



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM GENÉTICA

**Avaliação do SNP *rs1143634* (+3954) do gene *IL1B*  
em indivíduos com a doença periodontal crônica**

JOÃO ANTONIO XAVIER MANSO

Goiânia  
2015



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM GENÉTICA

**Avaliação do SNP *rs1143634 (+3954)* do gene *IL1B*  
em indivíduos com a doença periodontal crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientando: João Antonio Xavier Manso  
Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva  
Co-Orientador: Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

Goiânia

2015

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Manso, João Antonio Xavier.

M289a Avaliação do snp *rs1143634* (+3954) do gene *IL1B* em indivíduos com a doença periodontal crônica [manuscrito] / João Antonio Xavier Manso – Goiânia, 2015.  
49 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Genética, 2015.

“Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva”.

Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Polimorfismo (Genética). I. Título.

CDU 575:616.314(043)

**ATA COMPLEMENTAR Nº 101/2015**

**MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

**DISCENTE: JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO**

**DEFENDIDA EM 30 DE MARÇO DE 2015 E Aprovado COM CONCEITO..... A**

O título foi alterado  não ( ) sim \_\_\_\_\_

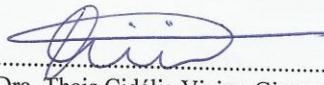
**BANCA EXAMINADORA**



.....  
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva  
(presidente-orientador)



.....  
Prof. Dra. Lysa Bernardes Minasi / PUC Goiás  
(membro interno)



.....  
Prof. Dra. Thais Cidália Vieira Gigonzac / UEG  
(membro externo)

Não só isso, mas também nos gloriamos nas tribulações, porque sabemos que a tribulação produz perseverança; a perseverança, um caráter aprovado; e o caráter aprovado, esperança.

Rm 5.3-4, Bíblia Sagrada NVI

Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Sr. Antonio Gonçalves Manso Filho e  
Sra. Edna Souza Xavier Manso.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por sua presença constante, pela graça de chegar até aqui e pela experiência adquirida;

Aos meus queridos pais, Sr. Antonio Gonçalves Manso Filho e Sra. Edna Souza Xavier Manso, que renunciaram seus sonhos e vontades em benefício do futuro dos filhos. Agradeço por me ensinarem o caminho que eu devo andar, pelo grande exemplo de dignidade e decência, pelo amor e incentivo constante;

Aos meus irmãos Hellen Xavier Manso e Guilherme Xavier Manso, pelo carinho e descontração, que me ajuda a viver de maneira mais leve e alegre;

À minha querida namorada, Jessica Porto Gonçalves, por sua companhia serena e carinhosa, que me conforta durante as angustias e me ensina a ter calma diante das adversidades;

Ao meu orientador Dr. Cláudio Carlos da Silva, quem eu admiro, por sua competência, paciência, disposição e bom humor. Agradeço pelos conselhos, correções e sugestões, às quais foram de grande valia para este estudo;

Ao Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D., meu co-orientador, pessoa a qual também admiro, por sua humanidade, presteza e competência. Agradeço por suas sugestões, ensinamentos e pela valiosa ajuda com a análise dos dados;

Aos alunos, estagiários, professores e técnicos do Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR), em especial; Lilian de Souza Teodoro, Gustavo Rios Nascimento, Thiago Athayde Leite, Aldaires Vieira de Melo, Fernanda Ribeiro Godoy, M.Sc. e Fernanda Craveiro Franco, M.Sc., pela contribuição no desenvolvimento e otimização metodológica;

Aos voluntários que se dispuseram a participar deste estudo, submetendo-se aos procedimentos necessários, e deste modo, contribuindo diretamente para esta pesquisa;

Ao Prof. Raimundo Lima da Silva Junior, M.Sc., por sua grande ajuda com a análise estatística dos dados;

Ao coordenador do projeto, Prof. Renato Hannum, M.Sc., o qual além de ser responsável pela iniciativa desta pesquisa, também colaborou nas etapas de triagem dos pacientes e na realização do periograma;

À Profa. Caroline Oliveira Araújo Melo, M.Sc., pela gentileza prestada na confecção do *Abstract* e demais contribuições;

Às Professoras, Dra. Thaís Cidália Vieira Gigonzac, Dra. Lysa Bernardes Minasi e Dra. Flávia Melo Rodrigues, por suas sugestões e correções, às quais aprimoram este produto final;

Aos jovens da mocidade da Igreja Cristã Evangélica Central, pela amizade, comunhão e oração;

Aos meus amigos, Danillo Maiko Araujo, Regiane Machado, Henrique dos Santos Costa, Carlos Roberto Ferreira Perillo Júnior, Vitor Moura Silva, Eduardo Moura Silva, Victor Ferreira Araújo e Maurício Torres, pelo apoio e motivação;

Aos alunos Douglas Dantas Rodrigues, Marcelo Regis da Silva Filho, João Paulo Costa Lima, Nicolas Gustavo Matias de Oliveira, pela amizade, companhia e descontração;

Aos pesquisadores, Prof. Alex Silva da Cruz, M.Sc., Damiana Mírian da Cruz e Cunha, M.Sc. e Irene Plaza Pinto M.Sc., pela amizade, conselho e incentivo;

Aos Funcionários da PUC-Goiás, Eduardo Rocha Pedrosa, Esp. (NPR) e Alessandra Malta de Oliveira (MGENE), pela prontidão e disposição em ajudar os alunos do NPR e do MGENE respectivamente;

A todos os professores, funcionários e demais alunos do programa de Mestrado em Genética da PUC-Goiás que durante estes dois anos e três meses me apoiaram, incentivaram, ajudaram e ensinaram;

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás, por disponibilizar os equipamentos e o espaço para o desenvolvimento deste estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado, que permitiu que eu realizasse o curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG, pelo financiamento desta pesquisa.

## RESUMO

Dentre os diversos problemas que atingem a saúde bucal, a doença periodontal crônica é a que mais acomete as populações, alcançando proporções globais. Caracteriza-se por ser uma patogenia multifatorial, havendo em sua progressão, eventos de inflamação e destruição dos tecidos de proteção e sustentação dos elementos dentários. Muitos dos fatores que condicionam a severidade da doença ainda não são compreendidos, estando possivelmente relacionados com aspectos genéticos. A interleucina 1 $\beta$  é uma citocina mediadora da resposta inflamatória e contribui na patogênese da doença periodontal crônica, a qual é caracterizada por processos de reabsorção óssea. Acredita-se que os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem estar associados com a progressão e severidade da doença, demonstrando fenótipos discriminativos. O objetivo desse estudo foi investigar a relação do SNP *rs1143634* posição +3954 C/T do gene *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) com a doença periodontal crônica. No presente estudo, foram avaliados 51 indivíduos, divididos em dois grupos, 26 com doença periodontal crônica e 25 saudáveis. As amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa e armazenadas em tubos com EDTA para a extração do DNA a partir do sangue total. O DNA extraído foi submetido à técnica de PCR para amplificação da região de interesse, sendo posteriormente tratado com a enzima de restrição específica para clivagem e obtenção dos fragmentos visando a genotipagem. Os dados obtidos foram submetidos, inicialmente ao teste de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e posteriormente a outros testes, como o *Qui-Quadrado*, *Odds ratio* e *Risco Relativo*, sendo todos a 5% de significância. Os genótipos se demonstraram em concordância com a hipótese de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) referentes à distribuição genotípica e alélica entre os grupos. A presença do alelo C referente ao polimorfismo *rs1143634* reduz significativamente ( $p<0,05$ ) o risco relativo, principalmente em homens, enquanto que o alelo T aumenta o risco para doença periodontal crônica.

Palavras-Chave: Periodontite. Genética. Polimorfismo. Suscetibilidade. Citocina

## ABSTRACT

Among the many problems that affect oral health, chronic periodontal disease is the most commonly that affects populations, reaching global proportions. It is characterized by a multifactorial pathogenesis presenting, in its progression, inflammation events and destruction of protective and supporting tissues of dental elements. Interleukin-1 $\beta$  is a cytokine mediator of inflammatory response and contributes to the pathogenesis of chronic periodontal disease, which is characterized by bone resorption process. It is believed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) may be associated with the progression and severity of the disease, showing discriminative phenotypes. The aim of this study was to investigate the relationship of SNP *rs1143634* position +3954 C/T of *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) gene with chronic periodontal disease. In the present study, we evaluated 51 individuals, divided into two groups, 26 individuals with chronic periodontal disease and 25 healthy individuals. Blood samples were obtained by venipuncture and stored in tubes with EDTA for DNA extraction from whole blood. The extracted DNA was subjected to PCR technique to amplify the region of interest, and subsequently treated with specific restriction enzyme for cleavage and achievement of fragments aiming genotyping. The data were submitted initially to the Hardy-Weinberg equilibrium Test and then the other tests, such as *Chi-Square*, *Odds Ratio* and *Relative Risk*, all of the 5% significance level. The genotypes were demonstrated in agreement with the hypothesis of *Hardy-Weinberg* equilibrium. No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) concerning the genotype distribution and allele between groups. The presence of the C allele polymorphism *rs1443634* referring to reduce significantly ( $p < 0.05$ ) relative risk, especially in males, while the T allele increases the risk of chronic periodontal disease.

Keywords: Periodontitis. Genetics. Polymorphism. Susceptibility. Cytokine

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Perfil da restrição do *amplicon* (194 pb) do gene *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) 21 utilizando um marcador molecular de 100 pb (1) e um controle negativo (12). Os indivíduos homozigotos para o alelo C (5, 6, 7, 8, 11) apresentam três fragmentos de restrição: 97, 85 e 12 pb. Os indivíduos heterozigotos (2, 3, 4, 9, 10) apresentam quatro fragmentos de restrição: 182, 97, 85 e 12 pb. Na imagem não se observa o fragmento de 12 pb.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do gene <i>IL1B</i> , Goiânia, Goiás, 2015.	18
<b>Tabela 2 -</b>	Componentes da reação de PCR, volume e concentração final na mistura, Goiânia, Goiás, 2015.	19
<b>Tabela 3 -</b>	Condições de termociclagem, utilizadas na reação de PCR para a amplificação da região de interesse, Goiânia, Goiás, 2015.	19
<b>Tabela 4 -</b>	Componentes da reação de RFLP, volumes e concentrações finais, Goiânia, Goiás, 2015.	21
<b>Tabela 5 -</b>	Frequência entre sexos, média de idade e frequência dos níveis de severidade referente aos grupos caso e controle, Goiânia, Goiás, 2015.	23
<b>Tabela 6 -</b>	Análise inferencial da frequência alélica entre os grupos caso e controle e o valor de $p$ obtido por meio teste $\chi^2$ , Goiânia, Goiás, 2015.	23
<b>Tabela 7 -</b>	Análise da distribuição dos genótipos nos grupos estudados e valor de $p$ obtido através do $\chi^2$ , Goiânia, Goiás, 2015.	24
<b>Tabela 8 -</b>	Análise da frequência alélica segundo a presença do alelo de risco T ( <i>rs1143634</i> ) em pacientes caso e controle, Goiânia, Goiás, 2015.	25
<b>Tabela 9 -</b>	Análise da relação da frequência alélica entre pacientes caso e controle, segundo o teste de <i>Risco Relativo</i> , Goiânia, Goiás, 2015.	25
<b>Tabela 10 -</b>	Análise comparativa entre os sexos referente ao grupo caso, segundo a análise de <i>Risco Relativo</i> , Goiânia, Goiás, 2015.	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
DPC	Doença Periodontal Crônica
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
GM-CSF	Do Inglês, <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating fator</i> - Fator estimulador de colônia granulócito macrófago
IC	Intervalo de Confiança
IL- 10	Interleucina 10
IL-1	Interleucina 1
<i>IL1A</i>	Gene da Interleucina 1 <i>Alfa</i>
<i>IL1B</i>	Gene da Interleucina 1 <i>Beta</i>
IL-1F	Familia da Interleucina 1
IL-1Ra	Interleucina 1 Receptor Antagonista
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 <i>Alfa</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 <i>Beta</i>
IL-6	Interleucina 6
INF- $\gamma$	Interferon <i>Gama</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Do Inglês, <i>Macrophage Colony-Stimulating</i> - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos
MMPS	Do Inglês, <i>Matrix Metalloproteinases</i> - Metaloproteinases de Matriz
mRNA	Do Inglês, <i>Messenger RNA</i> - RNA Mensageiro
NF- $\kappa$ B	Do Inglês - <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i> - Fator Nuclear <i>Kappa</i> de Cadeia Leve Potenciador de Células B Ativadas
NPR	Núcleo de Pesquisas <i>Replicon</i>

OPG	Osteoprotegerina
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAMPs	Do Inglês, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> - Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Do Inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reacção em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PGH	Projeto Genoma Humano
PTH	Paratormônio ou Hormônio da Paratireoide
PUC-Goiás	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
RANK	Do Inglês, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i> - Receptor Ativador do Fator Nuclear <i>Kappa-B</i>
RANKL	Do Inglês, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B ligand</i> - Receptor Ativador do Fator Nuclear <i>Kappa-B</i> ligante
RAR	Redução Absoluta do Risco
RFLP	Do Inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RR	Risco Relativo
SNP	Do Inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T	Timina
TBE	Tris Borato de EDTA
TGF- $\beta$	Do Inglês, <i>Transforming Growth Factor Beta</i> - Fator de Transformação do Crescimento <i>Beta</i>
TLR	Do Inglês, <i>Toll-like Receptors</i> - Receptores do Tipo <i>Toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral <i>Alfa</i>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>2 .1 Doença Periodontal .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Patogênese da Doença Periodontal .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Interleucina 1<math>\beta</math>.....</b>	<b>10</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Grupo Amostral.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Amostras biológicas, Extração e Quantificação do DNA .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 Reação de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição).....</b>	<b>20</b>
<b>4.5 Análise Estatística .....</b>	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>9 APÊNDICES .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Durante o período em que ocorria o Projeto Genoma Humano (PGH), os pesquisadores idealizaram como meta a identificação dos genes responsáveis pelas características normais e patológicas dos seres humanos. Ao longo desse projeto, aconteceram diversos estudos investigativos, os quais avaliaram associações entre características fenotípicas e o perfil genético individual. Aspectos como o comportamento, suscetibilidade a doenças, aptidões físicas entre outros, foram analisados, havendo constatações positivas, negativas e indiferentes em se tratando da qualidade de vida das pessoas (FERRARIS, 2015; WHITFIELD, MCCLEARN, 2005; SANKAR et al., 2004; DI FIORE, 2003; ZATZ, 2000; BOUCHARD et al., 1999; WOOD, 1998; LEVY-LAHAD, BIRD, 1996).

O PGH juntamente com outros projetos, contribuiu para o entendimento inicial do genoma humano por meio da caracterização de aspectos fundamentais, introduzindo a perspectiva de que a compreensão elementar da estrutura e função dos genes seria a base para um melhor entendimento das doenças, e assim colaborando no desenvolvimento de testes de suscetibilidade para a avaliação de genes associados a doenças e estratégias melhores de tratamento (HYMAN, 2011; KINANE, HART, 2003; VARMUS, 2002).

A realização do PGH colaborou para o surgimento de uma nova era na medicina, a qual se caracteriza por apresentar um papel mais preventivo do que curativo, tendo início a medicina genômica. Neste contexto os métodos genéticos preventivos apresentaram um papel relevante, mediante o *screening* de mutações de um indivíduo, possibilitando o conhecimento dos riscos específicos de desenvolver patologias peculiares no futuro (ALCÁNTARA, 2004).

No decorrer dos últimos anos, os grupos de pesquisadores em genética e genômica voltaram suas atenções para o entendimento dos mecanismos de doenças comuns, uma vez que estas possuem uma ampla inserção na área da saúde. Estes distúrbios comuns distinguem-se por diversas maneiras, havendo casos que existem influências de mutações na linhagem germinativa em um único gene, constituindo então os subtipos monogênicos. Todavia, existem casos de doenças comuns que possuem uma etiologia multifatorial, envolvendo participação

de vários genes e fatores ambientais, ocorrendo interações gênicas (entre genes) e/ou em meio ao ambiente e os genes (BECKER et al., 2011).

Segundo Hirschhorn e colaboradores (2002) há diversos fatores genéticos e ambientais que influenciam no risco de afecção de indivíduos para doenças comuns, das quais consistem as doenças cardíacas, diabetes, hipertensão e câncer.

A doença periodontal (DP) caracteriza-se pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, as quais promovem a perda progressiva de inserção conjuntiva. É conceituada como uma das doenças crônicas mais comuns nas populações e considerada, mediante a grande quantidade de evidências, associada ao aumento do risco de mortalidade em populações, constituindo um fator de risco agravante para uma diversidade de enfermidades, como as doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, cânceres, doença de Alzheimer, obesidade, diabetes, doença renal e osteoporose (PRESHAW et al., 2012; DEWITTE, 2012; SURESH, 2011; DURSUN et al., 2011; PRESHAW, 2009; PIHLSTROM et al., 2005).

Diversas doenças orais, incluindo, cárie dental e doença periodontal, compõem a um relevante problema de saúde em escala global, e mesmo perante essas constatações, verifica-se que as decisões sobre os cuidados da saúde, incluindo o da saúde bucal, ainda são realizadas na ausência de uma base sólida de evidências de pesquisa (WILLIAMS, 2014; PANG, TERRY, 2011).

A comunidade científica ainda não demonstra completo entendimento sobre a etiologia da periodontite crônica, admitindo as bactérias como o agente causador primário, porém, percebendo que a suscetibilidade as doenças infecciosas, depende de um nível variável de fatores genéticos do hospedeiro (DOWSETT et al., 2002).

Michalowicz e colaboradores (2000) relatam que a herança genética individual e os fatores ambientais influenciam na patogênese da doença periodontal crônica (DPC), atribuindo que aproximadamente metade da variação da DP pode estar relacionada aos fatores genéticos.

De acordo com Kinane e colaboradores (2005), a maior parte das doenças, incluindo a periodontite possui uma base genética, sendo que a elucidação deste fundamento é importante para uma melhor compreensão da etiologia da doença, que por sua vez, contribuiria em aspectos como o diagnóstico, tratamento e classificação. Em vista disso, muito se tem feito para identificar os polimorfismos de genes associados ao risco para o desenvolvimento das doenças periodontais, visto

o aumento de publicações que relatam a associação entre polimorfismos genéticos e a DP, embora as limitações desses estudos não sejam amplamente reconhecidas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doença Periodontal

As doenças periodontais compreendem um grupo de enfermidades inflamatórias comuns de origem infecciosa, incluindo gengivite e periodontite acometendo mais de 30% da população humana. Essas inflamações são causadas pelo acúmulo da placa bacteriana na região do sulco gengival, acompanhada da resposta imunológica do indivíduo, caracterizando-se como gengivite. Em indivíduos suscetíveis, esta situação poderá progredir para condição inflamatória crônica destrutiva denominada periodontite (PRESHAW et al., 2012; HUGOSON, NORDERYD, 2008; PIHLSTROM et al., 2005; KINANE, HART, 2003; SOCRANSKY, HAFFAJEE, 1992).

Elaborada em 1999 a atual classificação das doenças periodontais, apresentou o acréscimo de novas categorias como, o exemplo das doenças gengivais (gengivites) havendo, a exclusão de algumas que se sobrepunham e renomeação de outras, como no caso da “Periodontite do Adulto” que passou a ser “Periodontite Crônica”, tal qual exibe três níveis de severidade (leve, moderada, severa) (CASTRO, DUARTE, 2002).

A gengivite caracteriza-se pela presença de edema, vermelhidão, sangramento (a sondagem), alterações no contorno e na consistência da gengiva. Na periodontite, verifica-se a possibilidade da destruição dos tecidos de suporte do dente (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar), podendo haver perda de inserção e formação de bolsa periodontal. Em situações raras, o agravamento da condição leve da DP (gengivite) poderá progredir para conformação crônica destrutiva (PRESHAW et al., 2012; LAPP et al., 2003; KINANE, HART, 2003).

Segundo Hannum (2011), as doenças periodontais consistem em processos infecciosos recorrentes, caracterizados pelo aprofundamento do sulco gengival mediante o desprendimento apical do epitélio juncional, ocorrendo à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar.

Entre os adultos a DPC tem se evidenciado como um problema expressivo de saúde pública, sendo muito mais prevalente do que se esperava. Na população dos

EUA, foi observada uma prevalência de 47% para indivíduos com mais de 30 anos, e 64% para indivíduos acima de 65 anos com DPC moderada a grave. Nos países em desenvolvimento, dados de boa qualidade ainda são escassos, embora seja plausível assumir que os resultados sejam no mínimo mais elevados do que os obtidos nos países desenvolvidos, considerando que a higiene oral adequada em geral seja menos acessível em países em desenvolvimento (WILLIAMS, 2014; EKE et al., 2012).

Segundo a Organização mundial da saúde (2012) 15-20% dos adultos de meia idade (35-44 anos) apresentam a DPC severa. Estima-se que 25% da população norte americana com idade superior a 60 anos percam os seus dentes (endentulismo), sendo metade por consequência da DP (BELTRÁN-AGUILAR et al., 2005). No Brasil, os resultados da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (2010) reportam que o percentual de indivíduos que não apresentam DP é de 68% para a idade de 12 anos, 51% entre 15 e 19 anos, 17% para adultos de 35 a 44 anos e apenas 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos.

Araujo e Sukekava (2007) relatam em uma revisão epidemiológica que a prevalência de doenças periodontais é alta em países da América Latina, embora exista uma carência de dados que descrevem o perfil de dominância da doença com exatidão, uma vez que o emprego de modelos de diagnósticos simplificados por parte de algumas pesquisas tem subestimado a prevalência da DP, gerando resultados díspares entre os estudos.

Apesar da alta prevalência, denota-se que as populações podem apresentar um nível de conhecimento razoável sobre as doenças periodontais, que por sua vez, é fundamental em se tratando de aspectos motivacionais relacionados às decisões que envolvem o tratamento e os hábitos de vida. Contudo, a tomada de consciência ainda é limitada, visto que a capacidade de autodiagnóstico, ainda é uma realidade distante (MARIN et al., 2012).

Um fator desencadeador da patologia é a formação do biofilme, o qual é decorrente do acúmulo e metabolismo de bactérias sobre os elementos dentários (LINDHE, 2005). A presença da placa bacteriana (biofilme) caracteriza-se também pela liberação de lipopolissacarídeos (endotoxinas), os quais estimulam a formação de citocinas e Proteínas C-Reativas que atuam na resposta imediata do organismo a

algum tipo de agressão, desencadeando assim em um evento inflamatório (LOOS, 2000).

Arora (2014) descreve a DPC como um fenômeno complexo de etiologia microbiana envolvendo múltiplos fatores, como as características genéticas e as condições de higiene bucal.

Diversas condições sistêmicas e alterações no sistema imunológico também podem estar relacionadas com o aparecimento de modificações periodontais, que compreendem desde inflamações gengivais, até manifestações mais destrutivas como a periodontite agressiva (VIEIRA et al., 2010)

As particularidades do biofilme, a resposta imunológica e os diversos fatores individuais, como hábitos de vida e condições sistêmicas, podem intervir no andamento da DP. Aspectos sintomatológicos semelhantes entre os indivíduos, seguidos de respostas diferentes aos modelos terapêuticos empregados, sugerem a interferência de elementos genéticos e epigenéticos no desfecho da doença (OFFENBACHER et al., 2008).

Em doenças inflamatórias crônicas, as citocinas parecem realizar um papel central, onde os polimorfismos de nucleotídeo único, para genes que codificam citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) são potenciais candidatos para a modulação destas condições (TRIFUNOVIĆ et al., 2015; OIKONOMOU et al., 2014; LANGE et al., 2006; KORNMAN et al., 1997).

Lang e colaboradores (2000) afirmam que a interleucina 1 (IL-1) apresenta funções relevantes em diversas doenças crônicas, atuando na ativação de outras citocinas, na expressão de moléculas de adesão que auxiliam a migração de leucócitos nos tecidos e na estimulação frequente da reabsorção óssea osteoclástica.

Variantes genéticas na sequência de bases nucleotídicas ocorrem em uma frequência maior que 1% na população. Os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNPs) consistem na variação de uma única base nitrogenada ou nucleotídeo em um sítio particular (THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012; TAYLOR et al., 2004).

Os SNPs podem causar alterações no código genético, o qual consiste na relação da sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a proteína correspondente, e assim, a modificação do genótipo pode interferir no fenótipo,

quando se tem transformações na função proteica. Essas alterações podem ter influência no nível de secreção de substâncias, gerando variações na resposta imunológica frente a uma contaminação bacteriana (HE et al., 2014; KORNMAN, DI GIOVINE, 1998).

Portanto, compreende-se que a variação genética pode exercer influência na resposta inata, inflamatória e imunológica em diferentes populações acometidas por infecções microbianas, e deste modo, colaborando para a susceptibilidade genética para DP. Estudos avaliativos da relação de eficácia para os SNPs de citocinas e a periodontite têm sido realizados; havendo resultados que indicaram efeito positivo e outros que mostraram nenhuma relação (EBADIAN et al., 2013).

Alguns aspectos relacionados ao aparecimento e desenvolvimento da DP ainda são desconhecidos, sendo do ponto de vista genético não muito estudados. Todavia, existem trabalhos publicados indicando a existência de uma relação entre a ocorrência da DP com a suscetibilidade genética individual (LAINE et al., 2013; HENNIG, PARKHILL, 2000; GORE et al., 1998; KORNMAN et al., 1997).

## 2.2 Patogênese da Doença Periodontal

Inicialmente, as periodontites crônicas manifestam-se por meio de inflamações gengivais e *a posteriori*, pela formação de bolsas periodontais, as quais causam o crescimento e desenvolvimento de bactérias Gram negativas como; *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre outras, que por sua vez conduzem às infecções bucais crônicas atingindo a superfície das unidades dentárias e dos tecidos adjacentes (SOCRANSKY, HAFFAJEE, 2005).

Durante os processos inflamatórios, verifica-se o aparecimento de citocinas as quais compreende a um aspecto importante na atividade imunológica, mostrando-se como um parâmetro em potencial, devido a maior concentração desses mediadores nos fluidos gengivais e no periodonto de indivíduos doentes (EBADIAN et al., 2013).

A presença de mediadores inflamatórios na microflora periodontal é o reflexo de uma grande concentração bacteriana, e, por fim associadas com a liberação de lipopolissacarídeos (LPS) de suas membranas externas Gram negativas (VIEIRA,

2014). Loos e colaboradores (2000) afirmam que os LPS induzem a liberação de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) que desencadeiam os processos inflamatórios.

A presença do biofilme aponta o comparecimento de bactérias, e a consequente produção de LPS, que ativa as células a produzirem citocinas como a IL-1, gerando respostas inflamatórias ativadoras de pré-clastos, promovendo o acionamento de osteoclastos, os quais farão a reabsorção do tecido ósseo e poderá gerar a perda do elemento dentário (TREVILATTO et al., 2011; ROSKAMP et al., 2006).

O processo de reabsorção dos dentes ocorre de forma parecida com a dos ossos, podendo ser por consequência de eventos inflamatórios no local, como também, através da remodelação que acontece ao longo da vida. A reabsorção é realizada principalmente por osteoclastos, mas também tem sido relatada em outras células: como os monócitos, macrófagos e osteócitos (GUNRAJ, 1999).

Nascimento e colaboradores (2006) descrevem o processo de reabsorção como resultado da interação entre células tipo clasto com os fatores moduladores da resposta imune, sobrevivendo de células inflamatórias e hormônios sistêmicos como: esteroides sexuais e o paratormônio (PTH).

Fatores como as baixas tensões de O<sub>2</sub>, acidez do meio, citocinas inflamatórias e derivadas dos blastos, tais como fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral *Alfa* (TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas E2 (PGE2), osteopontina, proteases e endotoxinas de origem bacteriana atuam como reguladores locais ativadores da reabsorção óssea (NASCIMENTO et al., 2006).

O osteoclasto é uma célula do tecido ósseo, volumosa e multinucleada possuindo em média 10 a 20 núcleos por célula, localizando-se em contato com a matriz do tecido ósseo, apresentando dobras (“bordas em escova”) na região de contato. Esta célula é capaz de sintetizar enzimas lisossomais como: fosfatase ácida tartarato resistente, cisteína-proteinases e entre outras não lisossomais como a colagenase, anidrase carbônica tipo II e algumas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) (ANDERSEN et al., 2004; RAMALHO et al. 2000).

O processo de diferenciação do osteoclasto envolve a participação de muitos componentes, havendo a colaboração de pré-clastos (linhagem monocítica-

macrofágica), células estromais e/ou osteoblastos para o suporte físico, produção de fatores de membrana solúveis, citocinas para a diferenciação e proliferação como o M-CSF e a proteína RANKL (*receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand*) a qual se liga no receptor RANK (*receptor activator of nuclear factor Kappa-B*) da célula precursora induzindo a formação do osteoclasto (GUNRAJ, 1999; YASUDA et al., 1998; SUDA et al., 1995; KODAMA et al., 1991).

Durante os processos de defesa do hospedeiro, uma família de receptores transmembrânicos para patógenos, denominado de *Toll- Like* (TLR), são essenciais para a identificação dos LPS, devido a uma capacidade de reconhecimento para *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). Os TLRs reconhecem os PAMPs e induzem a expressão de genes importantes para a defesa do hospedeiro, incluindo citocinas ligadas ao sistema imunológico inflamatório e adaptativo (TAKEDA et al., 2003).

As moléculas inflamatórias serão expressas através de uma cascata de sinalização envolvendo LPS, TLRs e complexos proteicos, que por sua vez iniciaram a ativação de um sinal transmembranico (transdução de sinal) indutor de NF-  $\kappa$ B que atuará como fator de transcrição de moléculas inflamatórias (SÉFORA-SOUSA, ANGELIS-PEREIRA, 2013; JURK et al., 2002).

Com o advento da inflamação coexistem diversos moduladores imunológicos, os quais estão associados com a migração e exsudação de células fagocitárias no epitélio juncional e no sulco gengival (TENG, 2003).

Dinarello (2005) descreve que a produção da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ocorre por meio de macrófagos em uma via não clássica de secreção de proteínas, a qual os receptores agonistas TLR, tal como os LPS iniciam a síntese do precursor inativo de IL-1 $\beta$ , que é processado pela caspase-1 originado a forma madura da IL-1 $\beta$  para a secreção.

Diversos estudos têm mencionado a alta sensibilidade dos ossos a IL-1, que por sua vez condiciona tanto a formação quanto a reabsorção óssea, atuando também como fator de ativação de osteoclasto, integrando etapas distintas do desenvolvimento desta célula, *in vitro* e *in vivo*. A formação do osteoclasto é mediada pela IL-1 estimulando indiretamente a síntese de PGE2 em osteoblasto aumentando a expressão de RANKL por estas células e suprimindo a expressão do inibidor do receptor RANK a osteoprotegerina (OPG), ocasionando o acionamento

de RANK, resultando na maturação de osteoclasto e a reabsorção subsequente (LEE et al., 2010; PARK, YIM, 2007; NUKAGA et al., 2004).

A IL-1 também pode desempenhar outros papéis relacionados às células de reabsorção óssea: como a fusão de osteoclastos mononucleares induzindo a multinucleação; (a) ativação das funções dos osteoclastos de forma direta independente de RANKL, ou indireta, por meio do auxílio de osteoblasto (dependente de RANKL); e (b) estimulando a sobrevivência dos osteoclastos (LEE et al., 2010; MIYAZAKI et al., 2000; JIMI et al., 1999).

Roskamp e colaboradores (2006) afirmam que a IL-1 $\beta$  é a citocina mais operante envolvida no processo de reabsorção óssea, mediando os sinais de reabsorção para os osteoclastos, e segundo os estudos de Nukaga e colaboradores (2004), estimulando a expressão de RANKL.

Em síntese, presume-se que as defesas do hospedeiro, as quais são efetuadas pelo recrutamento de células inflamatórias, serão responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e o interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), as quais promovem o aumento na produção de PGE2 e concomitantemente com a IL-1 poderão estimular a atividade proteolítica de MMPS entre outras enzimas, que por sua vez, causarão a destruição da matriz extracelular do tecido gengival, ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar (NASCIMENTO et al., 2006; JIMI et al., 1999; PAGE, 1998).

## 2.3 Interleucina 1 $\beta$

A Interleucina-1 (IL-1) compreende a uma família de citocinas (IL-1F) composta por 11 representantes, incluindo as citocinas pro-inflamatórias; interleucina 1 *Alfa* (IL-1 $\alpha$ ) e a IL-1 $\beta$ , as quais apresentam 26% de semelhança, embora possuam o mesmo receptor antagonista (IL-1Ra). Seus genes estão localizados no braço longo do cromossomo 2 (2q13-14) (CANTORE et al. 2014; REYNA et al., 2011; WEBER, KRACHT, 2010; DINARELLO, 2009).

Dinarello (2005) descreve a IL-1 $\beta$  como um polipeptídeo não estrutural de massa molecular de 15.000 Da, apresentando participação na expressão de uma série de genes, entre eles os de TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas.

A síntese da IL-1 $\beta$  ocorre principalmente por macrófagos e fibroblastos ativados, que liberam a proteína para o meio extracelular. O processo de formação é

desencadeado pela transcrição do mRNA (*Messenger RNA*), resultando na produção da proteína proIL-1 $\beta$ , sendo que este produto imaturo é clivado pela enzima caspase-1, originando a sua forma bioativa (CATORE et al. 2014; BUFFEN et al., 2013).

O estudo realizado por Gemmell (1997) relata a IL-1 como o mediador principal da resposta inflamatória, possuindo atuações em vários tipos celulares, sendo também produzida por diferentes células, como: células B, fibroblastos, osteoblastos e outros. Estes estudos também descreveram a IL-1 como um indutor da reabsorção óssea, estimulando a proliferação e diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, assim como também sua ativação.

No caso das doenças periodontais, pesquisadores assumem que as Interleucinas 1 $\alpha$  e 1 $\beta$  são responsáveis por desencadear a produção de proteases que degradam a matriz extracelular, atuando também na reabsorção do osso alveolar, resultando na destruição dos tecidos (TREVILATTO et al., 2011; GENCO, 1992).

Bartold e colaboradores (2005) alegam que a periodontite apresenta perfis de citocinas semelhantes ao da artrite reumatoide, exibindo níveis duráveis de citocinas pro-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e baixos níveis de citocinas que suprimem a resposta imunoinflamatória como a Interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento *Beta* (TGF- $\beta$ ), sugerindo que o desajuste da atividade desses mediadores está associado com a destruição dos tecidos.

O papel da IL-1 na patogênese da DP tem sido apresentado como preponderante por alguns estudos, consentindo-a como o indutor mais potente da reabsorção óssea. Além disso, tem-se constatado que o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  no fluído crevicular gengival e nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite, entendendo que a variação nos níveis de citocinas pode contribuir para a suscetibilidade à doença (GORE et al., 1998).

Verifica-se que estas diferenças podem ser parcialmente originadas, por alelos de genes de citocinas, visto que existem vários polimorfismos genéticos dos genes no *cluster* da IL-1. Diversas publicações associam as variantes genéticas com o aumento dos níveis de citocinas, ocorrendo, além disso, relações com o aumento da gravidade de várias doenças inflamatórias crônicas (GORE et al., 1998; KORNMAN et al., 1997).

## 2.4 Variação Genética

Embora os fatores microbianos entre outros ambientais, iniciem e modulem respectivamente, a DP, observa-se que os indivíduos reagem de maneira diferente aos desafios ambientais partilhados, indicando a influência do perfil genético individual, e que a variação genética é um dos principais determinantes de risco para muitas doenças humanas (KINANE et al., 2005; KHOURY et al., 2003; FRIEDRICH, 2000; COLOMBO et al., 1998).

O conceito de que os fatores genéticos influenciam na suscetibilidade e progressão para periodontite é sustentado mediante os estudos realizados em humanos e animais, considerando as diferenças de resposta à doença em relação ao acúmulo de placa, que por sua vez envolve reações inflamatórias e imunológicas sugerindo a interferência de elementos genéticos, que atuam de modo a predispor para o desenvolvimento de doenças periodontais (KINANE et al., 2005; HODGE, MICHALOWICZ, 2001; HART, 1996; HASSELL, HARRIS, 1995; MICHALOWICZ, 1994; LINDHE et al. 1975).

Muitos estudos têm sido direcionados em catalogar variantes de nucleotídeo único, buscando correlacionar tais variações genotípicas específicas, com variações fenotípicas particularmente relacionadas à saúde (GUTTMACHER, COLLINS, 2002).

Grande parte das diferenças observadas entre os indivíduos, das quais se inclui a suscetibilidade às doenças, são decorrentes de variações do DNA, que por sua vez se manifestam na maioria das situações através da substituição de um único par de bases, sendo referidas como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e possuindo uma alta frequência no genoma humano (TREVILATTO et al., 2011; PATIL et al., 2001).

Segundo Taylor (2004) e colaboradores, um SNP define dois alelos para o qual haverá três genótipos entre os indivíduos numa dada população, a qual possuirá uma variação da identidade de um nucleotídeo para um sitio particular no genoma. Os SNPs podem incluir variantes no comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), embora não se limite a alterações que criam ou desfazem sítios para endonucleases de restrição da molécula de DNA.

O projeto genoma humano, catalogou aproximadamente 5,3 milhões de SNPs, ponderando-se que a cada 600 pb ocorra um SNP e deste modo, quando se

examina as informações de tipagem para um SNP é possível investigar genes associados à doenças e analisar a estrutura genética da população (XIAO et al., 2006; PATIL et al., 2001).

Acredita-se que os alelos que apresentarem variantes, originarão produtos proteicos com efeitos fisiológicos diferentes, os quais sofrem interferências de fatores ambientais, como por exemplo, a resposta inflamatória a um agente microbiano, e deste modo, presumindo que os polimorfismos podem aumentar ou diminuir o risco de um fenótipo (KINANE, HART, 2003).

A influência da expressão de genes de citocinas que comportam SNPs, frente a diversos estímulos, tem sido observada, demonstrando-se relacionada a uma maior suscetibilidade à severidade sintomática em algumas doenças infecciosas e autoimunes (CHENG et al., 2010).

De acordo com Ebadian e colaboradores (2013) os SNPs de citocinas podem do ponto de vista teórico, exercer um papel na patogênese da periodontite, tendo implicações significativas sobre a produção e função de citocinas. Diversos estudos apontam que as variações nas doenças periodontais podem ser influenciadas por polimorfismos do gene da IL-1 $\beta$  (PARKHILL et al., 2000; GORE et al., 1998; KORNMAN et al., 1997).

Hwang e colaboradores (2002) descrevem que foram identificados três polimorfismos dialélicos no gene *IL1B* (IL-1 $\beta$ ), dispostos nas posições -511, -31 e +3954; estando estes associados com o aumento da produção da IL-1 $\beta$ . De acordo com Xu e colaboradores (2013) o alelo T para o polimorfismo *rs1143634* posição +3954 (C/T) está associado com várias doenças inflamatórias, de modo que promove o aumento de secreção da IL-1 $\beta$ .

O estudo de Kornman e colaboradores (1997) foi o pioneiro envolvendo polimorfismos de genes de citocinas com a DPC, avaliando os SNPs *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) +3953 e *IL1A* (IL-1 $\alpha$ ) -889 constatando-se uma associação significativa entre os genótipos de IL-1 e a periodontite adulta avançada em pacientes não fumantes. Entretanto, o estudo de Gore e colaboradores (1998) demonstrou uma associação significativa considerando somente o alelo 2 da IL-1 $\beta$  +3953, para periodontite severa em uma população pequena de adultos, da qual se incluía indivíduos fumantes.

O polimorfismo antes referido como *IL1B* (+3953) passou a ser *IL1B* (+3954) devido uma nova convenção, a qual considera que a numeração de início da transcrição inicia-se a partir de 1 e não de zero (MCDEVITT et al., 2000).

Desde 1997 diversos estudos investigaram a relação dos SNPs da IL-1 com as doenças periodontais, havendo, porém contradições entre os resultados obtidos, devido à existência de relatos; que reportaram associação entre os SNPs e a DP, e outros em que esta situação é ausente, tendo-se, por conseguinte informações inconsistentes (TANAKA et al., 2014; AYAZI et al., 2013; EBADIAN et al., 2013; TREVILATTO et al., 2011; KARASNEH et al., 2011; SAKELLARI et al., 2006; MOREIRA et al., 2005; PAPAPANOU et al., 2001; PARKHILL et al., 2000; MCDEVITT et al., 2000; GALBRAITH et al., 1999; GORE et al., 1998; KORNMAN et al., 1997).

Laine (2012) e colaboradores (2012) alegam em uma revisão sistemática, que os polimorfismos do gene *IL1* não podem ser estimados como fatores de risco e suscetibilidade para a periodontite. Entretanto, Greenstein e Hart (2002) relatam que pesquisadores têm demonstrado diferenças raciais na suscetibilidade à DP, compatibilizando com a percepção obtida, por meio da comparação entre os primeiros estudos, em que se observou uma dissimilaridade na prevalência de genótipos-positivos entre diferentes grupos étnicos, a qual impede a sobreposição dos dados entre os grupos impossibilitando a extrapolação de um grupo para outro.

Em se tratando de populações miscigenadas, pesquisadores não têm recomendado a segregação em grupos étnicos, considerando que exista a sobreposição de genótipos entre as raças (FERREIRA et al., 2008; DRUMMOND et al., 2004; PARRA et al., 2003)

Poucos estudos têm avaliado a associação de SNPs de genes com as Doenças Periodontais na população brasileira (TREVILATTO et al., 2011). Todavia, o estudo realizado por Moreira e colaboradores (2005) constatou diferenças estatísticas significantes, considerando a frequência e distribuição do alelo T (*rs1143634*) entre os grupos caso e controle na população do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

Por meio das considerações descritas ao longo do texto, percebe-se que ainda não se tem um consenso sobre o papel dos polimorfismos da IL-1 em relação

à doença periodontal, clarificando que a reunião de novas evidências é de grande relevância, mediante a necessidade de elucidar os aspectos genéticos envolvidos.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Investigar a relação do SNP *rs1143634* do gene *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) com a doença periodontal crônica.

### 3.2 Específicos

- Descrever a distribuição dos alelos e genótipos do grupo amostral estudado;
- Comparar o nível de severidade da doença periodontal crônica com o perfil genético individual;
- Avaliar o *risco relativo* e *odds ratio* entre as variáveis: sexo, severidade, frequência alélica e grupos;
- Contribuir para a compreensão da relação dos polimorfismos genéticos com a doença periodontal crônica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo consistiu em uma análise de caso-controle, tendo sua proposta submetida e aprovada pelo comitê de ética e pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), sob o registro de número CAAE 0073.0.168.000-10. Os indivíduos que colaboraram em participar, mediante a adesão voluntária, foram adequadamente esclarecidos sobre os assuntos e demais aspectos envolvidos na pesquisa, incluindo objetivos, métodos e riscos. Estando os mesmos, inclusos no grupo amostral por meio da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (APÊNDICE A), o qual, previamente foi submetido, sendo a etapa de triagem subsequente (APÊNDICE B). As entrevistas ocorreram no Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da PUC-Goiás ou em consultório odontológico particular, sendo toda parte experimental desenvolvida no NPR, no período de 8 meses, tendo seu início em maio de 2014.

### 4.1 Grupo Amostral

O grupo amostral foi composto por um total de 51 participantes, distribuindo-se em 26 indivíduos para o grupo caso e 25 indivíduos para o grupo controle, os quais foram procedentes de municípios da região metropolitana de Goiânia, Goiás, Brasil. As amostras do grupo caso foram provenientes de pacientes de ambos os sexos diagnosticados com a DPC em diferentes níveis de severidade abrangendo as condições: leve, moderada e severa. O grupo controle também foi composto por indivíduos de ambos os sexos considerados saudáveis, uma vez que não apresentavam sinais clínicos da DPC. Aspectos como a menoridade (menos de 18 anos) e hábitos tabagistas foram considerados como critérios de exclusão para os grupos. Indivíduos de ambos os grupos foram submetidos ao exame clínico denominado de periograma, realizado por profissional especializado, utilizando uma sonda periodontal milimetrada (sonda "O" de *Michigan*) para diagnosticar a doença, identificando o nível de severidade através das marcações de 3, 6 e 8 mm, as quais mensuram a profundidade de sondagem correspondendo aos níveis leve, moderada e severa, respectivamente.

## 4.2 Amostras biológicas, Extração e Quantificação do DNA

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

## 4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O rastreamento do polimorfismo *rs1143634* do gene *IL1B*, posição +3954 (C/T), foi realizado com base no método de PCR, que por sua vez, permite a síntese de ácidos nucleicos *in vitro*, através da replicação semiconservativa de um segmento específico do DNA, permitindo a detecção de regiões ou genes de interesse no genoma (FLEMMIG et al., 1995). Foram utilizados os *primers* descritos (Tabela 01) por Gore e colaboradores (1998), os quais amplificam um fragmento de 194 pb, partindo da posição +3816 até a +4066 (SALAZAR-PELAÉZ et al., 2012).

**Tabela 1** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do gene *IL1B*, Goiânia, Goiás, 2015.

<b>Primer Forward</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
5'- CTCAGGTGTCCTCCAAGAAATCAA – 3'	194
<b>Primer Reverse</b>	
5' – GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG – 3'	

As reações foram realizadas em tubos de 0,2 ml, preparando-se misturas (Tabela 2) para cada amostra, contendo o DNA extraído e os componentes que reproduzem um meio para a amplificação do mesmo, completando o volume final de 50 µL.

**Tabela 2** - Componentes da reação de PCR, volume e concentração final na mistura, Goiânia, Goiás, 2015.

Componentes	Volume	Concentração Final
Tampão de PCR 10X	5,0 µL	1X
10 mM de Mix de dNTP	1,0 µL	0,2 mM cada
50 mM de <i>MgCl</i> <sub>2</sub>	1,5 µL	1,5 mM
<i>Primers</i> (10 µM cada)	1,0 µL	0,2 µM cada
DNA molde	5,0 µL	< 500 ng
Taq DNA Polimerase <i>Platinum</i> ®	0,4 µL	2 U
H2O Milli-Q Autoclavada	36,1 µL	NA
<b>Volume Final</b>	<b>50 µL</b>	

**Legenda:** NA – Não se aplica

Após o preparo, as misturas foram submetidas ao procedimento de termociclagem, utilizando o termociclador *Veriti*® 96-Well Fast Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, EUA) nas condições descritas na Tabela 3, para a amplificação do gene *IL1B*.

**Tabela 3** - Condições de termociclagem, utilizadas na reação de PCR para a amplificação da região de interesse, Goiânia, Goiás, 2015.

Etapas	Quantidade de Ciclos	Condições
Desnaturação Inicial	1	95°C por 5 min
Desnaturação		94°C por 30 seg
Anelamento	35	53°C por 30 seg
Extensão		72°C por 30 seg
Extensão Final	1	72°C por 5 min

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em cuba horizontal a 10 V/cm em gel de agarose a 1,5%, imerso em TBE 1X. Para análise visual dos *amplicons*, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,05 %) por 20 minutos e logo em seguida analisado em um sistema de vídeo documentação Gel Doc™ XR+ *Molecular Imager*® (*Bio-Rad*, EUA) utilizando o software *Image Lab*™ (*Bio-Rad*, EUA). A identificação de cada banda foi inferida por comparação com um marcador de 100 pb (*Invitrogen*, EUA).

#### 4.4 Reação de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

A técnica de RFLP aplicada em conjunto com método de PCR (PCR-RFLP), também é conhecida como sequência clivada polimórfica amplificada, consiste em um método que se avalia o comprimento dos *amplicons* (produtos de PCR) clivados por endonucleases de restrição, permitindo a análise de SNPs e microdeleções, frequentemente associadas com a criação ou supressão de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição (RASMUSSEN, 2012).

Durante as reações de RFLP a enzima de restrição efetua a digestão de sítios específicos ao longo da extensão do genoma, conforme o ajuste da temperatura de ativação. Em se tratando do gene *IL1B*, este possui na região que envolve a posição +3954, um sítio de restrição da enzima Taq I, que compreende a sequência 5' TCGA ou 3' AGCT, havendo clivagem entre T (timina) e C (citosina). Considerando que o alelo alternativo possui uma base T na posição +3954 no lugar de C e, que por sua vez encontra-se no alelo selvagem, pode-se inferir que o alelo alternativo perde um sítio de restrição, possuindo comprimentos de fragmentos de restrição distintos do alelo selvagem, permitindo identificar o perfil genético dos indivíduos, quanto ao SNP da posição +3954.

Os produtos de PCR de 194 pb referentes ao gene *IL1B*, são clivados pela enzima Taq I (*Invitrogen*, EUA) originando fragmentos de 97, 85 e 12 pb que corresponde ao genótipo selvagem (CC); 182, 97, 85 e 12 pb para os heterozigotos (CT); 182 e 12 pb para o genótipo mutante ou alternativo (TT) (FERREIRA et al., 2008).

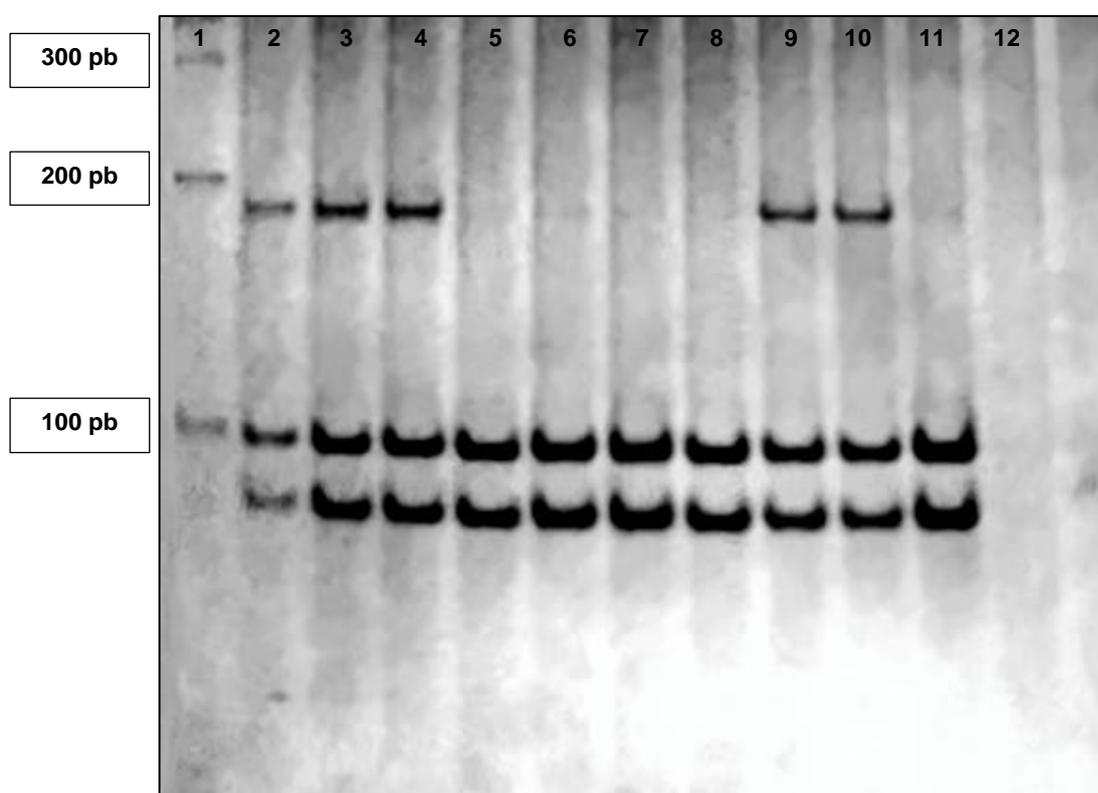
Para a reação de RFLP foram preparadas misturas, contendo os produtos de PCR e os componentes descritos na Tabela 4, exibindo as condições para digestão (clivagem) dos sítios de restrição mediante o ajuste de temperatura ótima da enzima.

**Tabela 4** - Componentes da reação de RFLP, volumes e concentrações finais, Goiânia, Goiás, 2015.

Componentes	Volume	Concentração Final
Tampão 10X	2,0 µL	1x
BSA 0,1%	2,0 µL	0,01%
Taq I 10 U/µL	0,5 µL	5 Unidades
<i>Amplicons</i>	2,5 µL	≤ 0,5 µg
H2O Milli-Q Autoclavada	13 µL	NA
<b>Volume Final</b>	<b>20 µL</b>	

**Legenda:** NA – Não se aplica

A digestão dos produtos de PCR ocorreu em temperatura constante de 65°C por uma hora. Os fragmentos de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%, submetido à eletroforese em cuba vertical com corrente elétrica constante de 20 mA, sendo corado com nitrato de prata (0,1%) e analisado visualmente por auxílio de um negatoscópio.



**Figura 1** – Perfil da restrição do *amplicon* (194 pb) do gene *IL1B* (IL-1 $\beta$ ) utilizando um marcador molecular de 100 pb (1) e um controle negativo (12). Os indivíduos homozigotos para o alelo C (5, 6, 7, 8, 11) apresentam três fragmentos de restrição: 97, 85 e 12 pb. Os indivíduos heterozigotos (2, 3, 4, 9, 10) apresentam quatro

fragmentos de restrição: 182, 97, 85 e 12 pb. Na imagem não se observa o fragmento de 12 pb.

#### 4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa *Microsoft Office Excel* 2010 e expressados em percentagem (frequência). A análise estatística dos dados ocorreu, empregando-se inicialmente o teste de Equilíbrio de *Hard Weinberg*, o qual se avaliou o equilíbrio dos genótipos e a frequência dos alelos para os grupos estudados, aplicando-se individualmente para o grupo caso e o grupo controle.

Posteriormente, foi utilizado o teste *Qui-Quadrado* ( $\chi^2$ ) para a análise inferencial das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos estudados, adiante, o teste *Exato de Fisher* foi aplicado em outras análises comparativas. Adicionalmente, o teste de *Regressão Logística Binária* foi empregado para avaliar as distribuições dos genótipos e dos níveis de severidade (grupo caso) entre os grupos estudados.

Os testes de *Risco Relativo* (RR), *Correlação Linear de Pearson* e *Odds ratio* (OR) foram utilizados para comparar diferenças entre as variáveis: sexo, severidade, genótipo, frequência alélica e grupos (caso e controle). Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  (5% de significância). Os testes estatísticos utilizados fazem parte do sistema computacional *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para *Windows* 10 e do software *BioEstat v.5.3*<sup>®</sup>.

## 5 RESULTADOS

Dentre as 51 amostras estudadas, 31 foram provenientes de indivíduos do sexo feminino e 20 do sexo masculino, sendo 17 mulheres e 9 homens para o grupo caso e 14 mulheres e 11 homens para o grupo controle. Do total de pacientes diagnosticados com DPC, 65% apresentaram à forma leve, 31% a forma moderada e 4% forma severa da doença. A Tabela 5 indica a estatística descritiva dos resultados obtidos neste estudo.

**Tabela 5** – Frequência entre sexos, média de idade e frequência dos níveis de severidade referente aos grupos caso e controle, Goiânia, Goiás, 2015.

Grupo	Sexo		Total (%)	Idade (Média ± DP)	Severidade		
	Mas (%)	Fem (%)			L (%)	M (%)	G (%)
<b>Caso (n=26)</b>	34,6	65,4	100,0	23,73 ± 6,04	65,0	31,0	4,0
<b>Controle (n=25)</b>	44,0	56,0	100,0	25,2 ± 7,69	NA	NA	NA

**Legenda:** Mas – Masculino, Fem – Feminino, L – Leve, M – Moderada, S – Severa, DP – Desvio Padrão

A frequência alélica e a distribuição genotípica dos polimorfismos nos grupos caso e controle são mostradas na Tabela 6 e 7 respectivamente, estando consistentes com a hipótese de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6** – Análise inferencial da frequência alélica entre os grupos caso e controle e o valor de  $p$  obtido por meio teste  $\chi^2$ , Goiânia, Goiás, 2015.

Fr. Alélica	Grupo Caso	Grupo Controle	Valor de $p$
	n (%)	n (%)	
<b>C</b>	40 (76,9)	45 (90,0)	0,13
<b>T</b>	12 (23,1)	5 (10,0)	
<b>Total (%)</b>	52 (100,0)	50 (100,0)	

Em ambos os grupos, o genótipo contendo o alelo alternativo em homozigose não foi observado, deste modo, durante as análises estatísticas inferenciais utilizadas, foram comparados somente às frequências genotípicas contendo o alelo selvagem em homozigose (CC), e as frequências genotípicas em heterozigose (CT).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos entre os controles saudáveis (grupo controle) e os indivíduos com DPC (grupo caso) para o polimorfismo *rs1143634* ( $p=0,09$ ), e do mesmo modo para a frequência dos alelos ( $p=0,13$ ).

**Tabela 7** – Análise da distribuição dos genótipos nos grupos estudados e valor de  $p$  obtido através do  $\chi^2$ , Goiânia, Goiás, 2015.

Genótipo	Grupo Caso	Grupo Controle	Valor de $p$
	n (%)	n (%)	
(C/C)	14 (53,8)	20 (80,0)	0,09
(C/T)	12 (46,2)	5 (20,0)	
<b>Total (%)</b>	26 (100,0)	25 (100,0)	

Posteriormente, outras análises estatísticas foram realizadas, avaliando-se a frequência dos genótipos entre os sexos isoladamente para cada grupo (caso e controle), não havendo diferenças significativas ( $p>0,05$ ) para ambos. Em seguida, foram realizadas análises comparando-se as frequências dos genótipos entre os grupos para o conjunto de indivíduos de um determinado sexo, avaliando-se isoladamente tanto o sexo feminino quanto o masculino, não havendo também diferenças estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) em ambas as situações.

Análises Estatísticas que avaliaram os genótipos em relação ao nível de severidade da DPC também foram realizadas, excluindo a forma severa da doença por ter sido diagnosticada em apenas um indivíduo. Nestas análises, as frequências genotípicas foram comparadas com os níveis de severidade (leve e moderada) isoladamente para cada sexo e em seguida a análise da totalidade a partir da soma de ambos, obtendo-se em todas estas um valor de  $p>0,05$ .

Conjuntamente, o teste de *Regressão Logística Binária* foi realizado avaliando novamente a distribuição dos genótipos com a DPC, porém incluindo também os níveis de severidade da doença, constituindo em uma única análise inferencial. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,787$ ).

A respeito das análises de incidência, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) referentes ao teste OR, no qual, confronta-se o número de indivíduos com DPC (grupo caso) e o número de indivíduos saudáveis (grupo controle) isoladamente, em relação aos genótipos (OR=0,29 e IC=0,08-1,01),

a frequência de alelos (OR=0,37 e IC=0,12-1,14) e os gêneros (sexo) (OR=0,67 e IC=0,22-2,1). Do mesmo modo, considera-se a frequência dos alelos (C e T), em relação aos grupos (caso e controle) (OR=0,37 e IC= 0,12-1,14), severidade (OR=0,42 e IC=0,07-2,4) e gêneros (sexo) (OR=0,53 e IC=0,15-1,83) ( $p>0,05$ ). A Tabela 8 apresenta a comparação da frequência alélica entre os grupos caso e controle, segundo o teste RR.

**Tabela 8** - Análise da frequência alélica segundo a presença do alelo de risco T (*rs1143634*) em pacientes caso e controle, Goiânia, Goiás, 2015.

Alelos	Grupo Caso n (%)	Grupo Controle n (%)	RR	IC	Valor de <i>p</i>
C	40 (77,0)	45 (90,0)	0,85	0,72-1,02	0,06
T	12 (23,0)	5 (10,0)	2,31	0,88-6,08	0,06
<b>Total (%)</b>	<b>52 (100,0)</b>	<b>50 (100,0)</b>			

**Legenda:** RR – Risco Relativo, IC – Intervalo de Confiança

**Tabela 9** - Análise da relação da frequência alélica entre pacientes caso e controle, segundo o teste de Risco Relativo, Goiânia, Goiás, 2015.

Variável	T n (%)	C n (%)	Total	RR	IC	Valor de <i>p</i>	RRR	RAR
<b>Sexo</b>								
Masculino	5 (29,4)	15 (44,1)	20	0,33	0,15-0,74	0,002	67%	50,00%
Feminino	12 (70,6)	19 (55,9)	31	0,63	0,37-1,07	0,06	37%	22,50%
<b>Total (%)</b>	<b>17 (100,0)</b>	<b>34 (100,0)</b>	<b>51</b>					
<b>Severidade</b>								
Leve	7 (58,3)	10 (71,4)	17	0,7	0,35-1,40	0,25	30%	17,60%
Moderada	5 (41,7)	3 (21,4)	8	1,67	-	0,31	67%	25,00%
Severa	0 (0,0)	1 (7,1)	1	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Total (%)</b>	<b>12 (100,0)</b>	<b>14 (100,0)</b>						
<b>Grupos</b>								
Controle	5 (29,4)	45 (52,9)	50	0,11	0,05-0,26	<0,0001	89%	80,00%
Caso	12 (70,6)	40 (47,1)	52	0,3	0,18-0,5	<0,0001	70%	53,80%
<b>Total (%)</b>	<b>17 (100,0)</b>	<b>85 (100,0)</b>						

**Legenda:** RR – Risco relativo, IC – intervalo de confiança, RRR – Redução do Risco Relativo, RAR – Redução Absoluta do Risco, NA – Não se Aplica

Segundo os dados obtidos na Tabela 8 não houve diferença na distribuição de frequências alélicas entre os pacientes caso e controle ( $p=0,06$ ). Por outro lado, a Tabela 9, apresenta a distribuição alélica segundo o sexo, severidade e grupos caso

e controle. A análise de RR apresentou uma Redução Absoluta do Risco (RAR) de 50%, para o sexo masculino ( $p=0,002$ ), 80% para grupo controle ( $p<0,0001$ ) e 53,8% para o grupo caso ( $p<0,0001$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos o sexo feminino entre os alelos T e C ( $p=0,06$ ); severidade: leve ( $p=0,25$ ), moderada ( $p=0,31$ ) e grave (severa) ( $p=NA$ ). Por fim, a análise de RR apresentou RAR de 30,70% para o sexo masculino referente ao grupo caso (Tabela 10).

**Tabela 10** - Análise comparativa entre os sexos referente ao grupo caso, segundo a análise de Risco Relativo, Goiânia, Goiás, 2015.

Sexo	Grupo Caso	Total	RR	IC	$p$	RRR	RAR
n (%)							
<b>Masculino</b>	9 (34,6)	26	0,53	0,29-0,96	0,03	47%	30,7%
<b>Feminino</b>	17 (65,4)	26					

**Legenda:** RR – Risco relativo, IC – intervalo de confiança, RRR – Redução do Risco Relativo, RAR – Redução Absoluta do Risco.

## 6 DISCUSSÃO

Desde o final da década de 90, diversos estudos foram realizados com finalidade investigativa acerca das doenças periodontais em associação a fatores de riscos genéticos conhecidos do sistema imune inato. Isso se atribuiu a variação genética ser um dos aspectos primordiais para o desenvolvimento das doenças complexas comuns, como a periodontite. Embora patógenos microbianos iniciem a doença, os indivíduos enfermos são conhecidos por demonstrarem respostas distintas aos fatores ambientais partilhados. Ponderando que os polimorfismos de genes de citocinas têm consequências sobre a resposta imune, gerando o desequilíbrio de funções, que por sua vez, podem supostamente influenciar o estabelecimento e evolução da periodontite (DUTRA et al., 2009).

No presente estudo foi avaliado o polimorfismo do gene funcional da IL-1 $\beta$  (*rs1143634*, +3954 C/T) e o seu envolvimento com a DPC. Os dados obtidos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle quanto à distribuição dos genótipos e a frequência alélica, embora o alelo C (*rs1143634*) tenha sido associado com redução do risco da doença.

O alelo T referente o polimorfismo *rs1143634* foi menos frequente, estando presente em 33% (17/51) dos genótipos e não sendo encontrado em homozigose. Em outras pesquisas realizadas no Brasil, verificam-se semelhanças na frequência do alelo T (*rs1143634*) nos genótipos, como nos estudos de Trevilatto e colaboradores (2011), em que o mesmo esteve presente em 31% (35/113) dos genótipos, sendo 3,5% (4/113) em homozigose, não havendo também diferenças estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos entre os controles saudáveis e os pacientes com periodontite. No estudo de Moreira e colaboradores (2005), a frequência do alelo T (*rs1143634*) foi equivalente, ocorrendo também em 33% (18/54) dos genótipos, estando 2% (1/54) em homozigose, contudo, apresentando diferenças estatisticamente significativas, entre o grupo controle e o de pacientes com DPC, considerando apenas indivíduos não fumantes.

Em se tratando de pesquisas realizadas em outros países, o estudo de Sakellari e colaboradores (2006), envolvendo diversos marcadores além do gene *IL1B* +3954 (*rs1143634*) em indivíduos da população da Grécia, não reportaram diferenças significativas para a distribuição dos genótipos, e considerando a

frequência do alelo T, e em relação ao polimorfismo *rs1143634*, verificou-se que o mesmo, esteve em 36% (53/146) dos genótipos avaliados, estando 7% (10/146) em homozigose, sendo que o número de participantes no estudo foi de 90 para os pacientes saudáveis (controle) e 56 para os indivíduos com DPC. Todavia o estudo realizado por Gore e colaboradores (1998) em indivíduos caucasianos e fumantes, observou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de periodontite leve, moderada e o grupo de periodontite severa, estando o alelo T (*rs1143634*) com frequências de 41% (26/64) nos genótipos, sendo 8% (5/64) em homozigose.

De modo geral, as pesquisas citadas demonstraram que alelo T (*rs1143634*) é pouco frequente nas populações descritas, principalmente em homozigose, ressaltando a necessidade de avaliar um número maior de indivíduos. Nem todos os estudos mencionados apresentaram diferenças na distribuição dos genótipos, embora tenham exibido valores similares para a frequência do alelo T (*rs1143634*). Moreira e colaboradores (2005), demonstraram o alelo T para o polimorfismo *rs1143634* como fator de risco para DPC, de modo que, foram constatadas diferenças na distribuição dos genótipos e frequências alélicas entre os grupos, estando o alelo T (*rs1143634*), significativamente mais frequente no grupo de pacientes com DPC. No estudo de Galbraith e colaboradores (1999), foi observada uma frequência significativamente maior do alelo T (*rs1143634*) para o grupo de indivíduos com periodontite do adulto (DPC).

No entanto, o estudo de Parkhill e colaboradores (2000) reportou diferenças na distribuição dos genótipos, e foi associada a presença do alelo C (*rs1143634*) com a doença periodontal de início precoce (periodontite agressiva) entre fumantes e não fumantes, sugerindo a possibilidade de interferência de outros fatores genéticos e ambientais para esta patogenia. De modo parecido, Ebadian e colaboradores (2013), também não demonstraram associação do alelo T para o polimorfismo *rs1143634* com a doença periodontal agressiva, supondo o envolvimento do mesmo, apenas com a DPC.

Em se tratando do estudo vigente, verificou-se que a frequência do alelo T para o polimorfismo *rs1143634* se encontra em similaridade com alguns estudos comentados, sugerindo que o pequeno número de amostras, possivelmente interferiu na significância dos dados, quanto à distribuição do genótipo e da frequência alélica. Contudo, o gene *IL1B* para o alelo T no polimorfismo *rs1143634*

pode ser indicado como fator de risco, visto que o alelo C (*rs1143634*) reduziu significativamente o risco absoluto relativo referente ao sexo masculino, grupos caso (53,8%) e controle (80,0%), o que também indica a participação de outros elementos no desfecho da doença. Além disso, também foi observada à redução significativa do risco absoluto relativo para o sexo masculino, em relação à DPC, propondo uma maior incidência para os indivíduos do sexo feminino.

Conquanto, observa-se que o alelo T (*rs1143634*) pode estar envolvido com a gravidade da DPC, visto que nos estudos de Gore e colaboradores (1998), houve diferenças significativas na distribuição do mesmo entre os níveis de severidade da doença. Aliás, outras pesquisas indicaram o envolvimento do alelo T (*rs1143634*) apenas com a DPC, através de estudos que avaliaram a distribuição genotípica e a frequência alélica em diferentes tipos de periodontite, ou que consideraram apenas um único tipo de DP (GUZELDEMIR et al., 2008; MOREIRA et al., 2005; PARKHILL et al., 2000).

Mediante ao que foi relatado por este e outros estudos, percebe-se que ainda existem muitas dissonâncias que se contrapõem e segundo Ebadian e colaboradores (2013), isso pode ser atribuído; a variedade (tipos) de doenças periodontais existentes, aos tamanhos de amostras desiguais e as variações de frequência de genótipos em populações de diferentes origens, uma vez que, pesquisas realizadas pelo mundo, tem verificado a prevalência do alelo T (*rs1443634*), apresentando perfis variáveis, sendo de 18 a 89%.

Eke e colaboradores (2012) relataram para a população dos EUA, um predomínio maior da periodontite em homens do que em mulheres. Segundo Albandar e Rams (2002), a prevalência se altera significativamente em outras regiões do mundo. No presente estudo foi observada uma frequência maior para mulheres (55%) do que para homens (45%), porém, estes dados não representam os de uma população. No Brasil, apesar da carência de estudos epidemiológicos, verifica-se a prevalência abaixo de 70% para DPC leve a moderada, tendo uma incidência maior para o sexo feminino em algumas populações (ROMITO, 2012), e de acordo com Segundo e colaboradores (2004) uma prevalência maior em homens do que em mulheres, embora este também tenha relatado em sua pesquisa, um percentual elevado de sangramento gengival (100%) para mulheres em uma comunidade negra do estado de Minas Gerais, Brasil.

À vista disso, acredita-se que um fator de risco atue individualmente em cada população, de modo a elucidar a distribuição desigual da DPC e embora a IL-1 $\beta$  realize um papel expressivo na patogenia, compreende-se que fatores ambientais como as classes sociais, tabagismo, higiene oral inadequada e a carência de atendimento odontológico especializado, contribuem para o aumento da suscetibilidade individual e severidade da doença. E mesmo que, os possíveis genes candidatos do *cluster IL1* estejam envolvidos com os mecanismos fisiopatológicos, a análise de outros genes aspirantes como cooperadores da doença, é imprescindível, uma vez que, a existência de um gene singular de consequência principal ainda não foi reconhecida e é importante considerar que a DPC pode supostamente ser uma doença poligênica (TREVILATTO et al., 2011).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- O polimorfismo *rs1143634* do gene *IL1B* (+3954) influencia na susceptibilidade do desenvolvimento da doença periodontal crônica;
- A presença do alelo T para o polimorfismo *rs1143634* é considerada de risco para o desenvolvimento da periodontite crônica mediante a constatação da redução do risco relativo atribuído à presença do alelo C;
- Os indivíduos do sexo feminino apresentaram maior risco para o desenvolvimento da DPC, a qual foi demonstrada, por meio da redução do risco relativo para os indivíduos do sexo masculino;
- Não foram observadas diferenças significativas entre as distribuições dos genótipos e das frequências alélicas no polimorfismo *rs1143634* do gene *IL1B* (+3954);
- Adicionalmente, outros genes com diferentes polimorfismos podem estar envolvidos na patogênese da doença periodontal crônica, uma vez que, existem diversos mediadores atuando nos processos inflamatórios;
- Deste modo, há a necessidade de mais estudos na identificação de polimorfismos de genes da resposta do hospedeiro, assim como análise de expressão dos mesmos e da influência das condições ambientais, que podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade genética da DPC.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANDAR JM, RAMS TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000. 2002; 29: 7–10.
2. ALCÁNTARA MS. Aspectos bioéticos del consejo genético en la era del proyecto del genoma humano. *Acta Bioethica*. 2004; 10(2): 191–200.
3. ANDERSEN TL, OVEJERO MDC, KIRKEGAARD T, LENHARD T, FOGED NT, DELAISSÉ, JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone*. 2004; 35(5): 1107–1119.
4. ARAÚJO MG, SUKEKAVA F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. *Revista Periodontia*. 2007; 17(2): 7–13.
5. ARORA N, MISHRA A, CHUGH S. Microbial role in periodontitis: Have we reached the top? Some unsung bacteria other than red complex. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2014; 18(1): 9–13.
6. AYAZI G, PIRAYESH M, YARI K. Analysis of interleukin-1 $\beta$  gene polymorphism and its association with generalized aggressive periodontitis disease. *DNA and Cell Biology*. 2013; 32(7): 409–13.
7. BARTOLD PM, MARSHALL RI, HAYNES DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *Journal of Periodontology*. 2005; 76(11 Suppl): 2066–2074.
8. BECKER F, VAN EL CG, IBARRETA D, ZIKA E, HOGARTH S, BORRY P, et al. Genetic testing and common disorders in a public health framework: how to assess relevance and possibilities. Background Document to the ESHG recommendations on genetic testing and common disorders. *European Journal of Human Genetics*. 2011; 19 (Suppl 1): S6–44.
9. BELTRÁN-AGUILAR E, BARKER L, CANTO M. (2005). Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis—United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Surveill Summ*. 2005; 54: 1–43.
10. BOUCHARD C, AN P, RICE T, SKINNER JS, WILMORE JH, GAGNON J, et al. Familial aggregation of  $\dot{V}O_{2max}$  response to exercise training: Results from the HERITAGE family study. *Journal of Applied Physiology*. 1999; 87: 1003–1008.

11. BRASIL. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Nota para Imprensa. Brasília: 2010. Disponível em: <http://www.idisa.org.br/img/File/SAUDE%20BUCAL--NotaParaImprensa-28dez2010%20%282%29.pdf>. Acessado em: 09/05/2014.
12. BUFFEN, K., OOSTING, M., MENNENS, S., ANAND, P. K., PLANTINGA, T. S., STURM, P, et al. Autophagy modulates *Borrelia burgdorferi*-induced production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). *The Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(12): 8658–8666.
13. CANTORE S, MIRGALDI R, BALLINI A, COSCIA MF, SCACCO S, PAPA F, et al. Cytokine gene polymorphisms associate with microbiological agents in periodontal disease: our experience. *International Journal of Medical Sciences*. 2014; 11(7): 674–679.
14. CASTRO MVM, DUARTE, CA. Classificação atual das doenças periodontais. *Medcenter.com Odontologia*. 2002. Disponível em: <http://files.odontoeducacao.webnode.com.br/200000013-45de946d8f/Classifica%C3%A7%C3%A3o%20atual%20das%20doen%C3%A7as%20periodontais.pdf>. Acessado em: 12/03/2015.
15. CHENG HH, CHANG CSEN, WANG HJ, WANG, WC. Interleukin-1 $\beta$  and -10 polymorphisms influence erosive reflux esophagitis and gastritis in Taiwanese patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010; 25: 1443–1451.
16. COLOMBO AP, HAFFAJEE AD, DEWHIRST FE, PASTER BJ, SMITH C M, CUGINI MA, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25(2): 169–180.
17. DEWITTE SN. Sex differences in periodontal disease in catastrophic and attritional assemblages from medieval London. *American Journal of Physical Anthropology*. 2012; 149(3): 405–16.
18. DI FIORE, A. Molecular genetic approaches to the study of primate behavior, social organization, and reproduction. *American Journal of Physical Anthropology*. 2003; Suppl 37: 62–99.
19. DINARELLO CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*. 2009; 27: 519–550.

20. DINARELLO CA. Interleukin-1 $\beta$ . *Critical Care Medicine*. 2005; 33(Suppl): S460–S462.
21. DOWSETT SA, ARCHILA L, FOROUD T, KOLLER D, ECKERT GJ, KOWOLIK MJ. The effect of shared genetic and environmental factors on periodontal disease parameters in untreated adult siblings in Guatemala. *Journal of Periodontology*. 2002; 73(10): 1160–1168.
22. DRUMMOND SN, DE MARCO L, NORONHA, JCM, GOMEZ RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2004; 40: 52–55.
23. DURSUN E, AKALIN FA, GÜNCÜ GN, ÇINAR N, AKSOY DY, TÖZÜM TF, et al. Periodontal disease in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2011; 95(1): 320–323.
24. DUTRA WO, MOREIRA PR, SOUZA PEA, GOLLOB KJ, GOMEZ RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: Lessons learned from oral diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2009; 20: 223–232.
25. EBADIAN A, RADVAR M, AFSHARI J, SARGOLZAEI N, BROOK A, GANJALI R, et al. Gene Polymorphisms of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Are Not Associated with Generalized Aggressive Periodontitis in an Iranian Subpopulation. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2013; 12(4): 345–351.
26. EKE PI, DYE BA, WEI L, THORNTON-EVANS GO, GENCO RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of Dental Research*, 2012; 91(10): 914–920.
27. FERRARIS VA. What the Human Genome Project hasn't told us: The epigenetics of development of esophageal squamous cell cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2015; 149(1): 386–387.
28. FERREIRA SB, TROMBONE APF, REPEKE CE, CARDOSO CR, MARTINS W, SANTOS CF, et al. (2008). An interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1 $\beta$  in diseased periodontal tissues. *Infection and Immunity*. 2008; 76(8): 3725–3734.

29. FLEMMIG TF, RUDIGER S, HOFMANN U, SCHMIDT H, PLASCHKE B, STRATZ A, et al. (1995). Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(12): 3102–3105.
30. FRIEDRICH MJ. Relating Genomic Research to Patient Care. *JAMA*; 2000 284(20): 2581.
31. GALBRAITH GM, HENDLEY TM, SANDERS JJ, PALESCH Y, PANDEY JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999; 26(1996): 705–709.
32. GEMMELL E, MARSHALL RI, SEYMOUR GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 1997; 14(296): 112–143.
33. GENCO RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of Periodontology*. 1992; 63: 338–355.
34. GORE, EA, SANDERS JJ, PANDEY JP, PALESCH Y, GALBRAITH GMP. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25(10): 781–785.
35. GREENSTEIN G, HART TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *The Journal of Periodontology*. 2002; 73: 231–247.
36. GUNRAJ M. Dental root resorption. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Oral Endodontology*. 1999; 88(6): 647–653.
37. GUTTMACHER AE, COLLINS FS. Genomic medicine--a primer. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 347(19): 1512–1520.
38. GUZELDEMIR E, GUNHAN M, OZCELIK O, TASTAN H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis. *Journal of Oral Science*. 2008; 50(2): 151–159.
39. HANNUM, R. Avaliação molecular por arms-pcr do snp -1082 G/A da IL-10 na doença periodontal crônica em adultos. Goiânia, Dissertação de Mestrado. 2011. p54.
40. HART TC. Genetic Risk Factors for Early-Onset Periodontitis\*. *Journal of Periodontology*. 1996; 67(3s): 355–366.

41. HASSELL TM, HARRIS EL. Genetic Influences in Caries and Periodontal Diseases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995; 6(4): 319–342.
42. HE F, TENG X, GU H, LIU H, ZHOU Z, ZHAO Y, et al. Interleukin-6 receptor *rs7529229* T/C polymorphism is associated with left main coronary artery disease phenotype in a Chinese population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(4): 5623–5633.
43. HENNIG B, PARKHILL J. Dinucleotide repeat polymorphism in the interleukin-10 gene promoter (IL-10. G) and genetic susceptibility to early-onset periodontal disease. *Genes and Immunity*. 2000; 1(6): 402–4.
44. HIRSCHHORN JN, LOHMUELLER K, BYRNE E, HIRSCHHORN K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genetics in Medicine*. 2002; 4(2): 45–61.
45. HODGE P, MICHALOWICZ, B. Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontology 2000*. 2001; 26(1): 113–134.
46. HUGOSON A., NORDERYD O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *Journal of Clinical Periodontology*. 2008; 35(8 Suppl): 338–45.
47. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K., Peterson LE, Graham DY, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1793–1803.
48. HYMAN SE. A Healthy Son The Meaning of the Human Genome Project for Neuropsychiatric Disorders Socializing Genetic Diseases. *Science*. 2011; 331: 1026 – 1027.
49. JIMI E, NAKAMURA I, DUONG L, IKEBE T, TAKAHASHI N, RODAN G, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Experimental Cell Research*. 1999; 93: 84–93.
50. JURK M, HEIL F, VOLLMER J, SCHETTER C, KRIEG AM, WAGNER H, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*. 2002; 3(6): 499.
51. KARASNEH J, ABABNEH KT, TAHA AH, AL-ABBADI MS, OLLIER W. Investigation of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms in Jordanian

- patients with chronic and aggressive periodontitis. *Archives of Oral Biology*. 2011; 56(3): 269–276.
52. KHOURY MJ, MCCABE LL, MCCABE ERB. Population screening in the age of genomic medicine. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348(1): 50–8.
53. KINANE DF, HART TC. Genes and Gene Polymorphisms Associated With Periodontal Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2003; 14(6): 430–449.
54. KINANE DF, SHIBA H, HART TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontology 2000*. 2005; 39: 91–117.
55. KODAMA H, NOSE M, NIIDA S, YAMASAKI A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1991; 173(5): 1291–4.
56. KORNMAN KS, CRANE A, WANG HY, GIOVLNE FSD, NEWMAN MG, PIRK FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997; 24(1): 72–77.
57. KORNMAN KS, DI GIOVINE FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1998; 3(1): 327–338.
58. LAINE ML, CRIELAARD W, LOOS BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology 2000*. 2012; 58: 37–68.
59. LAINE ML, MOUSTAKIS V, KOUMAKIS L, POTAMIAS G, LOOS BG. Modeling susceptibility to periodontitis. *Journal of Dental Research*. 2013; 92(1): 45–50.
60. LANG NP, TONETTI MS, SUTER J, SORRELL J, DUFF GW, KORNMAN KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of Periodontal Research*. 2000; 35: 102–107.
61. LANGE LA, BURDON K, LANGEFELD CD, LIU Y, BECK SR, RICH SS, et al. Heritability and expression of C-reactive protein in type 2 diabetes in the Diabetes Heart Study. *Annals of Human Genetics*. 2006; 70(Pt 6): 717–25.
62. LAPP CA, LOHSE JE, LEWIS JB, DICKINSON DP, BILLMAN M, HANES PJ, et al. The effects of progesterone on matrix metalloproteinases in cultured

- human gingival fibroblasts. *The Journal of Periodontology*. 2003; 74(March): 277–288.
63. LEE YM, FUJIKADO N, MANAKA H, YASUDA H, IWAKURA Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International Immunology*. 2010; 22(10): 805–16.
64. LEVY-LAHAD E, BIRD T. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Annals of Neurology*. 1996; 40(127): 829–840.
65. LINDHE J, KARRING T, LANG NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 4<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1113p.
66. LINDHE J, HAMP SE, LOE H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. *Journal of Periodontal Research*. 1975; 10: 243–255.
67. LOOS BG, CRAANDIJK J, HOEK FJ, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER VELDEN U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of Periodontology*. 2000; 71(10): 1528–34.
68. MARIN C, HOLDERIED FS, SALVATI G, BOTTAN RE. Nível de Informação sobre Doenças Periodontais dos pacientes em tratamento em uma clínica universitária de Periodontia. *Salusvita*. 2012; 31(1): 19–28.
69. MCDEVITT MJ, WANG HY, KNOBELMAN C, NEWMAN MG, DI GIOVINE FS, TIMMS J, et al. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *The Journal of Periodontology*. 2000; 71(2): 156–163.
70. MICHALOWICZ BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 1994; 65(5 Suppl): 479–88.
71. MICHALOWICZ BS, DIEHL SR, GUNSOLLEY, JC, SPARKS, BS, BROOKS CN, KOERTGE TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *The Journal of Periodontology*. 2000; 71(November): 1699–1707.
72. MIYAZAKI T, KATAGIRI H, KANEGAE Y, TAKAYANAGI H, SAWADA Y, YAMAMOTO A, et al. Reciprocal role of ERK and NF- $\kappa$ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *The Journal of Cell Biology*. 2000; 148(2): 333–342.
73. MOREIRA PR, DE SÁ AR, XAVIER GM, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, et al. A functional interleukin-1  $\beta$  gene polymorphism is associated with

- chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*. 2005; 40: 306–311.
74. NASCIMENTO G, EMILIANO G, SILVA I, CARVALHO R, GALVÃO H. Mecanismo, Classificação e Etiologia das Reabsorções Radiculares Mechanism , Classification , and Etiology Of Root Resorptions. *Revista Da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*. 2006; 47: 17–22.
75. NUKAGA J, KOBAYASHI M, SHINKI T, SONG H, TAKADA T. Regulatory Effects of Interleukin-1  $\beta$  and Prostaglandin E 2 on Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor-  $\kappa$  B Ligand. *Journal of Periodontology*. 2004; (February): 249–259.
76. OFFENBACHER S, BARROS SP, BECK JD. Rethinking periodontal inflammation. *Journal of Periodontology*. 2008; 79(8 Suppl): 1577–84.
77. OIKONOMOU E, SIASOS G, TOUSOULIS D. Pro-Inflammatory Interleukin Genotypes Potentiate Early and Advanced Atherosclerosis Differently. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014; 64(8): 848–849.
78. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Oral health. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>. Acessado em: 09/05/2014.
79. PAGE R. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of Periodontology*. 1998; 3: 108–120.
80. PANG T, TERRY RF. WHO/PLoS Collection “No Health Without Research”: A Call for Papers. *PLoS Medicine*. 2011; 8(1).
81. PAPAPANOU PN, NEIDERUD AM, SANDROS J, DAHLÉN G. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*. 2001; 28: 389–396.
82. PARK H, YIM M. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses PGE2-induced osteoclast formation by lowering osteoclast progenitor cell viability. *Archives of Pharmacal Research*. 2007; 30(4): 486–492.
83. PARKHILL JM, HENNIG BJ, CHAPPLE IL, HEASMAN PA, TAYLOR JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000; 27: 682–689.

84. PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(1): 177–182.
85. PATIL N, BERNO AJ, HINDS DA, BARRETT WA, DOSHI JM, HACKER CR, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science (New York, N.Y.)*. 2001; 294(5547): 1719–23.
86. PIHLSTROM BL, MICHALOWICZ BS, JOHNSON NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366(9499): 1809–20.
87. PRESHAW P, ALBA A, HERRERA D. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012: 21–31.
88. PRESHAW PM. Periodontal disease and diabetes. *Journal of Dentistry*. 2009; 37(8): S575–7.
89. RAMALHO ACR, LAZARETTI-CASTRO M, COHEN-SOLAL ME, VERNEJOL MCD. Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? : mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2000; 44(6).
90. RASMUSSEN HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. 2012: 315–334.
91. REYNA E, MEJIA J, REYNA N, TORRES D, SANTOS J, PEROZO J. Concentraciones de interleucina 1 beta en pacientes con preeclampsia y embarazadas normotensas sanas. *Clínica E Investigación En Ginecología Y Obstetricia*. 2011; 38(4): 128–132.
92. ROMITO GA. Doenças Periodontais. 2012. Disponível em: <http://www.colgateprofissional.com.br/dentistas/Assunto-em-Pauta-Doencas-Periodontais/artigo>. Acessado: 10/03/2015.
93. ROSKAMP L, VAZ R, LIMA J. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*. 2006: 250–255.

94. SAKELLARI D, KATSARES V, GEORGIADOU M, KOUVATSI A, ARSENAKIS M, KONSTANTINIDIS A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006; 33: 765–770.
95. SALAZAR-PELAÉZ LM, GRISALES ROF, YEPES OEZ, VARGAS KO, CALLE D T. Polimorfismos genéticos da interleucina-1 e o risco de periodontite periapical crônica numa população de Antioquia, Colômbia. *Archives of Oral Research*. 2012; 8(1): 19–30.
96. SANKAR P, CHO M, CONDIT C. Genetic research and health disparities. *Jama*. 2004; 291(24): 2985–2989.
97. SÉFORA-SOUSA M, DE ANGELIS-PEREIRA MC. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2013; 15(4): 617–626.
98. SEGUNDO TK, FERREIRA EFE, COSTA JED. A doença periodontal na comunidade negra dos Arturo 's, Contagem, Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro*. 2004; 20(2): 596–603.
99. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*. 2005; 38: 135–87.
100. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology*. 1992; 63(4 Suppl): 322–31.
101. SUDA T, UDAGAWA N, NAKAMURA I, MIYAURA C, TAKAHASHI N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995; 17(2 Suppl): 87S–91S.
102. SURESH S. Periodontal Disease and Alzheimer's Disease - A New Link. *Indian Journal of Dental Advancement*. 2011: 463–466.
103. TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annual Review of Immunology*. 2003; 21(1): 335–76.
104. TANAKA K, MIYAKE Y, HANIOKA T, ARAKAWA M. Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. *DNA and Cell Biology*. 2014; 33(4): 227–33.

105. TAYLOR JJ, PRESHAW PM, DONALDSON PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2004; 35: 158–82.
106. TENG YT. The Role of Acquired Immunity and Periodontal Disease Progression. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2003; 14(4): 237–252.
107. THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012; 135(V): 0–9.
108. TREVILATTO, P. C., DE SOUZA PARDO, A. P., SCAREL-CAMINAGA, R. M., DE BRITO, R. B., ALVIM-PEREIRA, F., ALVIM-PEREIRA, C. C., et al. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Archives of Oral Biology*. 2011; 56(1): 54–62.
109. TRIFUNOVIĆ J, MILLER L, DEBELJAK Ž, HORVAT V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochemia Medica*. 2015; (3): 36–48.
110. VARMUS H. Getting ready for gene-based medicine. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347(19): 1526–7.
111. VIEIRA TR, PÉRET ADCA, PÉRET FILHO LA. Alterações periodontais associadas às doenças sistêmicas em crianças e adolescentes. *Revista Paulista de Pediatria*. 2010; 28(2): 237–243.
112. VIEIRA, R. W. Cardiovascular and periodontal diseases. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2014; 29(1): VII–IX.
113. WEBER A, WASILIEW P, KRACHT M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling*. 2010; 3(105).
114. WHITFIELD KE, MCCLEARN G. Genes, environment, and race: quantitative genetic approaches. *The American Psychologist*. 2005; 60(1): 104–14.
115. WILLIAMS DM. The research agenda on oral health inequalities: the IADR-GOHIRA initiative. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2014; 23 Suppl 1(suppl 1): 52–9.
116. WOOD NW. Genetic risk factors in parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 1998; 44(S1): S58–S62.

117. XIAO J, XIN X, LUAN X. A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorphism (SNP) typing. *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29: 562–565.
118. XU J, YIN Z, CAO S, GAO W, LIU L, YIN Y, et al. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. *PLoS ONE*. 2013; 8(5).
119. YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, YAMAGUCHI K, KINOSAKI M, MOCHIZUKI S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(7): 3597–602.
120. ZATZ M. Projeto genoma humano e ética. *São Paulo Em Perspectiva*. 2000: 47–52.

## 9 APÊNDICES

### APÊNDICE A – TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### **Título do projeto: Doença Periodontal Crônica em Adultos – A Relação do Polimorfismo das Interleucinas1 $\beta$ , 8 e 16**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título “Doença Periodontal Crônica em Adultos – A Relação do Polimorfismo das Interleucinas1 $\beta$ , 8 e 16” Meu nome é Renato Hannum sou o pesquisador responsável. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Renato Hannum nos telefones: (62) 8457-9798 ou (62) 3946-1443 ou através do e-mail: hannumm@hotmail.com. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia-Goiás.

A doença periodontal é uma doença multifatorial que ataca os tecidos gengivais. 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.

Serão formados dois grupos: pacientes com periodontite (em sua fase ativa) e pacientes sem periodontite (grupo controle). O sangue periférico será colhido por profissionais treinados e será retirado da veia na região do braço. O material do participante será armazenado e estocado no banco de dados do Núcleo de Pesquisas Replicon, localizado no departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Todo procedimento será realizado com cautela para evitar qualquer dano ao voluntário, incluindo assepsia local, uso de agulhas e seringas descartáveis. A punção de vasos periféricos está associada a um risco

muito pequeno e é quase livre de complicações. Podendo ocorrer hematoma local (colecção (ou seja, acúmulo) de sangue no tecido), na maioria dos casos a situação reverte espontaneamente e dor ao toque no local, que desaparecerá espontaneamente. Será extraído o DNA das células sanguíneas (leucócitos) para a pesquisa do fator genético.

**Riscos e Benefício do Estudo:** O sangue periférico será obtido por profissionais treinados e será retirado por punção venosa na região do antebraço. Todo o procedimento seguirá as precauções de rotina estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde do Brasil. Todo o material usado será estéril e descartável. A punção de vasos periféricos está associada a um risco muito pequeno, com raros episódios de complicações graves, como a septicemia. Sendo mais frequente a ocorrência de hematomas locais subcutâneos, que se reverte espontaneamente. A percepção de dor é variada para cada paciente, embora seja relatada como dor discreta e ao toque. A sensação desaparece espontaneamente. O benefício do presente estudo encontra-se descrito na justificativa acima. *A priori*, a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes à evolução da periodontite promoverá uma melhor abordagem de diagnóstico e prognóstico, que direcionará a terapêutica e a prevenção. Assim, contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados.

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

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o Dr. Renato Hannum sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste

estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, de 201\_\_.

\_\_\_\_\_ Data / /  
Assinatura do paciente/representante legal

\_\_\_\_\_ Data / /  
Assinatura da testemunha

(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.

\_\_\_\_\_ Data / /  
Assinatura do responsável pelo estudo

## APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO

## IDENTIFICAÇÃO

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ | Idade: \_\_\_\_\_ anos | Peso: \_\_\_\_\_ Kg |

Altura: \_\_\_\_\_ m

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Es

tado: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_ Celular: ( ) \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Estado Civil:

 Solteiro  Casado  Viúvo  Separado 

Outro: \_\_\_\_\_

Escolaridade:

 E. Fundamental  E. Médio  E. Superior  E. Técnico 

Outros: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

## ESTILO DE VIDA

1-Possui Alguma Doença?:  Sim  Não

Quais: \_\_\_\_\_

2-Possui algum defeito de nascimento/ desordem genética hereditária?:  Sim Não,

Quais: \_\_\_\_\_

3-Histórico Familiar de: Diabetes Alergias  Hipertensão  Câncer  
 Aborto  Alterações Congênicas

Outros: \_\_\_\_\_

6-Possui Filho(s)?:  Sim  Não. Se sim quantos?:

Se sim, algum apresenta problemas de saúde?:  Sim  Não.

Se sim, qual(is):

7-Teve algum filho com nascimento prematuro:  Sim  Não

8-O (A) Sr. (a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente pelo menos por 1 ano?Sim Não. Se sim, quantos por dia?:\_\_\_\_\_

9-Já fumou?: Sim  Não.

Se sim, quantos fumava por dia?: \_\_\_\_\_ Parou faz quanto tempo?:

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

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

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

Quantidade em copos, latas, garrafas:\_\_\_\_\_

11-Ex-etilista (alcoólatra)?: Sim  Não

Se sim, fazia uso de bebida? :

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

12-Pratica exercícios físicos?:  Sempre  As vezes  Nunca

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

Se Sim  
qual(is)?: \_\_\_\_\_

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

Se Sim  
qual(is)?: \_\_\_\_\_

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