa para a suscetibilidade de certos indivíduos para desenvolver periodontite em sua forma severa. De acordo com Offenbacher (1996), a ação bacteriana na doença periodontal é “necessária, mas não suficiente para causar a doença” e a doença periodontal “é uma infecção mista que causa destruição periodontal em indivíduos susceptíveis”. Esta ênfase renovada na função da resposta do hospedeiro na patogênese da doença periodontal baseia-se em uma grande variação na resposta inflamatória de um indivíduo para outro (MOLVIG *et al.*, 1988; POCIOT *et al.*, 1992), de estudos epidemiológicos em populações demonstrando que parâmetros biológicos explicam em parte a prevalência e incidência da doença. Outros fatores, como o fumo, estresse, doenças sistêmicas, fatores genéticos, e marcadores bioquímicos da inflamação contribuem significativamente em modelos de doença envolvendo multivariáveis, independentemente da contribuição microbiana (BECK *et al.*, 1990, 1992; CRHISTERSSON *et al.*, 1992). Esta ênfase também se baseia em evidências de estudos em

gêmeos (MICHALOWICZ *et al.*, 1991b) para a predisposição genética as doenças periodontais. As desordens genéticas relacionadas a polimorfismos têm recebido maior atenção, principalmente por terem capacidade de alterar localmente o processo inflamatório. Muitas pesquisas estão sendo realizadas para identificar os genes e polimorfismos associados com todas as formas de periodontite. Esses polimorfismos incluem os membros do complexo genético IL-1 (gene IL-1A, IL-1B, IL-1RN) que controla os níveis de citocina multifuncional (POCIOT *et al.*, 1992).

1.2 Família Interleucina-1 (IL-1)

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina multifuncional com papel central na regulação das respostas inflamatórias e imunológicas (ALEXANDER; DAMOULIS, 1994). Elas mantêm sua atividade biológica em concentrações muito baixas, na ordem de picomolar a femtomolar, uma vez que atuam sobre receptores de alta afinidade (TATAKIS, 1993).

A atividade biológica da IL-1 reside em duas espécies de polipeptídios, IL-1 α e IL-1 β , sintetizados na pró-forma de 33 kDa que posteriormente é clivada por enzimas específicas em proteínas maduras e ativas de aproximadamente 17 kDa (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1998; DINARELLO, 1996). As duas formas moleculares possuem 25 a 35% de homologia estrutural (TATAKIS, 1993). A interleucina -1alfa (IL-1 α) tem 159 aminoácidos, enquanto a interleucina -1beta (IL-1 β) tem 153 aminoácidos. Ambas têm propriedades pró-inflamatórias, porém a IL-1 β é mais potente que a IL-1 α (STASHENKO *et al.*, 1987). Um terceiro membro da família IL-1, denominado IL-1ra (receptor antagonista de interleucina 1), é uma proteína de 18 kDa que compete com os receptores das demais IL-1 (α e β), interferindo em suas funções (ISHIHARA *et al.*, 1993).

Os macrófagos e monócitos são os maiores produtores de IL-1, porém outras células também podem produzi-la (MATSUKI; YAMAMOTO; HARA, 1992), tais como neutrófilos, algumas células B, células T, células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, células dendríticas e células dos músculos lisos (DINARELLO, 1988; TATAKIS, 1993).

As IL-1 não parecem ser parte constituinte da célula e sim resultante de um estímulo. Sua expressão gênica e liberação ocorrem como resposta a muitos estímulos exógenos e endógenos, incluindo a presença de componentes do complemento, proteínas da matriz extracelular, colágeno, trombina, citocinas (TNF e a própria IL-1) e produtos bacterianos, em

particular o lipopolissacarídeo bacteriano que é um estímulo potente para a produção de IL-1 (SALVI *et al.*, 1997). A síntese de IL-1 é suprimida por vários fatores endógenos, tais como corticosteroides, prostaglandinas, interferon γ (IFN- γ), interleucina-4 (IL-4) (TATAKIS, 1993).

As IL-1 têm papel central nas reações pró-inflamatórias, provocando alterações nas células endoteliais, promovendo coagulação e aumentando a expressão de moléculas de adesão que medeiam a adesão de monócitos e neutrófilos para facilitar a passagem destes do interior dos vasos para a área do tecido agredido (OFFENBACKER, 1996). A IL-1 não ativa diretamente os neutrófilos, mas faz com que os fagócitos mononucleares e as células endoteliais sintetizem quimiocinas que ativam os neutrófilos (BRANDOLINI *et al.*, 1997). Dessa forma, acontece a degranulação de neutrófilos e a produção de produtos reativos de oxigênio (DINARELLO, 1988). As IL-1 também participam como potentes estimuladores do catabolismo do tecido conjuntivo, aumentando a produção de colagenases e outras proteinases (NAKAYA *et al.*, 1997).

As IL-1 α e β aumentam a expressão das moléculas de histocompatibilidade (MHC) para facilitar a apresentação dos antígenos e ativar os linfócitos T e B, com um consequente aumento da produção de anticorpos (OFFENBACKER, 1996). Na reabsorção óssea, essas citocinas atuam de forma direta, aumentando a atividade dos osteoclastos e inibindo nova formação óssea (DEWHIRST; MOLE; TSURUMACHI, 1985; STASHENKO *et al.*, 1987), e de forma indireta, aumentando a síntese de prostaglandinas que são potentes mediadores da destruição óssea (TATAKIS, 1993).

1.3 Polimorfismos genéticos das IL-1

O polimorfismo é uma variação genética, caracterizada por substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos contidos no segmento de Ácido desoxirribonucleico (DNA), que ocorre numa população com uma frequência maior que 1% (TAYLOR; PRESHAW; DONALDSON, 2004).

De acordo com Duff (1993), existem evidências que suportam a associação do polimorfismo genético e doenças humanas que envolvem a patogênese inflamatória. Com relação à doença periodontal, vários estudos têm investigado a importância dos polimorfismos genéticos de IL-1 na imunorregulação da doença periodontal (ANUSAKSATHIEN *et al.*,

2003; ARMITAGE *et al.*, 2000; DIEHL *et al.*, 1999; KORMAN *et al.*, 1997; LÓPEZ; JARA; VELENZUELA, 2005; SAKELLARI *et al.*, 2003; TREVILLATTO *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2007).

A família IL-1 apresenta pelo menos três genes que regulam a produção de IL-1: IL-1B, IL-1A, IL-1RN. Estes genes estão localizados próximos um dos outros no cromossomo 2q13. Os genes IL-1A e IL-1B codificam as proteínas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-1 β , respectivamente. O gene IL-1RN codifica uma proteína antagonista que impede a ação da IL-1 α e IL-1 β . Os polimorfismos genéticos do gene IL-1B são caracterizados pela substituição de um único nucleotídeo (Polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP)) (TAYLOR; PRESHAW; DONALDSON, 2004). O polimorfismo de IL-1B mais estudado na literatura periodontal é bialélico e está presente na região codificadora, na posição +3954, sendo caracterizado pela substituição de C (alelo 1) para T (alelo 2). Alguns estudos têm analisado também o polimorfismo presente no locus - 511 (TREVILLATO *et al.*, 2002). De uma forma geral, os polimorfismos têm sido analisados de forma isolada ou associada. A análise do genótipo de IL-1B tem sido feita comumente em associação a do genótipo de IL-1A, em particular os polimorfismos localizados nas posições -889 e +4845. O polimorfismo mais comumente estudado de IL-1RN está localizado no íntron 2 e é do tipo que apresenta número variável de repetições *in tandem* (VNTR), podendo apresentar 5 formas alélicas. Esse gene também apresenta polimorfismos do tipo SNP (TAYLOR; PRESHAW; DONALDSON, 2004).

1.4 Polimorfismo genético IL-1B (+3954) e sua importância para a periodontite crônica

Quando os monócitos são desafiados, *in vitro*, por endotoxinas (POCIOT *et al.*, 1992), os indivíduos que possuem o alelo 2 de IL-1B (+3954) produzem uma maior quantidade de IL-1 β do que pacientes sem este alelo (GALBRAITH *et al.*, 1999). Esse resultado foi comprovado posteriormente, quando se observou que os monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores do alelo 2 de IL-1B, produziam duas vezes no caso de heterozigotos (portadores de um alelo 1 e um alelo 2) ou quatro vezes, nos casos dos homozigotos para o alelo 2, mais IL-1 β em resposta à mesma agressão bacteriana, quando comparados aos indivíduos homozigotos para o alelo 1 (DI GIOVINI *et al.*, 1995).

A associação entre os fatores genéticos e o quadro clínico periodontal foi demonstrada em um estudo envolvendo uma amostra de 87 pacientes não fumantes (KORNMAN *et al.*, 1997). Nessa população o risco calculado para pacientes com genótipo positivo para IL-1B (portadores de pelo menos um alelo 2) desenvolverem destruição periodontal, avaliado pelo percentual de sítios com sangramento a sondagem, foi de 6,8, o que significa que esses pacientes têm cerca de 7 vezes mais chance de apresentarem perda de inserção do que os pacientes sem o genótipo positivo para IL-1B. Entretanto, Mark *et al.* (2000) não observaram diferença significativa em profundidade de bolsa à sondagem ou nível de inserção entre 10 pacientes com periodontite crônica e genótipo positivo e 10 pacientes com periodontite crônica e genótipo negativo, assim como não observaram também diferença na expressão de IL-1 β pelos monócitos do sangue periférico entre os dois grupos.

Associações entre determinados genes e a doença periodontal foram demonstradas somente em certas populações ou grupos étnicos o que pode refletir diferenças entre as prevalências destes genótipos de acordo com a etnia. Na China, Duan, J. Zhang e Y. Zhang (2002) investigaram a relação entre o polimorfismo do gene da IL-1 e a suscetibilidade a periodontite crônica severa. Foram selecionados 144 pacientes, dos quais 30, com periodontite crônica severa, 20 com periodontite agressiva e 94 pacientes saudáveis. Os resultados mostraram que a frequência da IL-1B (+3954) foi significativamente alta nos pacientes com periodontite crônica severa e nos pacientes com periodontite de progressão rápida quando comparada com o grupo controle (C). Da mesma forma, estudos realizados nos Estados Unidos (GALBRAITH *et al.*, 1999), na China (DUAN *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2002), no Brasil (MOREIRA *et al.*, 2005) e na Alemanha (WAGNER *et al.*, 2007) revelaram que a frequência no alelo 2 para a IL-1B (+3954) foi significativamente mais alta nos pacientes com periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle. De acordo com os resultados encontrados, os autores sugeriram que o alelo 2 referente ao polimorfismo genético IL-1B (+3954) poderia ser considerado um indicador de risco para maior suscetibilidade a periodontite crônica severa nos indivíduos destas localidades. Armitage (1999) e Armitage *et al.* (2000) seguiram a mesma linha de trabalho em um grupo de 300 chineses, e concluíram que somente 2,3% dos indivíduos tinham periodontite associada ao genótipo, ou seja, o número pequeno de indivíduos com genótipo positivo comprometeu o estabelecimento de uma relação com a suscetibilidade para a periodontite crônica.

Em pacientes caucasianos não fumantes, foi demonstrada uma frequência do alelo 2 de IL-1B (+3954) significativamente maior no grupo de pacientes com periodontite crônica severa (67%) do que no grupo de periodontite crônica moderada ou incipiente (22%) (GORE

et al., 1998). Embora nesse estudo, a periodontite crônica tenha sido correlacionada com a severidade da doença em não fumantes, não foi feita qualquer avaliação em fumantes ou ex-fumantes. No entanto, é bem estabelecido que o tabagismo é o principal fator de risco para a periodontite (KINANE; CHESTNUTT, 2000), e estudos epidemiológicos recentes (TOMAR; ASMA, 2000) têm estimado que o hábito de fumar e a presença do genótipo composto de *IL-1B* (alelo 2 de *IL-1B* +3954) e de *IL-1A* (alelo 2 de *IL-1A* +4845) (LAINE *et al.*, 2002; MCDEVITT *et al.*, 2000) representam fatores de risco para o desenvolvimento e a severidade da periodontite. Em um estudo transversal realizado na Alemanha, Meisel *et al.* (2002) confirmaram que os genótipos compostos se mostram relevantes em fumantes. Neste trabalho, os pacientes não-fumantes não apresentaram risco aumentado para doença periodontal, mesmo quando apresentavam genótipo composto positivo.

O impacto do genótipo na doença periodontal foi tema de estudo longitudinal, no qual a perda dentária foi cuidadosamente monitorada por 14 anos após tratamento (MCGUIRE; NUNN, 1999). Nesse estudo, verificou-se que o cigarro e o genótipo positivo para *IL-1B* eram fatores significativos de previsão da perda dentária nos pacientes periodontais. Os resultados demonstraram que do total de 42 pacientes, os fumantes apresentavam um risco aumentado de 2,88 vezes de perder os dentes após tratamento quando comparados com os não-fumantes ou fumantes comedidos. Os pacientes com genótipo positivo para *IL-1B* (+3954) apresentaram risco aumentado para perda de dente em 2,66 vezes. Os pacientes que fumavam muito e tinham genótipo positivo para *IL-1* apresentaram 7,7 vezes mais probabilidade de perda dental após o tratamento periodontal do que todos os outros pacientes. Foi evidenciado, que mesmo os pacientes com genótipo positivo, submetidos a tratamento convencional e com uma boa terapia periodontal de suporte tiveram sucesso quanto à preservação da maioria dos dentes.

Foram realizados inúmeros estudos associando combinações de genótipos *IL-1* com a doença periodontal. Lang *et al.* (2000) realizaram um estudo prospectivo para avaliar a relação do polimorfismo para a *IL-1* e o sangramento à sondagem. Após cirurgia periodontal, os pacientes foram submetidos à manutenção com avaliação do sangramento à sondagem e ao teste para o alelo 2 de ambos os genes de *IL-1A* na posição +4845 e *IL-1B* na posição +3954. Não foi observada qualquer relação significativa entre o sangramento à sondagem e o polimorfismo para *IL-1* na população estudada (333 indivíduos, incluindo fumantes e não-fumantes).

Para a avaliação da progressão da doença periodontal, Cullinan *et al.* (2001) estudaram 295 pacientes australianos em um período de 5 anos e revelaram uma significativa relação

entre o genótipo composto (alelo 2 da IL-1A +4845 e alelo 2 da IL-1B +3954) e o aumento da profundidade de bolsa em não fumantes com mais de 50 anos. Além disso, os fumantes com periodontite associada ao genótipo (PAG) positivos e os pacientes PAG-positivos com placa contendo *Phorphyromonas gingivalis* também tiveram profundidade de bolsa aumentada.

Apesar de nos estudos mencionados anteriormente ter sido evidenciada a contribuição do PAG para a progressão da doença periodontal e/ou a resposta ao tratamento, alguns estudos têm falhado em fornecer qualquer evidência. Na Itália, Cattabriga et al. (2001) verificaram que o PAG não estava relacionado à perda dentária após 10 anos em 60 pacientes caucasianos não fumantes com periodontite crônica. Parâmetros de progressão da doença periodontal se mostraram independentes da PAG em 33 pacientes com periodontite crônica por dois anos, embora não tenha havido estratificação dos pacientes em relação ao hábito de fumar (EHMKE et al., 1999).

Thomson et al. (2001) analisaram um grupo de 861 pacientes com periodontite crônica, e concluíram que pacientes com polimorfismo genético nos alelos 2 dos genes de IL-1A (+4845) e IL-1B (+3953) apresentavam 12 vezes mais chances de ter pelo menos um dente com 5 mm de profundidade de sondagem. Da mesma forma, López, Jara e Velenzuela (2005) determinaram a prevalência dos SNPs da IL-1 α (-889) e da IL-1 β (+3954) na população chilena e sua associação com periodontite crônica. Um estudo caso-controle de 330 indivíduos com periodontite crônica e de 101 indivíduos controle foi executado com a coleta de sangue venoso periférico para a extração do DNA. Foi encontrada uma frequência mais elevada de heterozigotos da IL-1 α (-889) em indivíduos com periodontite do que nos controles, mas a diferença não foi significativa. Os heterozigotos da IL-1 β (+3954) foram significativamente mais elevados em indivíduos com periodontite do que nos indivíduos do grupo controle. O homozigoto para o alelo 2 da IL-1 β (+3954) foi considerado um fator preditivo para a periodontite crônica. A prevalência do genótipo positivo foi significativamente mais elevada em casos de periodontite crônica (26,06%) do que no grupo controle (9,9%). Respeitando as limitações do estudo, os autores concluíram que indivíduos genótipo positivo tem um risco significativamente maior de desenvolver periodontite crônica.

Outros estudos (ANUSAKSATHIEN et al., 2003; SAKELLARI et al., 2003, 2006; TREVILATTO et al., 2003) geraram resultados conflitantes com relação à importância da PAG, não estabelecendo associação entre o polimorfismo do gene de IL-1B (+3953) e IL-1A (-889) com a periodontite crônica severa no Brasil, na Tailândia e na Grécia respectivamente.

Em uma revisão sistemática com estudos clínicos longitudinais, Huynh-ba et al. (2007) evidenciaram a associação entre o genótipo composto da IL-1, presente no alelo 2 do gene IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) e a progressão da periodontite e/ou tratamento e concluíram que há uma associação do genótipo positivo com a periodontite, contribuindo para a progressão da doença.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar associações entre o polimorfismo genético IL -1 β (+3954) e o desenvolvimento da periodontite crônica. Os objetivos específicos incluíram uma análise molecular, nos grupos de estudo, do polimorfismo +3954 (C>T) do gene IL-1B, determinação das frequências alélicas e genotípicas referentes ao polimorfismo IL-1B (+3954) nos diferentes grupos de estudo e análise dos dados moleculares e clínicos, visando avaliar a importância desses polimorfismos para a periodontite crônica severa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção da amostra

Participaram 186 indivíduos residentes no Estado do Rio de Janeiro. Para o estudo caso-controle, 50 apresentavam periodontite crônica severa (grupo PC) e 35 eram saudáveis (grupo controle C), tendo sido selecionados a partir de prontuários odontológicos da Faculdade de Odontologia do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Faculdade Estácio de Sá (UNESA) e Pontifícia Católica do Rio de Janeiro (PUC), com base na história médica e nas radiografias periapicais (conforme item 3.3). Os 101 indivíduos restantes, com história de doença periodontal desconhecida, constituíram o grupo de população geral (PG). Estes foram selecionados a partir de um banco de amostras de DNA genômico extraído de sangue periférico de pacientes atendidos no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), recrutados por não serem portadores de doenças crônicas ou degenerativas. As informações sobre os indivíduos foram obtidas a partir de entrevista na qual foram abordados diversos parâmetros epidemiológicos.

3.2 Considerações éticas

O projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), conforme carta apresentada no ANEXO. Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) antes de serem examinados.

3.3 Questionário, exame clínico e radiográfico

Apenas os indivíduos pertencentes aos grupos PC e controle foram avaliados através de anamnese, exame clínico periodontal, exames radiográficos e exames laboratoriais. No

questionário de anamnese (APÊNDICE B) constavam os seguintes dados: nome, gênero, idade, e cor de pele (branco ou não branco), tabagismo (fumante atual ou não), medicamentos em uso, dados de doenças sistêmicas e condição socioeconômica.

O exame periodontal incluiu todos os dentes, avaliando quatro faces: mesial, vestibular, distal, palatina ou lingual com o objetivo de selecionar os participantes dos grupos PC e C. Os parâmetros clínicos avaliados foram os seguintes:

- a) Índice de placa (IP), presença ou ausência de placa, expresso em percentual;
- b) Índice de sangramento à sondagem (ISS), presença ou ausência de sangramento, expresso em percentual;
- c) Medida de profundidade de bolsa à sondagem (PBS), representada pela distância da margem gengival ao fundo da bolsa;
- d) Medida do nível de inserção à sondagem (NIC), representada pela distância da junção amelocementária ao fundo da bolsa.

As medidas de PBS e NIC foram realizadas utilizando sonda periodontal do tipo Carolina do Norte (HU-FRIEDY®, EUA). Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo examinador e aproximadas para o milímetro mais próximo quando necessário.

A partir de exame radiográfico periapical completo foi realizada a medida de perda óssea com auxílio de uma régua milimetrada. As distâncias de referência foram: a) junção amelocementária até o ápice radicular, para medir o comprimento aproximado da raiz; b) distância da junção amelocementária até a crista óssea, para medir a perda óssea. Essas medições foram realizadas em todas as áreas interproximais e foi feita uma média desses valores obtidos para estabelecer a perda óssea no dente.

A partir da análise dos dados clínicos e radiográficos os participantes foram divididos em dois grupos:

- a) Grupo Periodontite Crônica Severa (PC), 50 pacientes, com idade que apresentaram no exame periodontal perda de inserção clínica $\geq 6\text{mm}$ e perda óssea radiográfica $\geq 50\%$ do comprimento da estrutura radicular (FLEMMIG, 1999) em pelo menos 5 sítios interproximais;
- b) Grupo Saudável (Controle), 35 pacientes, sem perda de inserção clínica e radiográfica em sítios interproximais $\geq 3\text{mm}$ e com pelo menos 25 dentes

na boca. Os pacientes não deveriam apresentar mais do que dois dentes ausentes com exceção de dentes extraídos de terceiros molares, com propósitos ortodônticos, como resultado de trauma extraoral ou cáries extensas.

Tabela 1 - Dados gerais da população estudada

Característica	Grupo de estudo			
	Periodontite crônica (n = 50)	Controle (n = 50)	População geral (n = 101)	
Idade (Média + DP)	51,16 ± 5,37	43,97 ± 9,60	51,06 ± 15,52	
Gênero	Masculino (n)	24	12	25
	Feminino (n)	26	23	76
Raça	Branca (n)	36	29	55
	Não branca (n)	14	06	46
Fumante atual	Sim (n)	09	24	37
	Não (n)	41	11	67
Condição socioeconômica	Baixa (n)	31	19	
	Média (n)	19	16	

Legenda: Desvio Padrão (DP).

Nota: *P<0,05 – media de idade do grupo controle em relação à periodontite crônica.

Fonte: A autora, 2008.

3.4 Coleta de células epiteliais e extração de DNA genômico

Após os exames clínicos os indivíduos foram submetidos à coleta de células epiteliais bucais raspadas da parte interna da bochecha com *swab*. A haste do *swab* foi descartada e a parte coletora acondicionada em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0).

O sedimento contendo as células epiteliais foi utilizado para a extração de DNA genômico (MAHONY *et al.*, 1993).

Os DNAs genômicos constituíram os bancos de DNAs, que foram organizados de acordo com o número dos pacientes para que se possa ter acesso aos dados clínicos e

epidemiológicos. Esses bancos de amostras de DNA genômico foram estocados a 4°C e utilizados na análise dos polimorfismos genéticos.

3.5 Análise do polimorfismo (+3954) do gene IL-1B

3.5.1 Amplificação da região do gene de IL-1B contendo o polimorfismo +3954 (C>T) por reação em cadeia da polimerase (Reação em cadeia da polimerase - PCR)

A região do DNA genômico contendo o polimorfismo de interesse foi amplificada por PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos específicos descritos por Parkhill *et al.* (2000), cujas sequências são 5' CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3' e 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3'. A mistura reacional foi constituída de tampão de PCR 1X (Biotools), 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, (WMed), 80 µM de mistura dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Amersham), 3 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools), e cerca de 200 mg de DNA genômico em um volume final de 25 µL ajustado com água deionizada estéril. Os tubos contendo a mistura reacional foram colocados em um termociclador THERMO HYBAID modelo PCR Express. A reação de amplificação consistiu nas seguintes etapas: a) pré-desnaturação (5 minutos a 95°C); b) 38 ciclos consistindo em três etapas: desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (55°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos); c) um ciclo adicional de 10 minutos a 72°C. O tamanho do produto de PCR esperado foi 250 pb, como descrito previamente (KORNMAN *et al.*, 1997). Em todos os experimentos foi feito um controle negativo, que consistiu em uma mistura reacional sem adição de DNA, para confirmação da ausência de DNA contaminante presente na solução utilizada. Também foi feito um controle positivo, utilizando uma amostra de DNA previamente analisada.

3.5.2 Confirmação da amplificação da região contendo o polimorfismo IL-1B (+3954)

Para confirmar se a região de interesse foi amplificada preparou-se o gel de poliacrilamida a 8%. A solução final de acrilamida constituiu-se de: 3,2 mL de solução de acrilamida: bis-acrilamida 30% (29:1 - Pharmacia); 2,4 mL de TBE 5X (54g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA, 0,5 M pH 8,0 – Mecrk – em 1 litro de solução), 6,3 de água destilada desmineralizada estéril, 100 µL de APS 10% (Merck) e 10 µL de TEMED (Pharmacia). Esta solução foi despejada por entre duas placas previamente montadas com espaçador, tomando o cuidado de não haver formação de bolhas e o pente foi posicionador. Após a polimerização do gel (aproximadamente 1 hora), o pente foi retirado e os pocinhos foram lavados com TBE 1X. As placas foram colocadas na cuba vertical (modelo Mini-V 8.10 da Gibco BRL), tendo o cuidado de colocar tampão TBE 1X em quantidade suficiente para cobrir os eletrodos. As amostras de DNAs a serem analisadas foram misturadas com 1 µL de tampão de amostras 10X (azul de bromofenol 0,25%, xileno citanol 0,25% - USB – e glicerol 50% - MERCK – em água destilada) e aplicadas nos poços, tomando o devido cuidado para não deformá-los com a ponteira da pipeta e nem permitir que as amostras extravasassem. A corrida eletroforetica foi realizada a 120 V, a temperatura ambiente, por 1:30-2:00 horas. Ao final da corrida, as placas foram separadas cuidadosamente e o gel transferido para um recipiente contendo brometo de etídeo (5 µg/mL). Após 3 min as bandas correspondentes ao DNA foram analisadas em transiluminador de luz UV e o gel fotografado por um sistema de registro de imagens (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System).

3.5.3 Análise do polimorfismo (+3954) do gene IL-1B por Taq I RFLP (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição)

Esta metodologia é baseada na diferença de mobilidade eletroforetica dos fragmentos gerados pela ação de enzimas de restrição. Desta forma, para análise do polimorfismo +3954 (C>T) do gene da IL-1B, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima TaqI e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (conforme descrito no item 3.3.2). O volume

final da mistura reacional de digestão foi de 12 μL , 1,2 de μL de tampão TaqI (10X -0 Fermentas), 0,3 μL de enzima de restrição TaqI (10U/ μL – Fermentas), 5,0 mL de produto de PCR, 5,5 mL de água milli Q. Os tubos contendo as amostras foram incubados a 37°C por 1:30 hora. Para cada conjunto de reações foi preparado também um controle negativo, onde foi substituído o mesmo volume da enzima por água.

Ao final da reação, os produtos de digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (conforme descrito no item 3.3.2), visando à observação do tamanho dos fragmentos gerados.

3.6 Análise estatística

Para determinar se a distribuição genotípica IL-1B, encontrada na nossa população, difere de forma significativa dos valores calculados pelo princípio de Hardy-Weinberg, utilizou-se o teste de qui-quadrado (χ^2). A população estudada está em equilíbrio quando o valor de P é maior que 0,05.

O teste de Fisher foi utilizado para analisarmos estatisticamente a diferença entre os valores das frequências alélica e genotípica nos grupos de estudo. Este teste é considerado significativo quando o valor de P é menor ou igual a 0,05. Também a *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança (IC) calculado para um nível de 95% são expressos. Quando o valor da OR é maior do que 1 e o intervalo de confiança não inclui o número 1, o teste estatístico é considerado significativo.

O teste de χ^2 foi calculado utilizando um programa disponível na página da Royal Veterinary & Agriculture University (2001), e o teste de Fisher foi realizado através do programa GraphPad Instant 3.0 (CA, USA). As análises estatísticas dos dados clínicos foram realizadas no programa SPSS for Windows, versão 11.0 (Lead Technologies, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do grupo de estudo

As características clínicas dos pacientes portadores de periodontite crônica e grupo controle estão descritas na Tabela 2. Houve uma diferença estatisticamente significativa do número de dentes presentes, IP, índice gengival (IG) do grupo PC (periodontite crônica severa) em relação ao grupo controle. A média do número de sítios com perda de inserção clínica e perda óssea no grupo PC foi alta, o que caracteriza a severidade da doença.

Tabela 2 - Parâmetros periodontais nos grupos periodontite crônica severa (n = 50) e controle (n = 35)

Características ^a	Periodontite crônica severa X (DP)	Controle X (DP)
Dentes (n)	21,6 (4,7)	28,3 (2,4)*
IP (%)	55,4 (3,4)	46 (4,4)*
IG (%)	57 (3,3)	24 (16,7)*
NIC ≥ 6 (n)	22 (11)	—
Perda óssea ≥ 50% (n)	13 (6)	—

Legenda: Desvio Padrão (DP).

Nota: ^a Parâmetros periodontais: Número de dentes presentes (n); índice de placa visível – IP (%), índice gengival (IG) (%); nível de inserção clínica (NIC) (n – número de sítios); perda óssea (n – número de sítios) - T test para amostras independentes; * estatisticamente diferente do grupo PC.

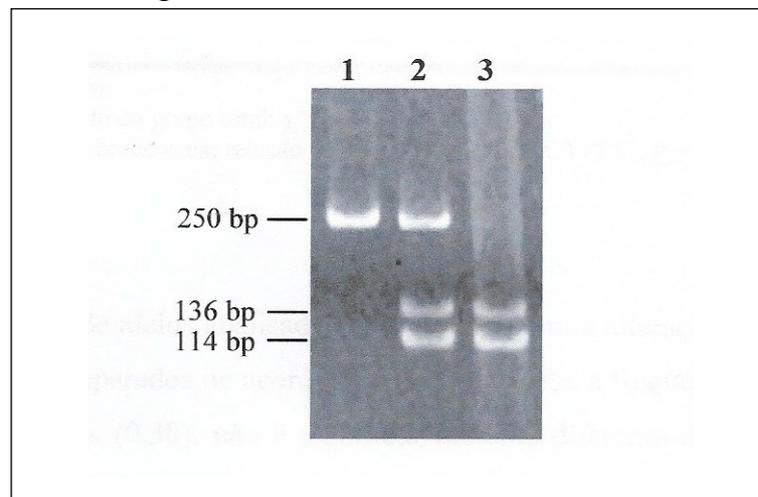
Fonte: A autora, 2008.

4.2 Distribuições genotípica e alélica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a cor da pele

Através da análise molecular do polimorfismo +3954 (C>P) do gene IL-1B pela técnica *Taq1* PCR-RFLP foi possível identificar os três possíveis genótipos (Figura, a seguir). O genótipo homozigoto não polimórfico (CC) apresenta dois alelos com sítios de

reconhecimento da enzima Taq1, apresentando um padrão eletroforetico composto por dois fragmentos de 136 e 114 bp (pista 3). Já o genótipo homocigoto polimórfico (TT) apresenta dois alelos caracterizados pela ausência do sítio de restrição da enzima Taq1, apresentando na análise eletroforetica apenas um fragmento de 250bp (pista 1). O genótipo heterocigoto (CT) apresenta os dois alelos e um padrão composto por três bandas correspondentes a 250, 136 e 114 bp (pista 2).

Figura – Perfis eletroforeticos obtidos com a análise molecular do polimorfismo +3954 (C>T) do gene IL-1B



Nota: Fotografia de um gel de poli-acrilamida 8% corado com brometo de etídeo. Análise da digestão de produtos de Reação em cadeia da polimerase (PCR) com a enzima Taq1 conforme descrito no item 3.5.3.

Pista 1. Amostra representativa do genótipo homocigoto polimórfico TT (dois alelos sem sítio de reconhecimento da enzima Taq1).

Pista 2. Amostra representativa do genótipo heterocigoto polimórfico CT (um alelo sem sítio de reconhecimento da enzima Taq1 e um com o sítio de reconhecimento).

Pista 3. Amostra representativa do genótipo homocigoto não-polimórfico CC (dois alelos com sítio de reconhecimento da enzima Taq1).

Fonte: A autora, 2008.

Na Tabela 3, encontram-se as distribuições genóticas do gene IL-1B com relação à alteração C>T (+3954) observadas no grupo de população geral, separados de acordo com a cor de pele. O teste qui-quadrado (χ^2) demonstrou que nossa população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,1897$ $P = 0,279$) com relação a essa substituição. O teste de Fisher

(CC versus CT+TT) não demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre brancos e não brancos.

Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a raça

Indivíduo de acordo com a raça	Genótipo – n*		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)
Branco (n = 55)	21 (38)	26 (47)	8 (15)
Não branco (n = 46)	12 (26)	28 (61)	6 (13)
Total (n = 101)	33 (33)	54 (53)	14 (14)

Legenda: Alelo (C>T); Genótipo homocigoto não-polimórfico (CC); Genótipo heterocigoto polimórfico (CT); Genótipo homocigoto polimórfico (TT); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: * n – nº de indivíduos.

Teste de qui-quadrado do grupo total: $\chi^2 = 1,1897$; $P = 0,279$.

Teste de Fisher (não brancos em relação a brancos; CC versus CT+TT): $P = 0,2102$; OR = 0,5714; 95% IC 0,2433 – 1,342.

Fonte: A autora, 2008.

Do total de alelos analisados, 41% apresentam a alteração C>T (Tabela 4). Quando os indivíduos são separados de acordo com a cor de pele, a frequência do alelo com alteração no grupo de brancos (0,38), não é significativamente diferente da observada no grupo de não brancos (0,41) (Fisher – $P = 0,4742$; OR = 0,8029; 95% IC 0,4568 – 1,411).

Tabela 4 - Frequência alélica do gene IL-1B com relação à alteração C>T na população geral separados de acordo com a raça

Indivíduo de acordo com a raça	Alelo – n (f) *	
	C	T
Branco	68 (0,62)	42 (0,38)
Não branco	52 (0,57)	40 (0,43)
Total	120 (0,59)	82 (0,41)

Legenda: Alelo (C); Alelo (T); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: * n – nº de alelos; f – frequência alélica.

Teste de Fisher (não brancos em relação a brancos; C versus T): $P = 0,4742$; OR = 0,8029; 95% IC 0,4568 – 1,411.

Fonte: A autora, 2008.

4.3 Distribuições genotípica e alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)

Na Tabela 5, encontram-se as distribuições genotípicas do polimorfismo IL-1B (+3954) observadas no grupo de periodontite crônica severa e grupo controle. O teste qui-quadrado (χ^2) demonstrou que o grupo controle obedece ao princípio de Hardy-Weinberg, mas o grupo PC não está em equilíbrio ($\chi^2 = 4,1180$ $P = 0,046$).

O teste de Fisher (PC em relação ao controle; CC versus CT+TT) não demonstrou uma associação estatisticamente significativa.

Tabela 5 - Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)

Grupo	Genótipo			P	Fisher ^a OR (IC)
	CC (%)	CT (%)	TT (%)		
Controle (n = 35)	24 (69)	11 (31)	0 (0)		
PC (n = 50)	25 (50)	16 (32)	9 (18)	0,1191	0,4583 (0,1856-1,132)

Legenda: Genótipo homozigoto não-polimórfico (CC); Genótipo heterozigoto polimórfico (CT); Genótipo homozigoto polimórfico (TT); Significância (P); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Teste de Fisher (PC em relação ao controle; CC versus CT + TT).

Fonte: A autora, 2008.

Não foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre as distribuições genotípicas do polimorfismo IL-1B (+3954), observadas no grupo de periodontite crônica severa e grupo controle, separados de acordo com a cor de pele (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados de acordo com a raça

Característica	Genótipo			P	Fisher ^a OR (IC)
	CC (%)	CT (%)	TT (%)		
Branca					
Controle (n = 29)	20 (69)	9 (31)	0 (0)		
PC (n = 36)	18 (50)	13 (36)	5 (14)	0,1383	0,4500 (0,1618-1,252)
Não-branca					
Controle (n = 6)	4 (67)	2 (33)	0 (5)		
PC (n = 14)	7 (50)	3 (21)	4 (29)	0,6424	0,5000 (0,068000-3,6777)

Legenda: Genótipo homozigoto não-polimórfico (CC); Genótipo heterozigoto polimórfico (CT); Genótipo homozigoto polimórfico (TT); Padrão (P); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Teste de Fisher (PC em relação ao controle; CC versus CT + TT).

Fonte: A autora, 2008.

Na Tabela 7, encontram-se as distribuições genótípicas do polimorfismo IL-1B (+3954) observadas no grupo de periodontite crônica severa e grupo controle, separados pelo hábito de fumar. Não houve uma associação estatisticamente significativa.

Tabela 7 - Distribuição genotípica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC) separados pelo hábito de fumar

Característica ^a	Genótipo			p	Fisher ^b OR (IC)
	CC (%)	CT (%)	TT (%)		
Sim					
Controle (n = 11)	7 (64)	4 (36)	0 (0)		
PC (n = 9)	3 (33)	3 (33)	3 (33)	0,3698	0,2857 (0,04481-1,822)
Não					
Controle (n =24)	17 (71)	7 (29)	0 (0)		
PC (n = 41)	22 (53)	13 (32)	6 (15)	0,1994	0,4768 (0,16300-1,395)

Legenda: Genótipo homozigoto não-polimórfico (CC); Genótipo heterozigoto polimórfico (CT); Genótipo homozigoto polimórfico (TT); (P); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Sim – foram considerados os indivíduos que fumam atualmente; Não – foram considerados os indivíduos que não fumam atualmente.

^b Teste de Fisher (PC em relação ao controle; CC versus CT + TT).

Fonte: A autora, 2008.

Foi observada uma frequência maior do alelo T no grupo de periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle (Tabela 8), que corresponde a uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8 - Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica severa (PC)

Grupo	Alelo			Fisher ^a OR (IC)
	C	T	P	
Controle (n = 70)	59	11		
PC (n = 100)	66	34	0,0083	2,763 (1,285-5,940)

Legenda: Alelo (C); Alelo (T); Significância (P); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Teste de Fisher (PC em relação a controle; T versus C).

Fonte: A autora, 2008.

Com relação à cor de pele, houve uma frequência do alelo T significativamente maior em brancos do grupo de periodontite crônica quando comparado ao grupo controle (Tabela 9), o que não foi observado no subgrupo de não brancos.

Tabela 9 - Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica (PC) separados de acordo com a raça

Característica	Alelo		p	Fisher ^a
	C	T		OR (IC)
Branca				
Controle (n = 58)	49	9		
PC (n = 72)	49	23	0,0403	2,556 (1,074-6,079)
Não-branca				
Controle (n =12)	10	2		
PC (n = 28)	17	11	0,2714	3,235 (0,59250-17,666)

Legenda: Alelo (C); Alelo (T); significância (p); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Teste de Fisher (T versus C).

Fonte: A autora, 2008.

Nos fumantes houve uma frequência do alelo T significativamente maior no grupo de periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle (Tabela 10), o que não foi observado nos indivíduos não fumantes.

Tabela 10 - Frequência alélica do polimorfismo IL-1B (+3954) nos grupos controle e periodontite crônica (PC) separados pelo hábito de fumar

Característica ^a	Alelo		p	Fisher ^b
	C	T		OR (IC)
Sim				
Controle (n = 22)	18	4		
PC (n = 18)	9	9	0,0458	4,500 (1,083-18,696)
Não				
Controle (n =48)	41	7		
PC (n = 82)	57	25	0,0571	0,2569 (1,014-6,508)

Legenda: Alelo (C); Alelo (T); Significância (P); *odds ratio* (OR); intervalo de confiança (IC).

Nota: ^a Sim – foram considerados os indivíduos que fumam atualmente; Não – foram considerados os indivíduos que não fumam atualmente.

^b Teste de Fisher (T versus C).

Fonte: A autora, 2008.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do estudo caso-controle mostraram uma frequência significativamente maior do alelo T nos pacientes com periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle. Esta frequência maior também foi encontrada nos subgrupos de brancos e fumantes portadores de periodontite crônica severa. Estudos iniciais de Kornman *et al.* (1997) e de Gore *et al.* (1998) também mostraram essa associação em pacientes não fumantes, não tendo sido feita qualquer avaliação em fumantes ou ex-fumantes. No entanto, é bem estabelecido que o tabagismo é o principal fator de risco para a periodontite (KINANE; CHESTNUTT, 2000), e estudos epidemiológicos recentes (TOMAR; ASMA, 2000) têm estimado que o hábito de fumar e a presença do genótipo composto de IL-1B (alelo 2 de IL-1B +3954) e de IL-1A (alelo 2 de IL-1A +4845) (LAINE, *et al.*, 2002; MCDEVITT *et al.*, 2000) representam fatores de risco para o desenvolvimento e a severidade da periodontite. Em um estudo transversal realizado na Alemanha, Meisel *et al.* (2002) confirmaram que os genótipos compostos se mostram relevantes em fumantes. Neste trabalho, os pacientes não-fumantes, mesmo que portadores do genótipo composto positivo não apresentaram risco aumentado para doença periodontal, o que esta de acordo com os nossos resultados.

Estudos de investigação da relação do polimorfismo do gene IL-1B e a suscetibilidade a periodontite crônica severa em populações ou grupos étnicos diferentes mostraram resultados semelhantes aos nossos. Na China (DUAN; ZHANG, J.; ZHANG, Y., 2002; ZHONG *et al.*, 2002), nos Estados Unidos (GALBRAITH *et al.*, 1999), no Brasil (MOREIRA *et al.*, 2005) e na Alemanha (WAGNER *et al.*, 2007) a frequência no alelo 2 para a IL-1B (+3954) foi significativamente mais alta nos pacientes com periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle. Os autores sugeriram que o alelo 2 referente ao polimorfismo genético IL-1B (+3954) poderia ser considerado um indicador de risco para maior suscetibilidade a periodontite crônica severa nos indivíduos destas localidades. Di Giovanni *et al.* (1995), Galbraith *et al.* (1999) e Pociot *et al.* (1992) observaram que indivíduos que possuem o alelo 2 de IL-1B (+3954) produzem uma maior quantidade de IL-1 β do que pacientes sem este alelo. Por outro lado, nos Estados Unidos, Mark *et al.* (2000) não observaram diferença significativa com relação a profundidade de bolsa à sondagem ou ao nível de inserção entre 10 pacientes com periodontite crônica e genótipo positivo e 10 pacientes com periodontite crônica e genótipo negativo, assim como não observaram também

diferença na expressão de IL-1 β pelos monócitos do sangue periférico entre os dois grupos. Na China (ARMITAGE *et al.*, 2000) e na Itália (CATTABRIGA *et al.*, 2001) não foi possível estabelecer uma associação entre a periodontite associada ao genótipo e a suscetibilidade para a periodontite crônica. Em estudos realizados no Brasil (TREVILATTO *et al.*, 2003), na Tailândia (ANUSAKSATHIEN *et al.*, 2003), na Grécia (SAKELLARI *et al.*, 2003, 2006) também não foi estabelecida associação entre o polimorfismo do gene de IL-1B (+3953) e IL-1A (-889) com a periodontite crônica severa.

Deve ser dito, entretanto, que muitos estudos sofrem a influência de populações pequenas e dos desenhos transversais e, além disso, têm utilizado critérios variados para o diagnóstico da presença da periodontite. Há dificuldades também na identificação de um grupo controle, devido à variabilidade contínua da periodontite crônica e das diferenças de idade dos indivíduos em relação ao início da doença. O tamanho da amostra é fundamental, sendo a razão principal para a ausência de reprodutibilidade nos estudos de associação tipo caso-controle (CARDON; BELL, 2001).

De uma forma geral, os polimorfismos têm sido analisados de forma isolada ou associada. Os estudos associados se mostram mais adequados quando se trata de genes de baixa penetrância, como os normalmente analisados na associação com as doenças periodontais. Particularmente, a análise do genótipo de IL-1B tem sido feita comumente em associação a do genótipo de IL-1A (polimorfismos localizados nas posições -889 e + 4845). Para a avaliação da progressão da doença periodontal, Cullinan *et al.* (2001) estudaram 295 pacientes australianos em um período de 5 anos e revelaram uma significativa relação entre o genótipo composto (alelo 2 da IL-1A +4845 e alelo 2 da IL-1B +3954) e o aumento da profundidade de bolsa em não fumantes com mais de 50 anos. Thomsom *et al.* (2001) analisaram um grupo de 861 pacientes com periodontite crônica, e concluíram que pacientes com polimorfismo genético de IL-1A (+4845) e IL-1B (+3953) apresentavam 12 vezes mais risco de ter pelo menos um dente com 5 mm de profundidade de sondagem. Apesar de nos estudos mencionados anteriormente ter sido evidenciada a contribuição do PAG para a progressão da doença periodontal e/ou a resposta ao tratamento, Lang *et al.* (2000) não forneceram qualquer evidência de associação entre o polimorfismo do gene de IL-1B (+3953) e IL-1A (+4845) com a periodontite crônica severa

Da mesma forma, López, Jara e Velenzuela (2005) determinaram a prevalência dos SNPs da IL-1A (-889) e da IL-1B (+3954) na população chilena e sua associação com periodontite crônica. Foi encontrada uma frequência mais elevada de heterozigotos da IL-1A (-889) em indivíduos com periodontite do que nos controles, mas a diferença não foi

significativa. O número de heterozigotos da IL-1B (+3954) foi significativamente mais elevado em indivíduos com periodontite (26,06%) do que em indivíduos do grupo controle (9,9%). Respeitando as limitações do estudo, os autores concluíram que indivíduos genótipo positivo tem um risco significativamente maior de desenvolver periodontite crônica. Mais recentemente, em uma revisão sistemática, foi evidenciada a associação entre o genótipo composto da IL-1, presente no alelo 2 do gene IL-1A (-889) e IL-1B (+3954) e a progressão da periodontite e/ou tratamento e concluiu-se que há uma associação do genótipo positivo com a periodontite, contribuindo para a progressão da doença (HUYNH-BA *et al.*, 2007).

O impacto do genótipo na doença periodontal foi tema de estudo longitudinal, no qual a perda dentária foi cuidadosamente monitorada por 14 anos após tratamento (MCGUIRE; NUNN, 1999). Nesse estudo, verificou-se que o cigarro e o genótipo positivo para IL-1B eram fatores significativos de previsão da perda dentária nos pacientes periodontais e que os pacientes que fumavam muito e tinham genótipo positivo para IL-1 apresentaram 7,7 vezes mais probabilidade de perda dental após o tratamento periodontal do que todos os outros pacientes. Foi evidenciado que mesmo os pacientes com genótipo positivo, submetidos a tratamento convencional e com uma boa terapia periodontal de suporte tiveram sucesso quanto à preservação da maioria dos dentes.

CONCLUSÃO

A população geral se encontra em equilíbrio com prevalência do genótipo CT (53%) e do alelo C (0,59), não tendo sido observada qualquer diferença nos subgrupos de brancos e não brancos.

O alelo T³⁹⁵⁴ de IL-1B foi mais frequente no grupo de periodontite crônica severa quando comparado ao grupo controle, particularmente em brancos e tabagistas, o que evidencia a sua importância como indicador de risco para a ocorrência de periodontite crônica severa em indivíduos do Estado do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.
- ALEXANDER, M. B.; DAMOULIS, P. D. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr. Opin. Periodontol.*, Philadelphia, p. 39-53, 1994.
- ANUSAKASATHIEN, O. *et al.* Distribution of interleukin-1 β +3954 and IL-1 α -889 genetic variations in a Thai population group. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 74, n. 12, p. 1796-1802, 2003.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, Chicago, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.
- ARMITAGE, G. C. *et al.* Low prevalence of a periodontitis associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 71, n. 2, p. 164-171, 2000.
- BECK, J. D. *et al.* Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 63, n. 2, p. 93-99, 1992.
- BECK, J. D. *et al.* Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 61, n. 812, p. 521-528, 1990.
- BERGSTROM, J.; PREBER, H. Tobacco use as a risk factor. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 65, n. 5, p. 545-550, 1994.
- BRANDOLINI, L. *et al.* Interleukin-1 β primes interleukin-8-stimulated chemotaxis and elastase release in human neutrophils via its type I receptor. *Eur. Cytokine Netw.*, Montrouge, v. 8, n. 2, p. 173-178, 1997.
- CARDON, L. R.; BELL, J. L. Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.*, London, v. 2, p. 91-99, 2001.
- CATTABRIGA, M. *et al.* Retrospective evaluation of the influence of the interleukin-1 genotype on radiographic bone levels in treated periodontal patients over ten years. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 72, n. 6, p. 767-773, 2001.
- CRHISTERSSON, L. A. *et al.* Dental plaque and calculus: risk indicators for their formation. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 71, n. 7, p. 1425-1430, 1992.
- CULLINAN, M. P. *et al.* A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphism and periodontal disease in a general adult population. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 28, n. 12, p. 1137-1144, 2001.

- DEWHIRST, F. E.; MOLE, J. E.; TSURUMACHI, T. Purification and partial sequence of human osteoclastic-activating factor: Identity with interleukin-1 β . *J. Immunol.*, Baltimore, v. 135, n. 4, p. 2562-2568, 1985.
- DIEHL, S. R. *et al.* Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J. Periodontol.*, Indianapolis, v. 70, n. 4, p. 418-430, 1999.
- DI GIOVINI, F. S. *et al.* Novel genetic association of an IL-1B gene variation a +3953 with IL-1 β protein production and psoriasis. *Cytokine*, San Diego, v. 7, p. 606, 1995.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, [s.l.], v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.
- DINARELLO, C. A. Biology of interleukin-1. *FASEB Journal*, Bethesda, v. 2, n. 2, p. 108-115, 1988.
- DUAN, H.; ZHANG, J. C.; ZHANG, Y. H. The association between IL-1 gene polymorphisms and susceptibility to severe periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, Cheng-Tu, v. 20, n. 1, p. 48-51, 2002.
- DUFF, G. W. Cytokines and Anty-cytokines. *Brit. J. Rheumatol.*, [s.l.], v. 32, p. 15-20, 1993.
- EHMKE, B. *et al.* Interleukin-1 haplotype and periodontal disease progression following therapy. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 26, n. 12, p. 810-813, 1999.
- FLEMMING, T. F. Periodontitis. *Ann. Periodontol.*, Chicago, v. 4, n. 1, p. 32-37, 1999.
- GALBRAITH, G. M. P. *et al.* Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 26, n. 11, p. 705-709, 1999.
- GORE, E. A. *et al.* Interleukin-1 β +3953 allele2: association with disease status in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 25, n. 10, p. 781-785, 1998.
- HART, T. C.; KORMANN, K. S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol. 2000*, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 202-215, 1997.
- HUYNH-BA, G. *et al.* The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 305-317, 2007.
- ISHIHARA, Y. *et al.* Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J. Periodontal Res.*, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 524-529, 1993.
- KINANE, D. F.; CHESTNUTT, I. G. Smoking and periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Boca Raton, v. 11, p. 356-365, 2000.
- KORNMAN, K. S. *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 72-77, 1997.

- LAINE, M. L. *et al.* Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens and smoking in adult periodontitis. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 80, n. 8, p. 1695-1699, 2001.
- LAINE, M. L. *et al.* Risk factors in adult periodontitis: polymorphism in the interleukin-1 gene family. *Ned. Tijdschr. Tandheelkd.*, Utrecht, v. 8, n. 8, p. 303-306, 2002.
- LANG, N. P. *et al.* Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J. Periodontal Res.*, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 102-107, 2000.
- LÓPEZ, N. J.; JARA, L.; VELENZUELA, C. Y. Association of interleukin-1 polymorphism with periodontal disease. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 76, n. 2, p. 234-243, 2005.
- MAHONY, J. B. *et al.* Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamidia trachomatis* nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 13, n. 7, p. 1753-1758, 1993.
- MARK, L. L. *et al.* Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1 beta expression in subjects with adult periodontitis. *J. Periodontal Res.*, Copenhagen, v. 35, n. 3, p. 172-177, 2000.
- 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*, Oxford, v. 76, p. 42-47, 1992
- MCDEVITT, M. J. *et al.* Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 71, n. 2, p. 156-163, 2000.
- MCGUIRE, M. K.; NUNN, M. E. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and PST genotype in accurately predicting prognosis and tooth survival. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 70, n. 1, p. 49-56, 1999.
- MEISEL, P. *et al.* Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 α , IL-1 β , and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2002.
- MICHALOWICZ, B. S. *et al.* Periodontal findings in adult twins. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 62, n. 5, p. 293-299, 1991a.
- MICHALOWICZ, B. S. *et al.* A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 70, n. 11, p. 1431-1435, 1991b.
- MOLVIG, J. *et al.* Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand. J. Immunol.*, Oslo, v. 27, n. 6, p. 705-716, 1988.
- MONTEIRO DA SILVA, A. M. *et al.* Psychosocial factors, dental plaque levels and smoking in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 25, n. 6, p. 517-523, 1998.

- MOREIRA, P. R. *et al.* A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample Brazilian individuals. *J. Periodontol Res.*, Copenhagen, v. 40, n. 4, p. 306-311, 2005.
- NAKAYA, H. *et al.* Effects of interleukin-1 β on matrix metalloproteinase-3 levels in human periodontal ligament cells. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 68, n. 6, p. 517-523, 1997.
- OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann. Periodontol.*, Chicago, v. 1, n. 1, p. 821-878, 1996.
- PAPAPANOU, P. N.; WENNESTION, J. L.; GRÖNDAHL, K. A 10 year retrospective study of periodontal disease progression. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 16, n. 7, p. 403-411, 1989.
- PARKHILL *et al.* Association of Interleukin-1 gene polymorphism with early-onset periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 27, n. 9, p. 682-689, 2000.
- POCIOT, E. *et al.* A taq 1 polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with secretions in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.*, Berlin, v. 22, n. 6, p. 396-402, 1992.
- SAKELLARI, D. *et al.* No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in Greek population. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 33, n. 11, p. 765-770, 2006.
- SAKELLARI, D. *et al.* Prevalence of IL-1A and IL-1B polymorphisms in a Greek population. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 35-41, 2003.
- SALVI, G. E. *et al.* Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol. 2000*, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 173-201, 1997.
- SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 27, n. 11, p. 810-818, 2000.
- STASHENKO, P. *et al.* Interleukin-1 β is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J. Bone Min. Res.*, [s.l.], v. 2, p. 559-565, 1987.
- STASHENKO, P. *et al.* Levels of interleukin-1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 18, n. 7, p. 548-554, 1991.
- TATAKIS, D. N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 64, n. 5, p. 416-431, 1993.
- TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; DONALDSON, P. T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol. 2000*, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 158-182, 2004.
- THOMSON, W. M. *et al.* IL-1 genotype and adult periodontitis among young New Zealanders. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 80, n. 8, p. 1700-1703, 2001.

TOMAR, S. L.; ASMA, S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Periodontol.*, Indianópolis, v. 71, n. 5, p. 743-751, 2000.

TREVILATTO, P. C. *et al.* Clinical, genetic and microbiological findings in a brazilian family with aggressive periodontites. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 29, n. 3, p. 233-239, 2002.

TREVILLATO, P. C. *et al.* Polymorphisms in the IL-1A and IL-1B genes are not associated with suscetibility to chronic periodontitis in a brazilian population. *Braz. J. Oral Sci.*, Piracicaba, v. 2, n. 7, p. 348-352, Oct./Dec. 2003.

WAGNER, J. *et al.* Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphism in chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 34, n. 10, p. 823-827, 2007.

ZHONG, L. J. *et al.* The association of interleukin-1 gene polymorphisms with the susceptibility to chronic periodontitis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, Cheng-Tu, v. 19, n. 5, p. 405-408, 2002.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento assinado pelo paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROPOSTA E SITUAÇÃO PROBLEMA

A doença periodontal é uma doença que atinge a gengiva e os tecidos de suporte dos dentes (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar) podendo levar a perda precoce dos dentes.

Embora a maioria das evidências de que as bactérias são os agentes etiológicos primários da doença periodontal, as pesquisas vêm evoluindo durante os últimos anos e atualmente acredita-se que o desenvolvimento da doença periodontal seja em grande parte determinada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Fatores de risco podem predispor o indivíduo a contrair a doença ou até mesmo desenvolvê-la de forma mais severa. Fatores genéticos têm demonstrado estar relacionado a maior suscetibilidade a doença periodontal, logo diferentes estudos nesta área estão sendo realizados e mais estudos são precisos para melhor compreender esta relação.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa para verificar se é portador desta doença. O sangue será coletado e serão analisados os fatores genéticos. Também será informado sobre possíveis problemas odontológicos importantes para sua saúde bucal e sistêmica.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

- Questionário padronizado
- Exame clínico e radiográfico completo da boca
- Punção venosa. Serão coletados aproximadamente 6 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA para extração do DNA.

LOCAL DO ESTUDO

- Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

CUSTOS PARA OS ENTREVISTADOS

- Os exames realizados, citados nos procedimentos deste contrato, serão totalmente gratuitos, e você em caso de necessidade de tratamento periodontal ou outros tratamentos odontológicos necessários poderão ser realizados nesta Faculdade mediante pagamento das taxas pré-estabelecidas pela Instituição e discutidas com a assistente social. Os tratamentos serão de acordo com a disponibilidade de vagas de cada especialidade ou clínica destinada.

BENEFÍCIOS DO ESTUDO

- A doença periodontal é considerada uma doença multifatorial que leva a destruição dos tecidos periodontais em hospedeiros apropriadamente susceptíveis e cujo desenvolvimento pode ser modificado por fatores locais, fatores sistêmicos e por fatores genéticos. Fatores de risco como diabetes e fumo já foram adequadamente estudados e associados com um maior grau de destruição periodontal. No entanto, fatores genéticos parecem estar relacionados a maior suscetibilidade à doença periodontal, como também à progressão dessa enfermidade. Estudos em populações distintas têm indicado diferenças nas frequências das variantes polimórficas, o que sugere a importância de estudos locais para melhor compreender essa relação.

CONFIDENCIABILIDADE DOS DADOS

- Está garantida a confiabilidade das informações que você fornecer. As informações serão codificadas e mantidas em local reservado, o tempo todo. Somente os pesquisadores terão acesso às informações e questionários.

TERMO DE CONCORDÂNCIA

Caso você concorde em participar deste estudo, deverá assinar este termo e também o já estabelecido pela Faculdade de Odontologia da UERJ. É importante informar que caso deseje desistir da pesquisa, poderá fazer a qualquer momento.

- Declaro ter lido e entendido os termos da pesquisa a ser realizada na FOUERJ.

Assinatura do entrevistado

Assinatura do entrevistador

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2004.

APENDICE B - Questionário utilizado para coletar dados referentes ao paciente

NOME:		
ENDEREÇO RESIDENCIAL:		
TEL.	TEL. CEL.	
ENDEREÇO COMERCIAL:		
TEL.		
PROFISSÃO:	RENDA FAMILIAR:	
ESCOLARIDADE: () 1º GRAU INCOMPLETO () 1º GRAU COMPLETO () 2º GRAU INCOMPLETO		
() 2º GRAU COMPLETO () 3º GRAU INCOMPLETO () 3º. GRAU COMPLETO () PÓS GRADUAÇÃO		
OBS.		
ESTADO CIVIL () SOLTEIRO () CASADO () DIVORCIADO () VIÚVO		
NÚMERO FILHOS:	NÚMERO IRMÃOS:	
DATA DE NASCIMENTO:	IDADE:	
NACIONALIDADE:	NATURALIDADE:	
RAÇA:		
TIPO SANGUINEO:	FATOR Rh:	
	SIM	NÃO
Tem algum problema grave de saúde?		
Está sob tratamento médico?		
Faz uso frequente de algum medicamento?		
Tem alguma alergia?		
Hipertensão?		
Já fez tratamento psiquiátrico?		
Vive alguma situação de estresse no momento?		
Você fuma?		
Consome bebidas alcoólicas?		
Consome drogas?		
Tem história familiar de câncer, diabetes, ou cardiopatias?		
Grávida?		
Problema respiratório?		
Problema cardiovascular?		
Diabetes?		
Problema endócrino?		
Problema neurológico?		
Insuficiência renal?		
Anemia?		
Artrite ou artrose?		

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)



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



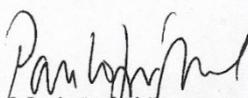
Rio de Janeiro, 08 de novembro de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Para: Aut. Magali Silveira M. Ribeiro e
Renata Botelho A. Pacheco
Orient. Prof. Ricardo Fischer

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1635-CEP/HUPE) " ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DOS GENES IL-1B, IL-1A, IL-1RN, IL-6, IL-10, IL-18 E TNF- α , EM PACIENTES COM SAÚDE PERIODONTAL, PERIODONTITE AGRESSIVA E PERIODONTITE CRÔNICA " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

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

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


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

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 - FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br