



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM GENÉTICA

**AVALIAÇÃO MOLECULAR POR ARMS-PCR DO SNP -1082 G/A DA
IL-10 NA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA EM ADULTOS**

RENATO HANNUM

GOIÂNIA - GOIÁS

2011



PUC GOIÁS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM GENÉTICA

AVALIAÇÃO MOLECULAR POR ARMS-PCR DO SNP -1082 G/A DA IL-10 NA DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA EM ADULTOS

Dissertação apresentada por Renato Hannum, ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Co-Orientadora: Dra. Daniela de Melo e Silva

GOIÂNIA - GOIÁS

2011

H246a Hannum, Renato.

Avaliação molecular por ARMS-PCR do SNP – 1082 G/A da IL-10 na doença periodontal crônica em adultos [manuscrito] / Renato Hannum. – 2011.
52 f.

Bibliografia: f. [39]-51

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2011.

Orientador: Prof. Aparecido Divino da Cruz

Co-Orientadora: Dra. Daniela de Melo e Silva


Inclui lista de siglas, figuras, tabelas


Inclui Anexos

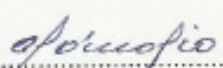
1. Periodontite. 2. SNP-1082G – polimorfismo. 3. Interleucina-10. I. Título.


CDU: 616.314.17(043)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 19 DE AGOSTO DE 2011 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA
9,0 (NOVE INTEIROS)


Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD - PUC Goiás
(presidente-orientador)


Prof.ª Dr.ª Daniela de Melo e Silva
(coorientadora)


Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás
(membro interno)


Prof.ª Dr.ª Angela Adamski da Silva Reis / UFG
(membro externo)

Dedico esta dissertação a minha amada esposa Juliana Hannum, a minha maior incentivadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante em minha vida.

Ao meu querido orientador, Aparecido Divino da Cruz, há quem muito admiro, por sua competência, incentivo e principalmente por sua confiança e apoio constante. Meu agradecimento por ter acreditado que este estudo era possível.

À Dra. Daniela de Melo e Silva, minha co-orientadora, por ter assumido parte da orientação desta dissertação e pela colaboração fundamental na conclusão deste projeto. Os meus sinceros agradecimentos!

A Fernanda Godoy, pela valiosa ajuda na coleta de dados e na análise estatística dos resultados.

Aos professores Dr. Cláudio Carlos da Silva e Dra. Ângela Adamski S. Reis, pela honra em aceitarem participar da Banca Examinadora.

Aos pacientes que voluntariamente aceitaram participar do estudo e, desta forma, contribuíram diretamente para o avanço do conhecimento na área de Periodontia.

Aos meus pais Domingos Hannum e Maria Elia F. Hannum, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e correção, que se doaram por inteiro e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu realizasse os meus.

As minhas irmãs Alessandra e Elaine, que ao fazerem parte da minha vida, ajudam a torná-la mais leve e descontraída, e, por isso, mais feliz.

Aos meus queridos irmãos Abel e Adriana, agradeço a vocês em especial por terem me proporcionado uma educação de qualidade e por me abrirem um mundo de possibilidade do qual agora posso desfrutar. Obrigado por serem exemplos de força, companheirismo e amor.

Em especial, agradeço o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ, pela concessão da bolsa de Mestrado para a realização desta pesquisa.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

- CHICO XAVIER -

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE SIGLAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1	
REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 Doença Periodontal	14
1.2 Patogênese da Doença Periodontal	17
1.3 Imunologia da Doença Periondotal	19
1.4 Susceptibilidade Genética à Doença Periodontal	23
1.5 Mecanismos Epigenéticos	23
1.6 Mecanismos Genéticos - Polimorfismo	24
2 MATERIAL E MÉTODO	27
2.1 Grupo Amostral	27
2.2 Amostras Biológicas Isolamento e Quantificação do DNA	27
2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
2.4 Análise e Documentação dos Produtos de PCR	29
2.5 Análise Estatística	30
2.6 Resultados	30
3 DISCUSSÃO	36
CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	52

RESUMO

A periodontite é considerada uma desordem inflamatória de etiologia bacteriana que resulta em danos ao tecido periodontal, devido à complexa interação entre os periodontopatógenos e o sistema de defesa do hospedeiro. Mecanismos genéticos podem modular a resposta de um indivíduo uma vez que podem interferir na expressão gênica de importantes mediadores da inflamação. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação do polimorfismo do SNP -1082G/A no promotor do gene da interleucina-10 com a doença periodontal em 36 casos e 30 controles. Foi utilizada a estratégia de ARMS-PCR para a discriminação alélica. Dos indivíduos com doença periodontal, 16 (44%) apresentaram o genótipo AG, seguidos de 13 (36%) com o genótipo GG e 7 (20%) com o genótipo AA, destacando uma maior prevalência de heterozigotos para o loco da IL-10, principalmente nos indivíduos da faixa etária de 30 a 35 anos, no grupo controle, 13 (43%) dos indivíduos apresentaram o genótipo AG, 12 (40%) apresentaram GG e apenas 5 (17%) foram classificados como AA, destacando uma maior prevalência de heterozigotos para o loco da IL-10, principalmente nos indivíduos da faixa etária de 40 a 45 anos. Os dados indicaram que as populações estudadas encontravam-se em equilíbrio, segundo o Teorema de Hardy-Weinberg. A análise das frequências dos genótipos e das frequências alélicas permitiram concluir que não encontramos relação causal entre a presença do genótipo G ou A e o desenvolvimento da doença periodontal em adultos. O SNP -1082G/A do gene da IL-10 não mostrou valor preditivo para a doença periodontal e, portanto, não podemos usa-lo com valor prognóstico.

Palavras-chaves: periodontite, SNP, -1082G/A, interleucina-10.

ABSTRACT

Periodontitis is considered an inflammatory disorder of bacterial etiology that results in damage to the periodontal tissue, due to complex interactions between periodontal pathogens and host defense system. Genetic mechanisms may modulate the response of an individual because they can interfere with gene expression of important mediators of inflammation. The objective of this study was to evaluate the association of the polymorphism of SNP-1082G / A gene promoter in interleukin-10 with periodontal disease in 36 cases and 30 controls. Strategy was used ARMS-PCR for allelic discrimination. Of individuals with periodontal disease, 16 (44%) had genotype AG, followed by 13 (36%) with genotype GG and 7 (20%) with genotype AA, highlighting a greater prevalence of heterozygotes for locus of IL-10, especially in individuals aged from 30 to 35 years in the control group, 13 (43%) of subjects had the genotype AG, 12 (40%) had GG and only 5 (17%) were classified as AA, highlighting a higher prevalence of heterozygotes for locus of IL-10, especially in individuals aged from 40 to 45 years. The data indicated that the study populations were in equilibrium according to Hardy-Weinberg Theorem. The analysis of the frequency of genotypes and allele frequencies concluded that no causal relationship found between the presence of genotype G or A and the development of periodontal disease in adults. The SNP-1082G / A IL-10 gene showed no predictive value for periodontal disease and therefore can not use it with prognostic value.

Keywords: periodontitis, SNP,-1082G / and interleukin-10.

LISTA DE SIGLAS

COEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
D.P.	- Desvio padrão
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
FCG	- Fluido crevicular gengival
H.E	- Heterozigosidade esperada
H.O	- Heterozigosidade observada
IFN- γ	- Interferon gama
IL-10	- Interleucina 10
IL-1	- Interleucina 1
IL-1	- Interleucina 4
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
IL-2	- Interleucina 2
IL-8	- Interleucina 8
IL-8	- Interleucina 12
IL-13	- Interleucina 13
LPS	- Lipopolissacarídeos
M	- Metilado
mRNA	- Ácido ribonucléico mensageiro
pb	- Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PI	- Perda de inserção
PMNL	- Leucócitos Polimorfonucleares
PS	- Profundidade de sondagem
PUC Goiás	- Pontifícia Universidade Católica de Goiás
R	- <i>Primer reverse</i>
RFLP	- <i>RestrictionFragmentLengthPolymorphism</i>
RNA	- Ácido ribonucléico
SNP	- Polimorfismo em único nucleotídeo
TGF- β	- Fator Transformador de Crescimento Tipo Beta
Th-1	- Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th-2	- Linfócitos T <i>helper</i> 2
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da severidade da doença periodontal por faixa etária	34
Figura 2. Distribuição dos graus de severidade da doença periodontal quanto ao sexo ...	35
Figura 3. Distribuição dos genótipos de IL-10, de acordo com a severidade da doença periodontal	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e as concentrações usadas na reação de ARMS-PCR para a determinação do polimorfismo -1082G/A na região do promotor do gene da IL-10 29
- Tabela 2.** Protocolo de termociclagem usado na reação de ARMS-PCR para a determinação do polimorfismo -1082G/A na região do promotor do gene da IL 10 30
- Tabela 3.** Distribuição percentual dos portadores de doença periodontal e seus controles, de acordo com o sexo e faixa etária, correspondentes ao grupo amostral no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e periodontite 32
- Tabela 4.** Distribuição dos genótipos de IL-10 dos pacientes portadores de doença periodontal e seus controles, de acordo com o sexo e faixa etária, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e periodontite 32
- Tabela 5.** Distribuição dos genótipos associados ao gene da IL-10, nos grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal 33
- Tabela 6.** Distribuição dos alelos A e G, localizados no códon da IL-10, nos grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal 33
- Tabela 7.** Heterozigosidade do locus da IL-10 em relação ao SNP -1082G/A para os grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal 33
- Tabela 8.** Análise de risco nos grupos caso e controle, quanto aos genótipos de IL-10 34

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um dos problemas de saúde bucal que mais acomete a população brasileira. A periodontite é o termo utilizado para denominar um grupo de doenças crônicas infecciosas multifatorial. A periodontite tem a sua origem associada a vários fatores complexos e ainda não bem definidos quanto a sua progressão e severidade (Kornman, 1997).

Löe e colaboradores (1965), comprovaram a importância da placa bacteriana para o início da instalação e para a progressão da doença periodontal, que caracteriza-se por ser infecciosa, desenvolvendo processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de proteção e suporte dos elementos dentários. O processo inflamatório envolve a gengiva em resposta a antígenos bacterianos específicos da placa dentária que se acumulam ao longo da margem gengival livre. Em consequência da inflamação, podem ocorrer bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar e eventual perda do elemento dental.

As doenças periodontais são infecções crônicas associadas a microorganismos anaeróbicos que resultam em aprofundamento patológico do sulco gengival por meio da migração apical do epitélio juncional e da destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. A etiologia primária se deve à presença da placa bacteriana (biofilme) que se acumula nos tecidos dentários (Souza *et al.*, 2006). A presença desses microorganismos no biofilme dental desencadeia uma série de eventos inflamatórios e imunológicos nos tecidos periodontais, capaz de levar à destruição das estruturas de suporte dental (Socransky e Haffajee, 1992).

A característica específica do biofilme, a resposta imuno inflamatória e outros fatores inerentes ao hospedeiro, tais como o tabagismo e a condição sistêmica, interferem no curso da doença periodontal. Indivíduos com características clínicas e fatores de risco semelhantes respondem de formas diferentes às terapias empregadas, o que ressalta a importância dos componentes genéticos e epigenéticos no desfecho da doença (Offenbacher *et al.*, 2008). Muitos estudos se empenharam em identificar polimorfismos genéticos em mediadores da resposta imune, como as que vêm sendo consideradas fatores potenciais de susceptibilidade em relação à doença periodontal (Tervonen *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2007; Kornman *et al.*, 1997; Offenbacher, 1996).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina antiinflamatória produzida por linfócitos T reguladores 1, células T helper 2 e macrófago. A IL-10 pode atuar sobre diferentes tipos celulares, induzindo a supressão da resposta inflamatória nos mais variados tecidos (Melefy, 1999). Além disso, a IL-10 tem sido postulada como a principal molécula responsável pelo

orquestramento de reações inflamatórias, em particular a inibição das alterações mediadas pelo TNF- α (Melefyf, 1999; Moore *et al.*, 2001). Sua ação inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias e estimula a proliferação e a diferenciação das células especializadas na defesa do organismo (Hajeer *et al.*, 1998).

Genes de citocinas são alvos de múltiplos eventos epigenéticos, como a metilação do DNA e a desacetilação de histonas. Tais eventos afetam o padrão de expressão gênica sem, no entanto, promover alterações na sequência de nucleotídeos que constituem os organismos (Feinberg, 2008). O polimorfismo da IL-10 pode modular a sua expressão, diminuindo sua ação antiinflamatória, levando à pior resposta do sistema de defesa (Claudino *et al.*, 2008). Estudos recentes sugerem que mecanismos genéticos sejam capazes de influenciar a produção de citocinas e, conseqüentemente, alterar o padrão clínico da doença inflamatória (Gomez *et al.*, 2009; Nile *et al.*, 2008; Fitzpatrick e Wilson, 2003; Adcock *et al.*, 2002).

Diante da importância dos eventos genéticos epigenéticos na regulação da expressão gênica é importante investigar associação destes eventos com a gravidade das doenças, em particular, a associação do polimorfismo da IL-10 com a doença periodontal. Devido ao grande número de estudos que relacionaram o papel das citocinas pró-inflamatórias com a patogênese e progressão da doença periodontal, tem sido sugerida a possibilidade de intervenções com a manipulação de citocinas antiinflamatórias como adjuvantes nas terapias em pacientes com a doença periodontal. Por outro lado, apesar desse potencial terapêutico, o papel de IL-10 na progressão da doença periodontal tem merecido destaque (Melefyf, 1999; Yamazaki *et al.*, 2001).

Sabe-se que na doença periodontal ainda existe alguns pontos do seu aparecimento e desenvolvimento a serem desvendados. O caráter genético da doença periodontal ainda não é muito estudado. Porém, dados publicados na literatura sugerem a existência de uma forte ligação entre a ocorrência da doença a susceptibilidade genética individual (Mellati *et al.*, 2007; Drożdżik *et al.*, 2006; Folwaczny *et al.*, 2004; Kornman, 1997). No entanto, ainda prevalece muitos questionamentos acerca desta associação e a relação entre doença periodontal e seus aspectos genéticos. Se a patologia é desenvolvida por patógenos específicos, porque pessoas do mesmo grupo de risco desenvolvem condições cuja agressividade são diferentes. Ao se investigar a relação potencial entre doença periodontal ao fator genético, os resultados poderão apontar para o desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e para a expansão da fronteira do conhecimento sobre a doença periodontal, e assim proporcionar uma melhor qualidade de vida.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doença Periodontal

A doença periodontal é uma patologia multifatorial que apresenta como agente etiológico primário o biofilme dentário. Sua progressão e severidade são determinadas por diversos fatores de risco. A periodontite é o termo utilizado para denominar um grupo de doenças crônicas infecciosas multifatoriais. A periodontite tem a sua origem associada a vários fatores complexos e ainda não bem definidos quanto a sua progressão e severidade. Løe *et al.* (1965) comprovaram a importância da placa bacteriana para o início da instalação e para a progressão da doença periodontal, que, caracteriza-se por ser infecciosa, desenvolvendo processo inflamatório destrutivo que afeta os tecidos de proteção e suporte dos elementos dentários. O processo inflamatório envolve a gengiva em resposta a antígenos bacterianos específicos da placa dentária que se acumulam ao longo da margem gengival livre. Em consequência da inflamação, podem ocorrer bolsas periodontais, recessões gengivais, reabsorção do osso alveolar e eventual perda do elemento dental (Albandar, 2002; Løe *et al.*, 1965).

A doença periodontal destrutiva atinge uma percentagem considerável de indivíduos em várias populações, sendo a forma crônica da doença. A doença periodontal é multifatorial. Portanto, a presença dos microrganismos isoladamente caracteriza fator de risco suficiente para desenvolver o problema. Fatores biológicos e ambientais associados à resposta do paciente estão diretamente ligados à susceptibilidade individual e ao aumento do risco relativo para o desenvolvimento da doença (Page e Kornman, 1997). Entretanto, a Federação Européia de Periodontia concluiu que ainda não existem dados suficientes para determinar se um fator, responsável pelo início da doença, difere de outro relacionado à sua progressão. A distinção de variáveis de risco e de progressão é desejável, pois as estratégias de prevenção delineadas para reduzir o risco de ocorrência da periodontite podem ser diferentes daquelas desenvolvidas para prevenir a sua progressão (Tonetti e Claffey, 2005). Com o avanço do conhecimento acerca da variabilidade genética entre os indivíduos e seu impacto na susceptibilidade às diversas condições de agravo à saúde humana, fatores genéticos, geralmente associados ao polimorfismo genômico têm sido largamente estudados nas diversas e distintas populações, com o objetivo de se compreender melhor o processo da doença (Moreira *et. al.*, 2007; Tonetti e Claffey, 2005).

Alguns estudos têm mostrado que a distribuição da doença periodontal não é semelhante se forem comparados países desenvolvidos e em desenvolvimento ou populações urbanas e isoladas. Dentre as variáveis associadas ao risco para a periodontite, destacam-se: uso crônico do fumo, idade, nível socioeconômico, raça, gênero, nível de instrução, frequência de atendimento odontológico, dentre outras (Hoçoya e Jardini, 2010).

Histologicamente a periodontite é caracterizada por um acúmulo de células inflamatórias na porção extra vascular do tecido conjuntivo gengival (Flemming, 1994). Numerosas espécies bacterianas têm sido isoladas da placa subgengival, sendo algumas estreitamente relacionadas ao início e progressão da doença (Socransky *et al.*, 1998). Devido à maioria das bactérias periodontopatogênicas residir nas bolsas periodontais, o sistema imune não consegue eliminar os microrganismos, a permanência bacteriana no local agrava a inflamação, favorecendo a instalação de um fenômeno crônico, caracterizada por uma resposta contínua e exacerbada do paciente (Okada e Murakami, 1998).

A disponibilidade de componentes do fluido gengival e de sangue promove o crescimento de espécies bacterianas gram-negativas no local afetado, aumentando o potencial periodontopatogênico. Dessa forma, devido à infecção microbiana não contida, a resposta imunológica do hospedeiro promoverá uma seqüência de eventos, culminando com a destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar, responsáveis pela proteção e sustentação do elemento dentário (Okada e Murakami, 1998).

Os meios pelos quais as bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação e a destruição tecidual características da periodontite tem sido uma área de interesse investigativo nos últimos anos (Salvi e Lang, 2005; Socransky *et al.*, 1998). Dois mecanismos propostos concorrem para explicar a doença periodontal em decorrência da presença bacteriana no local da lesão. No primeiro mecanismo sugere que há ação direta dos subprodutos de metabolismo e enzimas bacterianas. O segundo mecanismo propõe a ocorrência de estímulos para a liberação de mediadores inflamatórios de células hospedeiras, que promovem a autodestruição tecidual (Trevilatto *et al.*, 2003). Assim, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir duas faces da etiologia da periodontite (Salvi e Lang, 2005; Kinane e Hart, 2003 e Socransky *et al.*, 1998). A doença periodontal pode ser considerada como uma das diversas patologias nas quais a suscetibilidade individual tem um papel relativamente importante no incremento do risco de ocorrência da doença (Johnson *et al.*, 1988). Como a periodontite tem caráter multifatorial, sua ocorrência recebe influência do fumo, stress psicossocial e doenças sistêmicas como diabetes (Renzoni *et al* 2000; Michalowicz 1994). Portanto, nos grupos de

pacientes de alto risco, fatores biológicos individuais apresentam um importante papel na susceptibilidade à doença periodontal. Neste contexto, o risco pode ser avaliado e modificado na perspectiva de fatores genéticos individuais (Johnson *et al.*, 1988). Confirmando a relação de fatores genéticos na evolução da doença periodontal, um estudo em gêmeos revelou cerca de 50% de concordância em relação à periodontite (Schneider *et al.*, 2000).

Evidentes considerações sugerem que a doença periodontal agressiva consistem em uma doença genética que envolve apenas um único gene de caráter hereditário. Por outro lado, a susceptibilidade genética individual da forma mais comum da periodontite crônica reforça a sua evolução como uma doença multifatorial padrão. Estudos de associação do tipo caso controle, de análise de agregação familiar, e outros envolvendo gêmeos também têm investigado a influência genética na periodontite. Atualmente, acredita-se que fatores genéticos possam influenciar a suscetibilidade, progressão e/ou a resposta ao tratamento da doença periodontal. Essas hipóteses têm sido bastante investigadas e discutidas (Kornman, 2001; Wilson & Kalmar, 1996; Potter, 1991).

O polimorfismo genético corresponde à variação genética de uma seqüência de nucleotídeos do genoma ou na estrutura cromossômica. Para ser polimórfica, a variação deve ocorrer com uma freqüência maior que 1% na população (Strachan, 2002). Para a doença periodontal, o tipo de polimorfismo em evidência é o de base única, conhecido como Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polimorphism* - SNP), que consiste na variação da identidade de um único nucleotídeo num sítio particular do genoma, em geral associado a genes de mediadores da inflamação (Taylor *et al.*, 2000).

A presença de um polimorfismo pode implicar em mudança no código genético, que é a relação entre a seqüência de ácido desoxirribonucléico (DNA) e a seqüência da proteína correspondente, levando a alterações no genótipo (seqüência de bases), afetando ou não o fenótipo, determinado pela função protéica (Lewin, 2001). Assim, um SNP pode influenciar o nível de secreção de substâncias e variações nas respostas imunológica e inflamatória individuais frente a uma agressão bacteriana (Kornman e di Giovine, 1998).

Diferenças individuais nos níveis de interleucinas relacionados aos diferentes graus de susceptibilidade a periodontite podem ser atribuídas, entre outros fatores, a polimorfismos em seus respectivos genes. Diversos estudos têm procurado identificar marcadores genéticos, especialmente em genes de citocinas, que determinariam a predisposição individual à periodontite (Moreira *et al.*, 2005; Hodge, 2001; Gore 1998; Kornman *et al.*, 1997). As citocinas constituem um grupo diverso de pequenas proteínas e glicoproteínas que regulam as respostas imunes, inflamatórias e de reparo. A maioria das citocinas tem sido agrupada de

acordo com a função a elas atribuída em seis grupos: interleucinas, citocinas, fatores estimulantes de colônia, interferons, fatores de crescimento e quimiocinas. Algumas citocinas têm sido caracterizadas como pro-inflamatórias, como a interleucinas IL-1, IL-2 e IL-8, e anti-inflamatórias, como a IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento tipo beta (TGF- β) (Yamamoto *et al.*, 2006).

Doenças inflamatórias podem ser induzidas e perpetuadas por produção excessiva de citocinas pró inflamatórias ou possivelmente por diminuição na produção adequada de citocinas anti inflamatórias, sendo que uma falha no equilíbrio destas situações parece ocorrer na periodontite (Kinane, 2003; Van e Vaik, 1994). Foi demonstrado que pacientes com periodontite possuem maior nível de interleucinas nos tecidos gengivais do que pacientes sem periodontite. Adicionalmente, a concentração de interleucinas é maior nos sítios com doença ativa do que nos sítios inativos. Pesquisadores observaram também que a concentração gengival de IL-1 tende a diminuir com o tratamento periodontal (Gemmell e Seymour, 1994; Okada e Murakami, 1998).

Atualmente, no Brasil, têm sido estimuladas pesquisas para se definir e compreender o perfil dos marcadores genéticos dos brasileiros e a relação destes com a doença periodontal, tanto na forma crônica como na agressiva (Moreira *et al.*, 2007; Astolfi *et al.*, 2006).

1.2 Patogênese da Doença Periodontal

A periodontite é considerada uma desordem inflamatória de etiologia bacteriana que resulta em danos ao tecido periodontal, devido à complexa interação entre os periodonto patógenose o sistema de defesa do hospedeiro (Socransky e Haffajee, 1992). Os processos inflamatórios e imunológicos, apesar de agirem nos tecidos periodontais para proteger o hospedeiro contra o ataque microbiano, podem ser prejudiciais, pois danificam as células e as estruturas do tecido conjuntivo (Page e Kornman, 1997).

Fatores genéticos causam destruição periodontal indiretamente, em decorrência da ativação de vários componentes do sistema de defesa do hospedeiro (Ishikawa, 2007). O processo inflamatório é inicialmente induzido pela liberação de produtos bacterianos ecitocinas pró-inflamatórias que ativam o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMNL), principalmente os neutrófilos, para a região do sulco gengival. A liberação decitocinas pró-inflamatórias é capaz de regular a ação das moléculas de adesão das células endoteliais, estimulando os leucócitos a migrarem através dos vasos para a região do sulcogengival (Korman *et al.*, 1997).

Os PMNL, apesar de estarem aumentados na presença de doença, são também os leucócitos predominantes na gengiva clinicamente sadia, sendo considerados a primeira linha de defesa contra os patógenos periodontais. A sua resposta inflamatória, quando eficaz, pode garantir a interrupção ou a resolução do processo da doença (Dennison e Vandyke, 1997).

O aumento do infiltrado de PMNL para a região do sulco gengival, na presença de inflamação, é acompanhado por alterações vasculares, tais como dilatação dos capilares e elevação da pressão hidrostática com conseqüente aumento do exsudado de fluidos e proteínas para os tecidos. Além dos leucócitos, observa-se nessa fase a presença de linfócitos retidos no tecido conjuntivo quando em contato com antígenos. Para garantir espaço suficiente para esse intenso infiltrado inflamatório, observa-se também a destruição do colágeno e a degeneração de fibroblastos no tecido gengival (Kornman *et al.*, 1997). Segundo Page e Schroeder (1976), características histológicas acima descritas, permitem classificar a lesão gengival como inicial e precoce, correspondendo clinicamente à gengivite.

A evolução das características histopatológicas de lesão inicial para lesão estabelecida e avançada marca a progressão da gengivite para a periodontite. A lesão estabelecida caracteriza-se pelo predomínio de plasmócitos e intensificação da perda de colágeno. O epitélio sulcular e o juncional tornam-se permeáveis à penetração dos patógenos e seus produtos. Na lesão avançada ocorre a migração do epitélio juncional, com conseqüente aumento da profundidade do sulco, caracterizando a presença da bolsa periodontal, o que favorece a migração do biofilme em direção apical. Há também perda do osso alveolar, dano extenso às fibras do ligamento periodontal, danos inflamatórios e imunopatológicos. A lesão não está mais restrita ao tecido gengival e o infiltrado inflamatório estende-se por todo o tecido conjuntivo (Page e Schroeder, 1976; Kornman, Page e Tonetti, 1997; Kinane, 2001).

Diversas citocinas estão presentes no cenário da doença periodontal (Silva *et al.*, 2007; Gemmelet *al.*, 1997). Estas moléculas são produzidas por células no microambiente inflamatório e irão, pelo controle das funções de diversos tipos celulares e da migração/recrutamento celular, determinar o destino do processo inflamatório. Enquanto citocinas como IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-8 promovem direta ou indiretamente a atividade inflamatória, IL-4, IL-10 e IL-13 estão relacionadas à atividade anti-inflamatória. O equilíbrio entre estas citocinas e, conseqüentemente, o equilíbrio entre a representatividade das atividades coordenadas por elas, pode definir estágios diferentes da inflamação (Moreira, 2007). A expressão de diferentes citocinas pode representar fenótipos e estágios de desenvolvimento da doença ou transição de fases das doenças periodontais (Gemmell *et al.*, 1997).

1.3 Imunologia da Doença Periodontal

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular envolvidas no processo inflamatório e imune. São reguladoras celulares e produzidas principalmente por linfócitos T e macrófagos (Gemmell *et al.*, 1997). Realizam diversas ações na resposta imunoinflamatória, na regulação do crescimento e diferenciação das células (Offenbacher, 1996), sendo consideradas reguladoras do processo imunoinflamatório na periodontite (Ishikawa, 2007).

O componente microbiano desencadeia a produção e liberação de citocinas, ativação do sistema do complemento e quimiocinas (Ishikawa, 2007). Tanto as citocinas pró inflamatórias quanto as anti-inflamatórias podem ser detectadas em tecidos periodontais acometidos por periodontite, bem como nos tecidos de granulação (Kinane e Lappin, 2002).

Diferenças nas citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2 determinam as diferentes funções biológicas dos subgrupos: linfócitos Th1 produzem primariamente IL-2; IFN- γ ; TNF- β , enquanto linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Altos níveis de atividade Th1 promovem inflamação excessiva e injúria tecidual, funções mediadas por célula como a reação de hipersensibilidade tardia. Células Th2 estão mais associadas com forte resposta mediada por anticorpos, e reações alérgicas (Goldsby *et al.*, 2000).

Células Th1 e Th2 podem individualmente ou combinadas regular a defesa do hospedeiro contra a infecção periodontal. Inversamente, a expressão de citocinas Th1/Th2 pode ser originada de características específicas de patógenos periodontais durante a infecção (Gemmell *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que citocinas inflamatórias produzidas por células Th1 estariam mais associadas a um processo de destruição tecidual ativo, enquanto citocinas com características antiinflamatórias produzidas por células Th2 estariam envolvidas na homeostasia tecidual e no subsequente processo de reparo tecidual (Kinane; Lappin, 2001). Provavelmente, considerando a dinâmica da resposta imune, um perfil de citocinas nos tecidos periodontais seria alternado entre Th1 e Th2 dependendo do estágio da doença (Teng, 2002). Salvi *et al* (1998) mostram que a análise do FG de pacientes com periodontite crônica e agressiva na “dentição terminal” apresentava elevados níveis dos mediadores inflamatórios Th1 (IL-2 e INF γ) quando comparados aos mediadores da resposta Th2 (IL-4 e IL-6).

A resposta imuno-inflamatória do hospedeiro ao biofilme localizado no sulco gengival é caracterizada pela produção excessiva de citocinas inflamatórias e enzimas, que são responsáveis pela maioria de destruição periodontal, no local, que provoca os sinais clínicos observáveis na doença (Seymour & Gemmell, 2001; Preshaw, 2008). Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no fluido gengival, como IL-1 β (Figueredo *et al.*, 1999;

Giannopoulou *et al.*, 2003; Goutoudi *et al.*, 2004; Toker *et al.*, 2008) e IL-8 (Gamonal *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2002; Kamma *et al.*, 2004; Teles *et al.*, 2009) têm sido associados às periodontites crônica e agressiva. Entretanto, ainda não está claro se a quantidade total ou a simples presença da citocina no fluido gengival tem papel importante para a progressão da doença.

A IL-1 β é um dos mediadores mais investigados no fluido crevicular gengival (FCG) (Mathur *et al.*, 1996; Yoshimura *et al.*, 1997; Figueredo *et al.*, 1999; Bostrom *et al.*, 2000; Gamonal *et al.*, 2000; Giannopoulou *et al.*, 2003; Goutoudi *et al.*, 2004; Toker *et al.*, 2008). Em modelos de gengivite experimental os níveis de IL-1 β apresentam-se elevadas, caracterizado por um aumento gradual com o passar do tempo (Gonzales *et al.*, 2001; Zhang; *et al.*, 2002). Os níveis da IL-1 β também apresentam-se elevados em pacientes com periodontite quando comparados com pacientes saudáveis e com gengivite (Houet *et al.*, 1995; Giannopoulou *et al.*, 2003). Adicionalmente, nos níveis da IL-1 β estão mais elevados em sítios ativos quando comparados aos inativos (Gamonal *et al.*, 2000) e mostram declínio após tratamento (Reinhardt *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1996; Lamster *et al.*, 1996; Holmlund; Hanstrom; Lerner, 2004). Além disso, foi observado em um modelo primata que quando a IL-1 β é bloqueada *in vivo*, ocorre uma redução da perda óssea alveolar detectada por radiografia (Oates *et al.*, 2002).

Giannopoulou *et al.* (2003) constataram que pacientes com periodontite agressiva apresentaram maiores níveis de IL-1 β em seu (FG), em comparação com a periodontite crônica. Os resultados daquele estudo indicaram que os níveis de IL-1 β , quando comparados aos sítios do grupo saudável, mostraram um aumento 6 vezes maior para os pacientes com periodontite crônica e 9 vezes maior para o grupo de periodontite agressiva. Os autores sugeriram que as diferenças na quantidade de IL-1 β estão envolvidos na progressão rápida da periodontite agressiva quando comparada com a forma crônica. No entanto, Suzuki *et al.* (2008) não encontraram diferença significativa entre as concentrações de IL-1 β em sítios profundos em pacientes com periodontite agressiva e crônica.

A presença de hiper-atividade neutrofílica pode estar associada a uma maior destruição periodontal. Foi observado que neutrófilos periféricos de pacientes com periodontite crônica e agressiva encontravam-se hiper-responsivos após a estimulação *in vitro* quando comparados a controles saudáveis (Fredriksson *et al.*, 2003). Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela ativação de neutrófilos que podem levar a uma excessiva liberação local de enzimas proteolíticas como a elastase, resultando em

destruição dos tecidos periodontais (Gustafsson; Asman; Bergstrom, 1994; Figueredo, Gustafsson *et al.*, 1999).

A elastase é a enzima neutrofílica encontrada em maior quantidade no FG durante o processo de inflamação periodontal (Cox; Eley, 1989). Foi sugerido que a elastase pode ser um indicador potencial para periodontite e para progressão da doença (Palcanis *et al.*, 1992; Armitage *et al.*, 1994). Em um estudo longitudinal, Jin e colaboradores, (1995) encontraram níveis de elastase significativamente elevados em indivíduos com periodontite refratária quando comparados àqueles com grau similar de periodontite no início do estudo. No entanto, ocorreu redução favorável após o tratamento.

A IL-2 é uma citocina pró-inflamatória que tem ação na regulação de células B e atua na reabsorção óssea na doença periodontal (Seymour *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1995) concluíram que os níveis de IL-2 estavam significativamente elevados em sítios ativos de pacientes com periodontite refratária quando comparados a sítios inativos após acompanhamento por 3 meses. Além disso, eles encontram correlação positiva entre níveis elevados da IL-2 com perda de inserção do dente e reabsorção óssea da gengiva.

A presença da citocina anti-inflamatória IL-4 tem sido associada com a remissão ou a melhoria de ambas as formas de periodontite crônica e agressiva (Giannopoulou *et al.*, 2003; Pradeep *et al.*, 2008; Bastos *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram que baixos níveis de IL-4 em tecidos periodontais doentes estão associados à atividade e à progressão de doença periodontal (Shapira *et al.*, 1992; Giannopoulou *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2007). A diminuição da produção da IL-4 por células T CD4+ gengivais pode levar ao acúmulo de macrófagos ativados nos tecidos periodontais inflamados. A IL-4 inibe a produção IL-1 β e IFN- γ pelos monócitos. Assim, baixos níveis de IL-4 módulo a função dos monócitos que passam a secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, que promovem a destruição tecidual observada no local da inflamação (Te Velde *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1995).

A patogênese da doença periodontal é caracterizada pelo constante influxo de leucócitos em direção ao sulco gengival (Kornman *et al.*, 1997). Um grupo especial de citocinas, chamadas de quimiocinas é responsável pelo fenômeno migratório dos leucócitos para os tecidos e fluidos gengivais (Mukaida *et al.*, 1992). Em particular, a IL-8 garante o recrutamento seletivo de neutrófilos (Bickel, 1993). Ela pode ser secretada por diferentes células do paciente, como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (Baggiolini *et al.*, 1989).

Alguns estudos sugerem uma relação entre os níveis de IL-8 e atividade de doença periodontal. Foi demonstrado que a quantidade total de IL-8 estava significativamente

aumentada no FG de sítios doentes de pacientes com periodontite crônica, quando comparadas com sítios saudáveis ou com gengivite de pacientes controles (Tsai *et al.*, 1995; Mathur *et al.*, 1996; Gamonal *et al.*, 2000; Giannopoulou *et al.*, 2003). Gamonal e colaboradores (2000) encontraram níveis mais elevados IL-8 deste mediador em pacientes com periodontite, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Cabe ressaltar que no mesmo grupo de pacientes, sítios ativos apresentavam maiores concentrações de IL-8 (247,1 ng/ml) se comparados a sítios estáveis (163,6 ng/ml). A redução dos níveis de IL-8 após terapia periodontal também foi relatada (Tsai; Ho; Chen, 1995; Gamonal *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2002). Entretanto, alguns estudos mostraram uma relação inversa entre IL-8 e atividade de doença (Chung; Grbic; Lamster, 1997; Jin; Soder; Corbet, 2000).

A interleucina 10 (IL-10) é um polipeptídeo homodimérico de 17 kDa, que foi inicialmente descrito como um fator produzido por linfócitos T auxiliares (tipo 2) com propriedades inibitórias em clones de linfócitos T auxiliares (tipo 1), notadamente na resposta proliferativa e na produção de citocinas (Melefy, 1999). Essa citocina é produzida por uma série de diferentes tipos celulares, em especial pelas células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T. A IL-10 é o principal inibidor da síntese de citocinas e da atividade funcional de macrófagos, além de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias e das metaloproteinases da matriz extracelular (Melefy, 1999; Anker e Von Haehling, 2004).

A atividade biológica da IL-10 é mediada pelo seu receptor de membrana (IL-10R), o qual pertence ao subgrupo de receptores similares ao interferon (INF), da família dos receptores de citocinas classe II (Melefy, 1999; Moore *et al.*, 2001). Dessa forma, a IL-10 pode inibir a produção de várias citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em uma variedade de tipos celulares, além de se automodular (Yamaoka *et al.*, 1999; Melefy, 1999). Também inibe a geração de espécies reativas do oxigênio (intermediária) e aumenta a liberação dos receptores RsTNF, os quais podem antagonizar os efeitos do TNF- α (Gullestad *et al.*, 2002.). Além disso, estudos têm demonstrado que a IL-10 tem sua produção aumentada em processos inflamatórios (Yamaoka *et al.*, 1999). A IL-10 atua predominantemente de maneira antiinflamatória e modulatória na resposta inflamatória, condição que parece ser ainda mais evidente em condições inflamatórias crônicas, principalmente naquelas em que o TNF- α parece atuar de maneira significativa (Bolger *et al.*, 2002; Denys, *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2006).

Tomados em conjunto, estudos sugerem um papel de suma importância da IL-10 na fisiopatologia da doença periodontal, principalmente devido ao seu efeito modulador da síntese e secreção do TNF- α . Dessa forma, essa citocina vem ganhando um papel de destaque

como possibilidade terapêutica. Ainda nesse contexto, a taxa IL-10/ TNF- α pode contribuir para a avaliação da deterioração e progressão da doença periodontal. Portanto, mais estudos são necessários para se compreender os mecanismos moleculares que modulam os eventos supracitados.

1.4 Susceptibilidade Genética à Doença Periodontal

O sistema imune inato tem papel importante na iniciação, progressão e retenção do processo inflamatório. Consequentemente variações genéticas que possam alterar componentes deste sistema podem explicar as diferenças individuais na resposta a inflamação e ao tratamento clínico (Tamura *et al.*, 1992). Portanto, há um grande interesse em estudar polimorfismos de base única (SNPs) em genes que codificam moléculas envolvidas na cascata inflamatória. Estes poderiam ser utilizados potencialmente como marcadores para suscetibilidade, severidade e/ou tratamento clínico de doenças inflamatórias (Kornman, 1997; Tamura *et al.*, 1992).

A susceptibilidade genética na doença periodontal compreende um processo de múltiplas origem. A associação da susceptibilidade genética à doença periodontal deve-se aos estudos: de agregação familiar, da condição observada em estudos genéticos formais para a periodontia, e da prevalência da periodontite crônica em gêmeos.

Desde a década de 90, os estudos envolvendo gêmeos têm sugerido que o perfil genético individual possui um componente significativo para o risco relativo de periodontite. A identificação de fatores genéticos que controlam a resposta imune às infecções microbianas, tanto em roedores quanto em humanos, tem aumentado a ênfase da determinação genética na variabilidade da resposta do hospedeiro (Hassel & Harris, 1995). Um suporte adicional para a contribuição genética na periodontite revelou a identificação de certos polimorfismos genéticos que estão relacionados com os fenótipos da resposta imune achados em certos grupos de pacientes periodontais (Malo & Skamene, 1994; Malo *et al.*, 1994).

1.5 Mecanismos Epigenéticos

Os mecanismos epigenéticos se referem a modificações gênicas que não são resultantes de alterações na sequência de nucleotídeos. Tais modificações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo. Fatores como tabagismo, obesidade, diabetes, envelhecimento e presença/exposição a toxinas podem contribuir para

alterações dinâmicas na modulação epigenética (Offenbacher *et al.*, 2008, Gomez *et al.*, 2009). A presença dessas modificações epigenéticas pode resultar em mudanças nas vias que mantêm a homeostase celular (Ha & Califano, 2006) e interferir no desenvolvimento das doenças bucais. Fatores epigenéticos podem interferir na resposta do hospedeiro frente ao desafio bacteriano, contribuindo para alterar as características da doença periodontal em cada indivíduo (Gomez *et al.*, 2009).

Embora as alterações epigenéticas, tais como a metilação do DNA e a acetilação de histonas sejam consideradas importantes na carcinogênese humana (Armenante *et al.*, 1999; Kishiet *al.*, 2005; Feinberg, 2008), estes eventos ainda não foram bem estabelecidos na doença periodontal. A partir de 2009 apareceram os primeiros relatos sobre as investigações do papel da metilação na periodontite (Oliveira *et al.*, 2009, Viana *et al.*, 2010; Zhangetal., 2010).

1.6 Mecanismos Genéticos - Polimorfismo

As alterações genéticas são caracterizadas por alterações na sequência genômica, podendo alterar a transcrição de proteínas, sendo exemplificadas pelas mutações esporádicas e pelo polimorfismo. Mutações foram identificadas em síndromes hereditárias com significantes alterações no periodonto, indicando que um defeito gênico pode predispor à periodontite (Kinane *et al.*, 2005).

O polimorfismo genético é definido como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% (Miller *et al.*, 2001). O polimorfismo em único nucleotídeo (SNP) é o tipo mais comum, e a sua ocorrência é estimada em 10 milhões de SNP no genoma humano. Quando um polimorfismo não altera o aminoácido, a alteração genética é dita silenciosa. Quando há alteração na expressão e/ou função da proteína, é denominado polimorfismo funcional (Kinane, 2005).

Influências genéticas e ambientais têm papel importante na suscetibilidade do hospedeiro (Albandar, 2002; Kinane e Lappin, 2002), uma vez que a variação genética influencia a resposta imune e inflamatória frente à agressão bacteriana, podendo assim aumentar ou reduzir o risco individual para determinada doença (Kinane *et al.*, 2005).

Estudos de polimorfismos genéticos nas doenças periodontais, com ênfase em genes de citocinas, vêm sendo realizados na tentativa de elucidar a suscetibilidade do hospedeiro frente ao desafio bacteriano (Kinane, 2000; Schenkein, 2002). O primeiro estudo de

polimorfismo relacionado à doença periodontal foi descrito por Kornman *et al.* (1997), associando o polimorfismo da citocina IL-1 com a periodontite grave em não fumantes.

Posteriormente, polimorfismos em diversas citocinas foram associados à doença periodontal como IL-1 β (+3953), TNF α (-308), IL-10, entre outros (Schenkein, 2002).

Devido ao importante papel da IL-10 no metabolismo ósseo, estudos sugerem um papel de suma importância da IL-10 na fisiopatologia da doença periodontal, principalmente devido ao seu efeito modulador da síntese e secreção do TNF- α . Dessa forma, essa citocina vem ganhando um papel de destaque como possibilidade terapêutica (Hennig *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2001).

➤ OBJETIVO

- Geral

- ✓ Avaliar o polimorfismo do gene da interleucina 10 e associar com a doença periodontal crônica em adultos.

- Específico

- ✓ Relacionar o polimorfismo da interleucina 10 com a doença periodontal crônica em pacientes adultos.
- ✓ Atuar preventivamente com os pacientes que já manifestaram a doença ou que ainda não e seus sucessores.

➤ JUSTIFICATIVA

Sabe-se que na doença periodontal ainda existem alguns pontos do seu aparecimento e desenvolvimento a serem desvendados. O caráter genético da doença periodontal ainda é não muito estudado. Porém, dados publicados na literatura sugerem fortemente a existência de uma forte ligação entre a ocorrência da doença a susceptibilidade genética (Mellati *et al.*, 2007; Drożdżik *et al.*, 2006; Folwaczny *et al.*, 2006; Kornman, 2005;). No entanto, ainda prevalece muitos questionamentos acerca desta associação e a relação entre doença periodontal e seus aspectos genéticos ainda carecem de elucidação. Se a patologia é

desenvolvida por patógenos específicos, porque pessoas do mesmo grupo de risco desenvolvem condições cuja agressividade são diferentes? Ao se investigar a potencial relação entre doença periodontal ao fator genético, os resultados poderão apontar para o desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e para a expansão da fronteira do conhecimento sobre a doença periodontal, e assim proporcionar uma melhor qualidade de vida a estes pacientes.

2 MATERIAL E MÉTODO

A proposta do presente estudo foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás) e aprovada sob o número CAAE 0073.0.168.000-10(ANEXO A). Os participantes foram devidamente informados sobre a pesquisa, seus métodos e objetivos. Após a adesão voluntária, os participantes foram incluídos no grupo amostral mediante a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B). As entrevistas de triagem dos participantes aconteceram em consultório odontológico particular ou no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás.

2.1 Grupo Amostral

Foram avaliados 36 casos de pacientes com doença periodontal crônica e não agressiva e 30 controles. Casos e controles foram agrupados em faixas etárias que variaram de 30 a 55 anos em quinquênios. Foram considerados como casos, os indivíduos de ambos os sexos diagnosticados com doença periodontal independente da sua severidade (leve, moderada ou severa) identificada clinicamente durante o exame físico com uma sonda periodontal milimetrada, definida como sonda “O” da Universidade de Michigan-EUA, com marcações de 3, 6 e 8 mm. Os controles corresponderam a indivíduos saudáveis e sem sinais clínicos de doença periodontal.

2.2 Amostras Biológicas, Isolamento e Quantificação do DNA

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1 (1q31-32) e um polimorfismo de um único nucleotídeo, identificado no promotor do gene, correspondendo à substituição de base de guanina por adenina na posição -1082 (-1082G/A), que tem sido associado à produção diferencial da IL-10. Para a identificação dos polimorfismos -1082G/A da *IL-10*, amostras biológicas foram obtidas mediante a coleta de 5 mL de sangue periférico em EDTA. O DNA genômico foi isolado a partir de 300 µL do sangue total, usando-se um *kit* comercial de extração de DNA *Invisorb® Spin Blood Miniki* (Invitex, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante.

A quantificação da concentração de DNA existente em cada amostra foi realizada mediante uma análise comparativa em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio

(10µg/mL) e padronizado com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass*[®] (Invitrogen, EUA).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR seguiram os protocolos e a termociclagem propostos e otimizados por Mellatiet *al.* (2007). Segundo os autores, os genótipos da IL-10 poderiam ser obtidos mediante um método de amplificação por PCR em um sistema refratário à mutação (ARMS-PCR). Por este método é realizada separadamente uma PCR para cada um dos alelos, que contém nucleotídeos de adenina (A) ou uma guanina (G), respectivamente. ARMS-PCR difere de uma PCR convencional para determinação de alelos, pois não requer o uso de uma enzima de restrição para clivar o DNA amplificado. A amplificação de um alelo depende do uso do seu oligonucleotídeo iniciador específico, assim o alelo contendo A somente foi amplificado na reação que se utilizou o primer correspondente àquele alelo.

Tanto o primer sense (A ou G) e o primer antisense (genérico) amplificam a mesma região do promotor gene da IL-10. O amplicom produzido correspondia a um fragmento de aproximadamente de 258 - pares de bases (pb). Primers de controle interno foram utilizados para verificação de sucesso amplificação por PCR, correspondendo a um amplicom de 429 pb da sequência do gene do hormônio do crescimento humano.

Condições da PCR. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de reação de 50 µL de solução contendo aproximadamente 100 ng de DNA, 7 µL de tampão *Gold STR 10X*[®] (Promega Corporation, EUA) , 2 µL cloreto de magnésio a 50 mM, 5U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation, EUA) e 1µL de uma solução contendo os primer A sense/primer B sense, primer genérico, primer controle interno 1 e primer controle Interno 2 (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e as concentrações usadas na reação de ARMS-PCR para a determinação do polimorfismo -1082G/A na região do promotor do gene da IL-10.

Primer genérico	5'- CAGTGCCAACCTGAGAATTTGG -3'	10 µM
Primer A sense	5'- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA -3'	10 µM
Primer G sense	5'- CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG -3'	10 µM
Primer controle interno 1	5'- GCCTTCCCAACCATTCCTTA -3'	1 µM
Primer controle interno 2	5'- TCACGGATTCTGTTGTGTTTC -3'	1 µM

Condições de termociclagem: Para as reações de amplificação foi usado o termociclador *DNA IQ5*[®] (Biorad, EUA). O protocolo de termociclagem utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Protocolo de termociclagem usado na reação de ARMS-PCR para a determinação do polimorfismo -1082G/A na região do promotor do gene da IL-10.

Etapas	Quantidade de ciclos	Condições
Desnaturação Inicial	1	95°C por 1 min
Desnaturação Anelamento Extensão	20	95°C por 15 seg 65°C por 50 seg 72°C por 40 seg
Desnaturação Anelamento Extensão	20	95° por 20 sec 59°C por 20 seg 72°C pó 20seg
Extensão final	1	72° por 5 min

Fonte: Mellati *et al.*, (2007).

2.4 Análise e Documentação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram avaliados, submetendo-se o DNA a um campo elétrico constante de 10 V/cm em um gel de agarose a 2% em TBE. A visualização dos fragmentos amplificados de DNA foi possível mediante a coloração do gel em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL. Como marcador de peso molecular/tamanho foi usado o 100 pb DNA ladder (Invitrogen, EUA). Um sistema de vídeo-documentação (VDS[®], Amersham Bioscience, EUA) interligado a um microcomputador com um sistema de captura e análise de imagens (Imagemaster[®], Amersham Bioscience, EUA) foi usado para o registro e análise dos fragmentos obtidos por PCR.

2.5 Análise Estatística

Visando avaliar as frequências alélicas e genóticas associadas ao polimorfismo -1082G/A do gene da IL-10, dos pacientes com doença periodontal e seus controles, foi usado o programa Arlequin (versão 3.11). Com o auxílio desse programa, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi analisado, além das heterozigosidades esperada e observada. Para essas análises, os 36 pacientes foram subdivididos em cinco faixas etárias, descritas a seguir, pacientes entre 30 a 35 anos; pacientes entre 35 a 40 anos; pacientes entre 40 a 45 anos; pacientes entre 45 a 50 anos e finalmente, pacientes de 50 a 55 anos. No grupo controle, os 30 indivíduos

selecionados, sem doença periodontal, foram selecionados, da população goianiense, com a mesma distribuição por sexo e idade dos casos.

Como essa pesquisa se trata de um estudo caso-controle, as frequências genóticas da IL-10, nos portadores de doença periodontal, foram comparadas com as frequências genóticas encontradas no grupo controle. Estes estudos são chamados de estudos retrospectivos, pois a partir da doença-dano se busca retrospectivamente fatores de exposição. Para essa análise, foi utilizado um estimador indireto do risco relativo, denominado razão de chance, do inglês, *odds ratio*. Uma vez calculada a OR, é preciso estimar o seu intervalo de confiança de 95%. Nesse caso, se o extremo inferior deste exceder o valor de 1, pode-se considerar igual a um teste de significação estatística.

2.6 Resultados

Dos 36 pacientes analisados, quanto à distribuição por gênero, 24 (67%) eram do sexo masculino e 12 (33%) eram do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de 43 anos (DP= $\pm 7,3$). As faixas etárias predominantes, nesse grupo, foram as de 30 a 35 anos e 50 a 55 anos, perfazendo um total de 16 (44%) dos pacientes. No grupo controle, dos 30 pacientes selecionados, 19 (63%) eram do sexo masculino e 11 (37%) eram do sexo feminino. A média de idade do grupo controle foi de 39,5 anos (DP= $\pm 7,5$ anos). Nos dois grupos houve uma predominância do sexo masculino. A distribuição dos grupos por faixa etária e sexo pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição percentual dos portadores de doença periodontal e seus controles, de acordo com o sexo e faixa etária, correspondentes ao grupo amostral no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e periodontite.

Grupos Faixa etária	Casos			Controles		
	Sexo (%)			Sexo (%)		
	M	F	Total	M	F	Total
30 -/ 35	6 (75)	2 (25)	8 (22)	8 (67)	4 (33)	12 (40)
35-/ 40	2 (33)	4 (67)	6 (18)	4 (80)	1 (20)	5 (17)
40-/ 45	3 (43)	4 (57)	7 (19)	3 (27)	3 (27)	6 (66)
45-/ 50	5 (71)	2 (29)	7 (19)	3 (60)	2 (40)	5 (17)
50-/ 55	8 (100)	0 (0)	8 (22)	1 (50)	1 (50)	2 (7)
Total	24 (67)	12 (33)	36 (100)	19 (63)	11 (37)	30 (100)

Os genótipos dos grupos caso e controle, após as análises moleculares, foram classificados em AA, AG e GG, quanto ao loco da IL-10. De acordo com a Tabela 4, 16 (44%) dos indivíduos com doença periodontal apresentaram o genótipo AG, seguidos de 13 (36%) com o genótipo GG e 7 (20%) com o genótipo AA, destacando uma maior prevalência de heterozigotos para o loco da IL-10, principalmente nos indivíduos da faixa etária de 30 a 35 anos. Conforme pode ser observado na Tabela 2, no grupo controle, 13 (43%) dos indivíduos apresentaram o genótipo AG, 12 (40%) apresentaram GG e apenas 5 (17%) foram classificados como AA.

Tabela 4. Distribuição dos genótipos de IL1-0 dos pacientes portadores de doença periodontal e seus controles, de acordo com o sexo e faixa etária, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e periodontite.

Genótipos (%)								
Faixa etária	Casos				Controles			
	AA	AG	GG	Total	AA	AG	GG	Total
30 -/ 35	—	6 (75)	2 (25)	8 (22)	3 (25)	3 (25)	6 (50)	12 (40)
35 -/ 40	1 (17)	4 (66)	1 (17)	6 (18)	0 (0)	3 (60)	2 (40)	5 (17)
40 -/ 45	3 (43)	1 (14)	3 (43)	7 (19)	1 (17)	4 (66)	1 (17)	5 (66)
45 -/ 50	1 (14)	3 (43)	3 (43)	7 (19)	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (17)
50 -/ 55	2 (25)	2 (25)	4 (50)	8 (22)	0	1 (50)	1 (50)	2 (7)
Total	7 (20)	16 (44)	13 (36)	36(100)	5 (17)	13 (43)	12 (40)	30 (100)

As freqüências genóticas dos grupos caso e controle foram comparadas pelo teste do X^2 (Tabela 5), não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,96$), quanto à distribuição dessas freqüências, no loco da IL-10.

Tabela 5. Distribuição dos genótipos associados ao gene da IL-10, nos grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal.

Genótipos	Caso (%)	Controle (%)	X^2	GL	p
AA	7 (20)	5 (17)	0,85	2	0,96
AG	16 (44)	13 (43)			
GG	13 (36)	12 (40)			
Total	36 (100)	30 (100)			

As freqüências dos alelos A e G, também foram comparadas pelo teste do X^2 (Tabela 6), entre os grupos caso e controle, não sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,92$).

Tabela 6. Distribuição dos alelos A e G, localizados no códon da IL-10, nos grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal.

Alelos	Casos (%)	Controle (%)	X²	GL	p
A	14 (40)%	12 (40)			
G	22 (60)	18 (60)	0,008	1	0,9267
Total	36 (100)	30 (100)			

Os dados das heterozigosidades observada e esperada, quanto ao loco da IL-10, agrupados por faixa etária, nos 36 pacientes selecionados, podem ser visualizados na Tabela 5. A faixa etária de 30 a 35 anos foi a que apresentou maiores níveis de heterozigosidade observada e as faixas etárias 35 a 40 e 40 a 45 apresentaram os maiores níveis de heterozigosidade esperada, quando comparada com a demais faixas etárias. As heterozigosidades esperada e observada por faixa etária o número de cópias de genes e o resultado, quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, no loco da IL-10, indicaram que os grupos se encontram em equilíbrio ($p > 0,05$).

Tabela 7. Heterozigosidade do locus da IL-10 em relação ao SNP -1082G/A para os grupos caso e controle, no estudo de associação entre o polimorfismo do gene da IL-10 e doença periodontal.

Faixa etária	HO*	HE**	Valor de p
30-35	0,75	0,50	0,44
35-40	0,67	0,54	1,0
40-45	0,14	0,54	0,12
45-50	0,43	0,49	1,0
50-55	0,25	0,50	0,22
Média	0,45	0,51	

* Heterozigosidade observada; ** Heterozigosidade esperada.

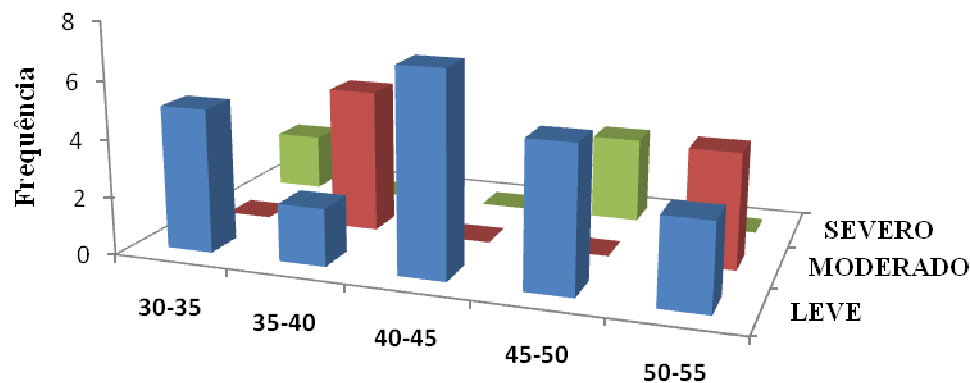
Quanto ao grupo controle, as heterozigosidades observada e esperada foram de 0,43 e 0,48, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, as frequências genóticas se ajustam ao esperado sendo, portanto, indicativo de que esse grupo também se encontrava em equilíbrio ($p = 0,7$).

Finalmente, após as análises da razão de chance (*odds ratio*), como os extremos inferiores dos intervalos de confiança não excederam o valor de 1 e os índices de OR foram aproximadamente iguais a 1 (Tabela 8), os três genótipos de IL-10 provavelmente não estão relacionados com a doença periodontal, nos grupos de indivíduos amostrados nesse estudo.

Tabela 8. Análise de risco nos grupos caso e controle, quanto aos genótipos de IL-10.

Genótipo	Casos	Controle	OR	IC (95%)	p
AA	7	5	1,2	0,34-4,3	0,9
AG	15	13	0,9	0,35-2,5	0,9
GG	14	12	0,9	0,35-2,6	0,9
Total	36	30			

Os pacientes selecionados para esse estudo apresentaram a doença periodontal em graus classificados como leve, moderado e severo (Figura 1).

**Figura 1.** Distribuição da severidade da doença periodontal por faixa etária

Na faixa etária de 30 a 35 anos, 5 (71%) pacientes apresentaram periodontite leve, e os demais, 2 (29%), a doença periodontal foi classificada como severa. Na faixa etária de 35 a 40 anos, a maioria dos pacientes, 5 (71%), apresentou doença periodontal moderada. Já nas faixas etárias de 40 a 50 anos, houve uma maior prevalência da doença periodontal leve, sendo de 100% nos pacientes de 40 a 45 anos e de 62,5% nos pacientes com idades variando entre 45 a 50 anos. Finalmente, na faixa etária de 50 a 55 anos, 4 (75%) dos pacientes apresentaram a doença periodontal moderada. No geral, dos 36 pacientes com doença periodontal, 22 (61%) apresentaram doença periodontal leve, 9 (25%) eram portadores da forma moderada e 5 (14%) da forma severa da periodontite.

Quanto à distribuição por sexo, em relação ao grau de severidade da doença periodontal (Figura 2). Das mulheres, 8 (67%) apresentaram doença periodontal leve, 3 (25%) desenvolveram a forma moderada da doença e em apenas 1 (8%) a forma severa foi detectada. Nos homens, 14 (58%) apresentaram a forma leve da periodontite, 6 (25%) a forma moderada

e 4 (16%) a forma severa. Nesse caso, os homens apresentaram 2 vezes mais a forma severa da doença periodontal, em relação às mulheres, 16% versus 8%, respectivamente.

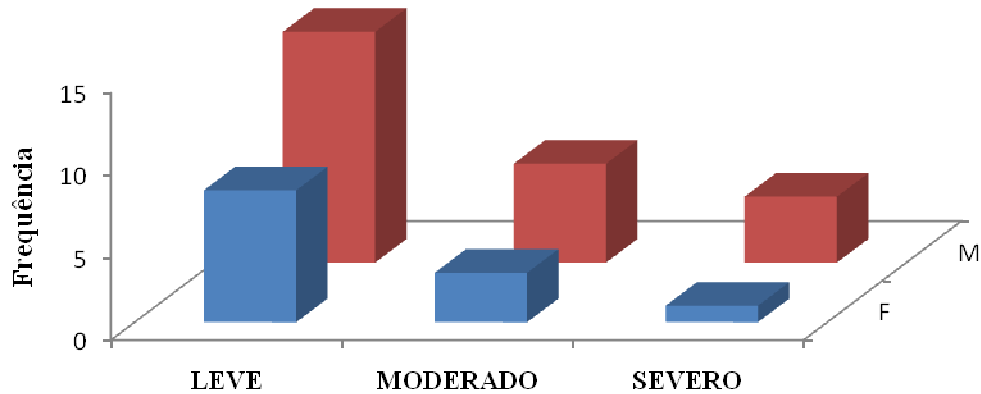


Figura 2. Distribuição dos graus de severidade da doença periodontal quanto ao sexo.

A distribuição dos genótipos da IL-10 também foi associada aos graus de severidade da doença periodontal (Figura 3). Do grupo de pacientes, 6 (27%) casos apresentaram a forma leve da doença e o genótipo AA, 11 (50%) apresentaram o genótipo AG e 5 (23%), a o genótipo GG. Na forma moderada, o genótipo AG, foi o mais prevalente, sendo detectado em 6 (67%) casos. Na forma severa, o genótipo AG foi encontrado em apenas 1 (20%) caso.

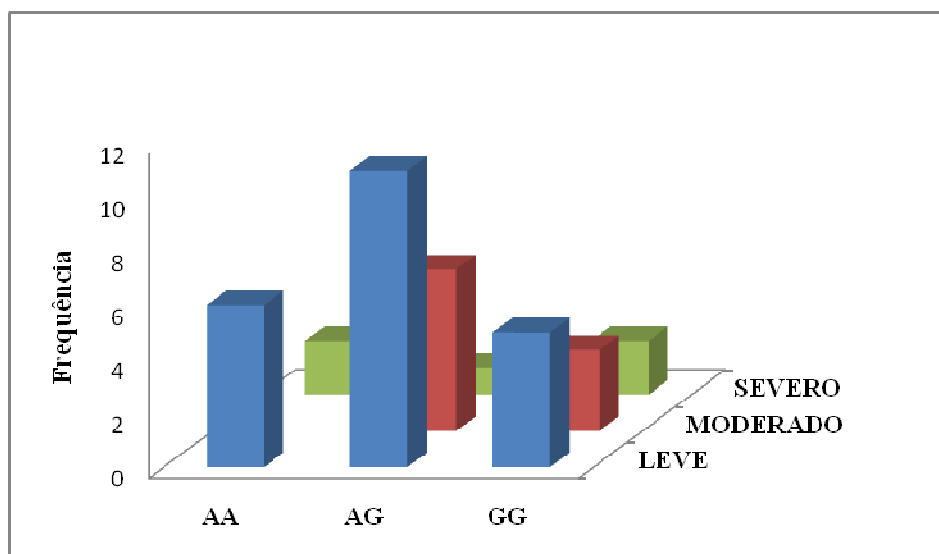


Figura 3. Distribuição dos genótipos da IL-10, de acordo com a severidade da doença periodontal.

O teste de regressão linear (Ayres & Ayres, 2007) mostrou que a gravidade da doença periodontal não está associada pela distribuição dos genótipos da IL-10 ($p=0,61$), nas diferentes faixas etárias, no grupo amostrado.

3 DISCUSSÃO

A periodontite crônica é caracterizada pela inflamação nos tecidos gengivais, seguida de perda do osso alveolar, decorrente de agressão bacteriana (Armitage, 1999). Embora o biofilme bacteriano seja considerado a causa primária das doenças periodontais, estudos recentes enfatizam a importância do sistema imune no desenvolvimento da doença. A resposta imunológica desencadeada pelos periodontopatógenos, os níveis das citocinas produzidas e a suscetibilidade do paciente determinam o desfecho da doença (Gemmell *et al.* 1997, Kinane *et al.*, 2005; Offenbacher *et al.*, 2008). Logo, a presença de alterações epigenéticas e genéticas, que determinam a expressão dos genes do sistema imune, podem interferir diretamente na patogênese da doença periodontal.

Recentemente, foi sugerido que, na periodontite, a alta variabilidade dos níveis de citocinas e a baixa frequência de sua detecção, pode contribuir para determinar a presença e/ou severidade da doença (Queiroz *et al.*, 2008). No presente estudo, foi avaliado o SNP -1082G/A localizado no promotor do gene da IL-10 em pacientes portadores de doença periodontal e controles. A análise das frequência dos genótipos e das frequências alélicas permitiram concluir que não encontrado relação causal entre a presença do genótipo G ou A e o desenvolvimento da doença periodontal em adultos. Em relação à faixa etária, os casos mais severos se concentraram após os 45 anos, enquanto os casos mais leves foram encontrados em faixas etárias mais jovens. No entanto, nenhuma associação entre a ocorrência do SPN e a doença periodontal. Embora o número de casos tenha sido mais prevalente entre os homens, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos e da severidade da doença no grupo estudado. No presente estudo, a ausência de significado estatístico no teste de regressão linear permite concluir que o SNP -1082G/A do gene da IL-10 não tem valor preditivo para a doença periodontal e, portanto, não deve ser usado com valor de prognóstico.

Os resultado do presente estudo não estão em conformidade com diversos estudos que investigaram o papel deste SNP e de outras moléculas inflamatórias no desenvolvimento das doenças periodontais (Moreira *et al.*, 2007; Holla *et al.*, 2002, Tervonen *et al.*, 2007). Entretanto, Trevilatto *et al.* (2003), Moreira *et al.* (2007) e Tervonen *et al.* (2007) descreveram maior frequência do genótipo GG nos indivíduos com periodontite, sugerindo que o alelo G tenha um papel importante no curso da doença periodontal. Ao considerarmos a gravidade da doença, não observamos a maior frequência do genótipo GG entre os pacientes doentes. Por outro lado, os achados do presente estudo estão em concordância com Yamazaki

et al. (2001) e Kinane *et al.* (1999), que não encontraram associação entre o SNP -1082G/A e a ocorrência e/ou severidade da doença periodontal. No trabalho recente de Portela (2011), que avaliou a associação do SNP -592C/A da IL-10 na doença peri-implantar, não encontrou correlação significativa entre o polimorfismo e a condição de agravo a saúde, pós-implante dentário.

É importante ressaltar que o presente estudo foi proposto para a observação do polimorfismo IL-10 nos indivíduos doentes e não doentes. Assim, o tamanho do grupo amostral pode ter contribuído para que a associação entre a ocorrência do SNP e o desenvolvimento da doença periodontal não tenha sido percebida. Estudos envolvendo um maior número de indivíduos poderia ampliar as possibilidades investigativas acerca desta potencial associação.

Em conjunto, os dados deste estudo indicam que o SNP -1082G/A no gene IL-10 não mostrou-se envolvido com o desenvolvimento da doença periodontal. Nesse contexto, esse polimorfismo genético deve ser melhor avaliado para ser usado como marcador diagnóstico da doença periodontal em adultos. Além disso, a IL-10 não apresentou valor prognóstico, o que poderia auxiliar o profissional da saúde a optar pela melhor conduta de tratamento, uma vez que a escolha da terapia é baseada não só na destruição periodontal que o paciente apresenta, mas também no seu risco de desenvolver problemas periodontais mais severos (Nevins & Nevins, 1998).

CONCLUSÃO

O SNP -1082G/A no gene IL-10 não está relacionado com o desenvolvimento da doença periodontal;

O polimorfismo genético não foi considerado como marcador diagnóstico da doença periodontal crônica em adultos.

O SNP -1082G/A do gene da IL-10 não mostrou valor preditivo para a doença periodontal e, portanto, não podemos usar com valor prognóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOCK, I.M.; MANEECHOTESUWAN, K.; USMANI, O. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting beta2-agonists. *J Allergy Clin Immunol*, v. 110, n. 6, p. 261-268, Dec. 2002. Supplement.

ALBANDAR, J. M. Global risk factors and indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000, v. 29, n.1, Apr. 2002.

ALEXANDER, D. C. *et al.* Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol*, v. 67, n. 8, p. 755-762, Aug. 1996.

ALPAGOT, T. *et al.* Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res*, v. 36, n. 3, p. 169-174, Jun. 2001.

ALTUCCI, L.; STUNNENBERG, H.G. Time for epigenetics. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 41, n. 1, p. 2-3, Jan. 2009.

AOUJJEHANE, L. *et al.* Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest*, v. 88, n. 9, p. 973-985, Sep. 2008.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec. 1999.

ARMITAGE, G. C. *et al.* Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. *J Periodontol*, v. 65, n. 2, p. 120-128, Feb. 1994.

ASTOLFI, C.M.; SHINOHARA, A.L.; SILVA, R.A.da, SANTOS, M.C.; LINE, S.R.; SOUZA, A.P.de. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*, v. 33, p. 699-703, 2006.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*, v. 84, n. 4, p. 1045-1049, Oct. 1989.

BARBOUR, S.E. *et al.* Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 8, n. 4, p. 437-460, 1997.

BASTOS, M.F. *et al.* TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis*, v. 15, n. 1, p. 82-87, Jan. 2009.

BATISTA, A.C.; SILVA, T.A.; *et al.* Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Diseases*, v. 8, n. 5, Sep. 2002, p. 254-260.

BAYLIN, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol Suppl*, v. 2, n. 12, p. S4-S11, Dec. 2005. Supplement 1.

BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, v. 64, n. 5 Suppl, p. 456-460, May 1993.

BOLGER, A.P.; SHARMA, R.; Von HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; OLIVER, B.; RAUCHAUS, M.; *et al.* Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*, v. 90, n. 4, p. 384-9, 2002.

BOSTROM, L.; LINDER, L.E.; BERGSTROM, J. Smoking and GCF levels of IL-1beta and IL-1ra in periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 27, n. 4, p. 250-255, Apr. 2000.

BUCHMANN, R. *et al.* Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. *J Dent Res*, v. 81, n. 10, p. 716-721, Oct. 2002.

CHAMPAGNE, C.M. *et al.* Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 31, n., p. 167-180, 2003.

CHUNG, R.M.; GRBIC, J.T.; LAMSTER, I.B. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, v. 24, n. 3, p. 146-152, Mar. 1997.

CLAFFEY, N. *et al.* Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 1/2 years of observation following initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, v. 17, n. 2, p. 108-114, Feb. 1990.

CLAFFEY, N.; EGELBERG, J. Clinical characteristics of periodontal sites with probing attachment loss following initial periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, v. 21, n. 10, p. 670-679, Nov. 1994.

CLAUDINO M, TROMBONE APF, CARDOSO CR Jr SBF Jr WM, ASSIS GF, *et al.* The broad effects of the functional IL-10 promoter -592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3 and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol.*, v. 84, p. 1565-73, 2008.

COX, S. W.; ELEY, B.M. Detection of cathepsin B- and L-, elastase-, tryptase-, trypsin-, and dipeptidyl peptidase IV-like activities in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients with peptidyl derivatives of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin. *J Periodontol Res*, v. 24, n. 6, p. 353-361, Nov. 1989.

CUTLER, C. W. *et al.* Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol*, v. 70, n. 11, p. 1313-1321, Nov. 1999.

DARBY, I. B. *et al.* Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v. 32, n. 2, p. 200-206, Feb. 2005.

- DENYS, A. UDALOVA, I.A.; SMITH, C.; WILLIAMS, L.M.; CIESIELSKI, C.J.; CAMPBELL J. et al. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF- α production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF- κ B in primary human macrophages. *J Immunol*, v. 168, n. 10, p. 4837-45, 2002.
- DOGAN, B. et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol*, v. 74, n. 6, p. 803-814, Jun. 2003.
- DEOZDZIK, A. et al. Polymorphism in interleukin-1 gene and the risk of periodontitis in a Polish population. *Advances in Medical Sciences*, v. 51, suppl. 1, 2006.
- DUTZAN, N. et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, v. 80, n. 2, p. 290-296, Feb. 2009.
- FAVERI, M. et al. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v., n., p., Jul.21, 2009.
- FEINBERG, A.P. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*, v. 299, n. 11, Mar. 2008.
- FIGUEREDO, C. M. et al. Increased release of elastase from in vitro activated peripheral neutrophils in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 26, n. 4, p. 206-211, Apr. 1999.
- _____. Increased interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol*, v. 70, n. 12, p. 1457-1463, Dec. 1999.
- FIGUEREDO, C.M.; FISCHER, R.G.; GUSTAFSSON, A. Aberrant neutrophil reactions in periodontitis. *J Periodontol*, v. 76, n. 6, p. 951-955, Jun. 2005.
- FIGUEREDO, C.M.; GUSTAFSSON, A. Protease activity in gingival crevicular fluid: presence of free protease. *J Clin Periodontol*, v. 25, n. 4, p. 306-310, Apr. 1998.
- FITZPATRICK, D.R.; WILSON, C.B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol*, v. 109, n.1, p. 37-45, Oct. 2003.
- FLEMMING T. Periodontitis. *Ann Periodontol*, v. 4, p. 32-7, 1994.
- FLEMMING, T.F. Periodontites, *Ann Periodontol*, v. 4, n. 1, p. 32-37, Dec. 1999.
- FOLWACZNY, M. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, v. 135, p. 330-335, 2004.
- FREDRIKSSON, M. I. et al. Constitutionally hyperreactive neutrophils in periodontitis. *J Periodontol*, v. 74, n. 2, p. 219-224, Feb. 2003.

FREITAS, N.M. Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+3954), IL-1RN (íntron 2 VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva São Paulo, 2007. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

GAMONAL, J. *et al.* Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*, v. 71, n. 10, p. 1535-1545, Oct. 2000.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Modulation of immuneresponses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol*, p. 28-38, 1994.

GEMMELL, E.; MARHALL, R.I.; SEYMOUR, G.J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 14, n. 1, p. 112-143, Jun. 1997.

GEMMELL, E. *et al.* P. gingivalis-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. *J Dent Res*, v. 81, n. 5, p. 303-307, May. 2002.

GIANNOPOULOU, C.; KAMMA, J.J.; MOMBELLI, A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol*, v. 30, n. 2, p. 145-153, Feb. 2003.

GOLDSBY, R.A. *et al.* *Kuby immunology*. 4th.ed. New York: Ed. W.H. Freeman, 2000 xxv, 670 p. p.

GOMEZ, R.S.; DUTRA, W.O.; MOREIRA, P.R. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflamm. Res.*, v. 58, n. 10, p. 625-629, Oct. 2009.

GONZALES, J.R. *et al.* Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, v. 28, n. 6, p. 544-549, Jun. 2001.

GORE, E.A.; SANDERS, J.J.; PANDEY, J.P.; PALESCH, Y.; GALBRAITH, G.M. Interleukin-1_ +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 35, p. 781-5, 1998.

GOUTOUDI, P.; DIZA, E.; ARVANITIDOU, M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*, v. 32, n. 7, p. 511-520, Sep. 2004.

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. *J Periodontol*, v. 73, p. 231-47, 2002.

GRIFFITHS, G.S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, v. 31, n. p. 32-42, 2003.

GULLESTAD, L.; SEMB, A.G.; HOLT, E.; SKÅRDAL, R.; UELAND, T.; YNDESTAD, A. Effect of thalidomide in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*, v. 144, n. 5, p. 847-50, 2002.

GUSTAFSSON, A.; ASMAN, B.; BERGSTROM, K. Elastase and lactoferrin in gingival crevicular fluid: possible indicators of a granulocyte-associated specific host response. *J Periodontol Res*, v. 29, n. 4, p. 276-282, Jul. 1994.

HAFFAJEE, A.D. *et al.* Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, v. 24, n. 10, p. 767-776, Oct. 1997.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 5, n., p. 78-111, Jun. 1994.

HAJEER, A.H.; LAZARUS, M.; TURNER, D. MAGEED, R.A.; VENCOVSKY, J.; SINNOTT, P. *et al.* IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, v. 27, p. 142-5, 1998.

HASSELL, T.M.; HARRIS, E.L. Genetic influences in caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 6, n. 4, p. 319-342, 1995.

HOÇOYA, L.S.; JARDINI, M.A.N. Genetic polymorphism associated with periodontal disease in Brazilians: systematic review. *Rev Odontol*, UNESP, v. 39, n. 5, p. 305-310, 2010.

HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 28, p. 430-4, 2001.

HOLLA, L.O.; BUCKOVA, D.; FASSMANN, A. *et al.* Promoter polymorphisms in the CD 14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet*, v. 39, n. 11, p. 844-848, Nov. 1997.

HOLMLUND, A.; HANSTROM, L.; LERNER, U.H. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 6, p. 475-482, Jun. 2004.

HOREWICZ, V.V.; FURUSE, C.; ARAÚJO, V.C.; CURY, P.R. Susceptibilidade genética à periodontite crônica. *Revista de Periodontia*, v. 16, p. 15, 2006.

HOU, L.T.; LIU, C.M.; ROSSOMANDO, E.F. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, v. 22, n. 2, p. 162-167, Feb. 1995.

JIN, L. J. *et al.* Variations in crevicular fluid elastase levels in periodontitis patients on long-term maintenance. *Eur J Oral Sci*, v. 103, n. 2 (Pt 1), p. 84-89, Apr. 1995.

_____. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 29, n. 7, p. 604-614, Jul. 2002.

JIN, L.; SODER, B.; CORBET, E.F. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol*, v. 71, n. 6, p. 929-939, Jun. 2000.

JOHNSON, N.W. *et al.* Detection of high-risk groups and individuals for periodontal disease. Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. *J Clin Periodontol*, v. 15, p. 276-282, 1988.

KAMMA, J.J. *et al.* Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 10, p. 894-902, Oct. 2004.

KARGUL, J.; LAURENT, G.F. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, n.1, p.1, Jan. 2009.

KAUR, K.; SHARMA, A.K.; DHINGRA, S.; SINGRA, P.K. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, v. 41, n. 6, p. 1023-30, 2006.

KINANE, D.F.; HART, T.C. Gene and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 14, p. 430-49, 2003.

KINANE, D.F.; LAPPIN, D.F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*, v. 59, n. 3, p. 154-160, Jun. 2001.

KINANE, D.F.; SHIBA, H.; HART, T.C. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, v. 39, n. 1, p. 91-117, Oct. 2005.

KORNMAN, D.F.; CRANE, A.; WANG, H.Y.; Di GIOVINE, F.S.; NEWMAN, M.G.; PIRK, F.W. *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 24, p. 72-7, 1997.

KORNMAN, K.S.; Di GIOVINE, F.S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*, v. 3, p. 327-38, 1998.

KORNMAN, K.S. Dental implications of the human genome project. *CDA Journal*, v. 29, p. 35-47, 2001.

KORNMAN, K.S.; PAGE, R.C.; TONETTI, M.S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, v. 14, n. 1, p.33-53, Jun. 1997.

- LAMSTER, I.B. *et al.* The effect of tetracycline fiber therapy on beta-glucuronidase and interleukin-1 beta in crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, v. 23, n. 9, p. 816-822, Sep. 1996.
- LEE, E. *et al.* Potential role of vascular endothelial growth factor, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal diseases. *Kaohsiung J Med Sci*, v. 19, n. 8, p. 406-415, Aug. 2003.
- LEE, H.J. *et al.* The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 22, n. 11, p. 885-890, Nov. 1995.
- LEE, J.D.; RHOADES, K.; ECONOMOU, J.S. Interleukin-4 inhibits the expression of tumour necrosis factors alpha and beta, interleukins-1 beta and -6 and interferon-gamma. *Immunol Cell Biol*, v. 73, n. 1, p. 57-61, Feb. 1995.
- LEE, J.W. *et al.* Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol*, v. 74, n. 9, p. 1329-1335, Sep. 2003.
- LEWIN, B. *Genes VII*. Porto Alegre: Art Med, 2001.
- LINDHE, J.; NYMAN, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 11, n. 8, p. 504-514, Sep. 1984.
- LISTGARTEN, M.A.; SOCRANSKY, S.S. Electron Microscopy as an Aid in the Taxonomic Differentiation of Oral Spirochetes. *Arch Oral Biol*, v. 10, n., p. 127-138, Jan-Feb. 1965.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, v. 36, p. 177-87, 1965.
- LOE, 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. *J Clin Periodontol*, v. 13, n. 5, p. 431-445, May, 1986.
- LOTZ, M.; JIRIK, F.; KABOURIDIS, P.; TSOUKAS, C.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. *et al.* B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med*, v. 167, p. 1253-8, 1988.
- MALEFYT, R. Interleukin-10. In: MIRE-SLUIJ, A.; THORPE, R. (eds.). *Cytokines*. 2nd ed. London: Academic Press, 1999. p. 151-61.
- MALO, D.; SKAMENE, E. Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet*, v. 10, p. 365-371, 1994.
- MATHUR, A. *et al.* Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res*, v. 31, n. 7, p. 489-495, Oct. 1996.
- MENG, H. *et al.* Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, v. 43, n., p. 133-159, 2007.

MI, X.; ZENG, F. Hypomethylation of interleukin - 4 and - 6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Pharmacol*, v. 29, n. 1, p. 105-112, Jan. 2008.

MICHALOWICZ, B.S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, v. 65, (5 Suppl), p. 479-88, 1994.

MOMBELLI, A.; CASAGNI, F.; MADIANOS, P.N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*, v. 29, Suppl 3, n. p. 10-21; discussion 37-18. 2002.

MOORE K.; MALEFYT, R.; COFFMAN, R. O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MOREIRA, P.R.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O.; The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, v. 42, p. 23-30, 2007.

MOREIRA, P.R.; AS, A.R.de; XAVIER, G.M.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J. *et al.* A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, v. 40, p. 306-11, 2005.

MOREIRA, P.R.; LIMA, P.M.A.; SATHLER, K.O.B. *et al.* Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease In a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*, v. 148, p. 119-129, Apr. 2007.

MOREIRA, P.R. *Avaliação genotípica e fenotípica de moléculas envolvidas na resposta imuno-inflamatória em indivíduos com diferentes formas clínicas e gravidade da doença periodontal.* Belo Horizonte, 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular), - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

MUKAIDA, N. *et al.* Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol*, v. 36, n. 8, p. 773-789, 1992.

NEVINS M, Nevins ML. Genetic susceptibility to periodontal disease. *Dent Today*, v. 17, p. 94-9, 1998.

NEWMAN, M.G. *et al.* Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol*, v. 47, n. 7, p. 373-379, Jul. 1976.

NEWMAN, M.G.; SOCRANSKY, S.S. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res*, v. 12, n. 2, p. 120-128, Mar. 1977.

NILE, C.J.; READ, R.C., AKIL, M. *et al.* Methylation Status of a Single CpG Site in the IL6 Promoter is related to IL - 6 Messenger RNA Levels and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 9, p. 2686-2693, Sep. 2008.

OATES, T.W.; GRAVES, D.T.; COCHRAN, D.L. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 29, n. 2, p. 137-143, Feb. 2002.

OFFENBACHER, S. BARROS, S.P.; BECK, J.D. Rethink Periodontal Inflammation. *J Periodontol*, v. 79, n. 8, p. 1577-1584, Aug. 2008. Supplement.

OFFENBACHER, S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol*, v. 1, n. 1, p. 821-878, Nov. 1996.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 9, p. 248-66, 1998.

PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, v. 14, p. 9-11, 1997.

PALCANIS, K.G. *et al.* Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J Periodontol*, v. 63, n. 4, p. 237-242, Apr. 1992.

PALYS, M.D. *et al.* Relationship between C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and putative periodontal pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 25, n. 11, Pt 1, p. 865-871, Nov. 1998.

POTTER, R.H. Genetic studies of juvenile periodontitis. *J Dent Res*, v. 69, p. 94-94, 1991.

PRADEEP, A.R.; ROOPA, Y.; SWATI, P.P. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 6, p. 712-716, Dec. 2008.

PRESHAW, P.M. Host response modulation in periodontics. *Periodontol 2000*, v. 48, n., p. 92-110. 2008.

QUEIROS, A.C., TABA, M., O'CONNELL, P.A., NOBREGA, P.B., COSTA, P.P., KAWATA, V.K.S., TREVISAN, G.L., NOVAES, A.B., SOUZA, S.L.S., PALIOTO, D.B., GRISI, M.F.M. Inflammation markers in healthy and periodontitis patients. Preliminary data screening. *Braz Dent J*, v. 19, n. 1, 2008, p. 3-8.

REINHARDT, R.A. *et al.* IL-1 in gingival crevicular fluid following closed root planing and papillary flap debridement. *J Clin Periodontol*, v. 20, n. 7, p. 514-519, Aug. 1993.

RENZONI, E.; LYMPANY, P.; SESTINI, P.; PANTELIDIS, P.; WELLS, A.; BLACK, C. *et al.* Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR2 genes in systemic sclerosis and crytogenic fibrosingalveolitis. *Arthr Rheum*, v. 43, p. 1633-40, 2000.

SALVI, G.E.; LANG, N.P. Host response modulation in the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 32 (Suppl 6), p. 108-29, 2005.

SALVI, G.E. *et al.* Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res*, v. 33, n. 4, p. 212-225, May, 1998.

SANZ, M. *et al.* Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 12, p. 1034-1047, Dec. 2004.

SCHACHER, B. *et al.* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J. Clin Periodontol*, v. 34, n. 7, p. 566-573, Jul. 2007.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L.; ARLEQUIN, V.E.R.A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva: Switzerland, 2000.

SEYMOUR, G. J. *et al.* Interleukin-2 production and bone-resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. *Arch Oral Biol*, v. 30, n. 6, p. 481-484, 1985.

SEYMOUR, G.J.; GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*, v. 59, n. 3, p. 167-173, Jun. 2001.

SHAPIRA, L.; VAN DYKE, T.E.; HART, T.C. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*, v. 39, n. 4, p. 319-322, Dec. 1992.

SLOTS, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*, v. 84, n. 1, p. 1-10, Jan. 1976.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT, R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, v. 25, p. 134-44, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*, v. 5, n., p. 7-25, Jun. 1994.

_____. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, v. 17, n. 4, p. 788-792, Oct. 1994.

_____. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*, v. 18, n. 10, p. 766-775, Nov. 1991.

_____. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol*, v. 2, n. 1, p. 3-10, Mar. 1997.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol*, v. 63, n. 4, p. 322-331, Apr. 1992. Supplement.

SODER, B. *et al.* Levels of matrix metalloproteinases-8 and -9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood. *J Periodontal Res*, v. 41, n. 5, p. 411-417, Oct. 2006.

SOUZA, E.L.B. de; LOPES, J.C.A.; GASPAR JUNIOR, A.A.; SILVA, K.L.M.; SILVA, A.R.S.; SILVA, E.F.; GASPAR, G.S. *International Journal of Dentistry*, Recife, v. 1, n. 2, p. 00-00, abr./jun. 2006.

STASHENKO, P.*et al.* Levels of interleukin-1b in tissue from sites of active periodontal disease. *J Periodontol*, v. 18, p. 548-554, 1991.

STRACHAN, T.R.A. *Genética molecular humana*. 2. ed. Porto Alegre: Art Med, 2002.

SUZUKI, M. *et al.* Soluble interleukin-1 receptor type II levels in gingival crevicular fluid in aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol*, v. 79, n. 3, p. 495-500, Mar. 2008.

TANNER, A. C. *et al.* A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, v. 6, n. 5, p. 278-307, Oct. 1979.

TAMURA, M.; TOKUDA, M.; NAGAOKA, S.; TAKADA, H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun*, v. 60, 1992, p. 4932-7.

TANNER, A. *et al.* Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 25, n. 2, p. 85-98, Feb. 1998.

TAYLOR, J.J.; PRESHAW, P.M.; DONALDSON, P.T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 35, p. 158-82, 2011.

TE VELDE, A.A. *et al.* Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, v. 76, n. 7, p. 1392-1397, Oct. 1990.

TELES, R.P. *et al.* Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol*, v. 80, n. 3, p. 447-456, Mar. 2009.

TENG, Y.T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun*, v. 70, n. 9, p. 5269-5273, Sep. 2002.

TERNOVEN, T.; RAUNIO, T.; *et al.* Polymorphisms in the CD-4 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 34, n. 5, p. 377-383, May, 2007

TERRY, C.F.; LOUKACI. V.; GREEN, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*, v. 275, p. 18138-44, 2000.

TOKER, H.; POYRAZ, O.; EREN, K. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 35, n. 6, p. 507-513, Jun. 2008.

TONETTI, M.S.; CLAFFEY, N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*, v. 32 (Suppl 6), p. 210-3, 2005.

TOST, J. DNA Methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol*, v.44, n. 1, p. 71-81, Jan. 2010.

TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO, R.B. Jr de, SOUZA, A.P. de; LINE, S.R. Polymorphism at position - 174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 438-42, 2003.

TSAI, C.C. *et al.* Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci*, v. 23, n. 1, p. 1-7, Jan. 2007.

TSAI, C.C.; HO, Y.P.; CHEN, C.C. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*, v. 66, n. 10, p. 852-859, Oct. 1995.

VAN DYKE, T.E.; VAIKUNTAM, J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol*, p. 19-27, 1994.

WINDERS, B.R.; SCHWARTZ, R.H.; BRUNIQUÉL, D.A. A distinct region of the murine INF-promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naive and Th1 cell differentiation, but is hypermethylation in Th2 cells. *J Immunol*, v. 173, n. 12, p. 7377-7384, Dec. 2004

XIMENEZ-FYVIE, L.A. *et al.* Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol*, v. 77, n. 3, p. 460-471, Mar. 2006.

YAMAOKA, M.; YAMAGUCHI, S.; OKUYAMA, M.; TOMOIKE, H. Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure: behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor-alpha. *Jpn Circ J*, v. 63, n. 12, p. 951-6, 1999.

YAMAZAKI, K.; TABETA, K.; NAKAJIMA, T. *et al.* Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 28, n. 9, p. 828-32, 2001.

YOSHIMURA, A. *et al.* Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*, v. 32, n. 3, p. 279-286, Apr. 1997.

ZHANG, J.; KASHKET, S.; LINGSTROM, P. Evidence for the early onset of gingival inflammation following short-term plaque accumulation. *J Clin Periodontol*, v. 29, n. 12, p. 1082-1085, Dec. 2002.

ANEXO

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

O (a) Senhor (a) doadores de sangue periférico. Serão formados dois grupos: pacientes com periodontite (em sua fase ativa) e pacientes sem periodontite (grupo controle). Das células de sangue será extraído o DNA para a pesquisa do fator genético. 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 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.

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 freqüente 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.

Senhor (a) voluntário terá toda garantia de acompanhamento e assistência caso necessite durante o período do estudo, tendo a liberdade em recusar-se 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.

Declaro ter sido suficientemente esclarecido sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Estou ciente de que todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e os dados colhidos serão utilizados somente para fins científicos. Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido durante o atendimento neste Serviço.

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 / /
