

## ESTUDO DE POLIMORFISMO EM GENES DE CITOCINAS NA DOENÇA PERIODONTAL

Natália Mestre Braz (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ana Maria Sell (Orientadora),  
Josiane Bazzo de Alencar (pesquisadora), e-mail: amsell@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá,  
PR.

**Área e subárea do conhecimento: Imunologia – Imunogenética.**

**Palavras-chave:** Doenças periodontais, Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina-1.

### Resumo

A doença periodontal crônica (DPC) é iniciada por uma infecção bacteriana e culmina em caráter destrutivo dos tecidos de suporte do dente. Um estudo caso-controle foi realizado com o objetivo de investigar os polimorfismos em genes das citocinas pró-inflamatórias *TNF* e *IL1* e o risco de desenvolvimento da DPC em pacientes do Noroeste do Paraná. O DNA foi extraído de amostras de sangue e genotipado por PCR-SSP. A análise estatística foi realizada por um software SNPStats para obter as frequências alélicas, genóticas e haplotípicas e avaliar a associação entre os polimorfismos e a DPC. A frequência do genótipo GA no SNP do gene *TNF* -308, que corresponde à produção intermediária de TNF- $\alpha$ , apresentou-se menor em casos (14%) do que em controles (30%) revelando proteção frente a doença. Para a distribuição das frequências na região -238 G/A do *TNF* e as regiões do gene *IL1* não foi observada significância estatística. O polimorfismo de *TNF* -308 foi associado à DPC.

### Introdução

A doença periodontal crônica (DPC) é uma doença inflamatória multifatorial e progressiva que pode afetar até 90% da população mundial sendo que 10 a 15% desenvolvem formas graves e destrutivas da doença (PIHLSTROM et al, 2005). Ela acomete principalmente o tecido de suporte do dente e o osso alveolar, sendo causa comum de perda de dentes.

A periodontite crônica decorre do desequilíbrio entre a resposta imune e a presença da placa bacteriana, constituída principalmente por *Porphyromonas gingivalis*, e seus produtos antigênicos. Os fatores inflamatórios são estimulados e a presença de polimorfonucleares e monócitos no tecido periodontal caracterizam a fase aguda da doença. Quando há persistência do estímulo, macrófagos e linfócitos T são responsáveis por apresentarem o antígeno e ativar a produção de anticorpos, estabelecendo um quadro crônico (RODRIGUES, 2009). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina -1 (IL-1) são fundamentais

neste processo inflamatório e promoverem a ativação e a diferenciação dos osteoclastos. Estas células são responsáveis pela absorção e remodelação do tecido ósseo na presença dos microorganismos. Portanto, as citocinas desempenham papel essencial para a ativação e recrutamento de células imunes. Os polimorfismos em genes de citocinas podem regular a sua função e produção (HART et al, 2000).

Vários estudos relacionaram os fatores genéticos ao desenvolvimento da DPC, a fim de explicar as diferenças na susceptibilidade nos indivíduos. Polimorfismos no gene *TNF*, localizado no braço curto do cromossomo 6, podem influenciar a produção de TNF- $\alpha$ , induzindo à destruição tecidual e reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Outro gene de citocina pró-inflamatória bastante estudado é o da interleucina-1 (*IL1*), localizado no braço longo do cromossomo 2. A IL-1 é produzida principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, sua função é atuar no catabolismo da matriz extracelular, na reabsorção do tecido ósseo quando em associação com o TNF- $\alpha$  e IL-8, bem como promover a regulação de genes expressos durante a inflamação, inclusive de outras citocinas, e atuar como um potente estimulador da produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e metaloproteinases (MMPs) (FREITAS, 2007).

Novos dados a respeito dos polimorfismos em genes de citocinas podem ajudar a contribuir para o entendimento da patogênese da DPC. Além disso, auxilia no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, de terapia e prevenção. Por isso é importante caracterizar estes polimorfismos nos pacientes do estado do Paraná, a fim de traçar um perfil da região quanto à susceptibilidade ou resistência à doença.

## Materiais e métodos

Estudo do tipo caso-controle realizado em uma população mista contou com um grupo de 50 pacientes com DPC e outro grupo controle composto por 100 indivíduos, selecionados após avaliação clínica nas clínicas odontológicas das instituições Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Universidade Ingá (UNINGÁ). O grupo de pacientes com DPC possuíam pelo menos cinco locais em diferentes dentes com profundidade da bolsa periodontal (PPD)  $\geq$  5 mm, nível de inserção clínica (CAL)  $\geq$  3 mm e mais de 25% de sangramento na sondagem (BOP). O grupo de controles foram formados por indivíduos com baixo CAL, PPD  $<$  4 mm e BOP  $<$  25%. Todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram informados sobre a natureza do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana da UEM (CAAE 61544916.4.000.0104).

Baseado em outros estudos, indivíduos portadores de doenças sistêmicas como: diabetes *mellitus*, osteoporose, reumatismo, bem como fumantes e ex-fumantes com menos de 10 anos de abstinência, foram excluídos do estudo para eliminar o risco de ocultar a relação polimorfismo-doença.

De cada indivíduo coletou-se 4 mL de sangue periférico e, a partir dele, extraído o DNA pelo método *salting out*. A concentração e a qualidade do

DNA foram verificadas por densidade óptica (Nanodrop 2000™). O DNA foi diluído a fim de obter a concentração ideal para a técnica de genotipagem. Os polimorfismos nas regiões promotoras do *TNF* -238G/A (rs361525) e *TNF* -308G/A (rs1800629), dos genes *IL1A* e *IL1B*, *IL1A* -889C/T (rs1800587), *IL1B* -511C/T (rs16944) e região de transcrição +3962C/T (rs1143634) foram determinados por PCR-SSP utilizando-se kit de genotipagem específico (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). O DNA foi amplificado e analisado o tamanho dos fragmentos das regiões de estudo após corrida de eletroforese em gel de agarose a 3%. A interpretação dos resultados foi organizada em uma planilha que acompanha o kit. Para o cálculo das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas utilizou-se o software SNPStats. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas por Qui-quadrado e o risco de desenvolver a DPC foi calculado por meio da determinação do Odds Ratio – (OR) e do intervalo de confiança. O p-valor (P) foi considerado significativo quando menor que 0,05.

## Resultados e Discussão

A distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs avaliados estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os alelos selvagens (C) dos polimorfismos de *IL1* apresentaram-se em maior frequência tanto em casos como em controles, assim como para os polimorfismos de *TNF* o alelo (G) se manteve maior em ambos os grupos, não havendo diferença estatística significativa. A frequência do genótipo GA no gene *TNF* -308 foi menor nos casos (14%) do que nos controles (30%), sendo possível observar significância estatística nesta região. Desta maneira, indivíduos que possuem a forma heterozigota foram mais resistentes a desenvolverem a doença em relação aos que portam a forma homozigota (Tabela 1).

**Tabela 1:** Frequência genotípica do polimorfismo no gene do *TNF* -308 G/A em pacientes com doença periodontal crônica e controles.

Genótipos	Casos n(f) N = 50	Controles n(f) N = 100	P-valor	OR (IC 95%)
<i>TNF</i> -308				
GG	43 (0,86)	70 (0,70)		
GA	7 (0,14)	30 (0,30)	0,026	0,38 (0,15 – 0,94)

n: número; f: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança.

Neste estudo caso-controle, investigamos o possível papel do polimorfismo nos genes *TNF* e *IL1* no mecanismo imunopatogênico da DPC na população do Noroeste do Paraná. Um polimorfismo na região -308 G/A influencia o nível de secreção desta citocina e a variação na resposta inflamatória, ou seja, quando acontece uma mutação do alelo G pelo A altera a transcrição levando ao aumento em até cinco vezes na síntese de TNF- $\alpha$ , logo

pacientes que possuem a forma homozigota GG e AA apresentam uma baixa e uma alta produção da citocina, respectivamente e o heterozigoto GA uma produção intermediária (YÜCEL, 2015). O polimorfismo na região -238 do *TNF*, bem como na *IL1A* -889, *IL1B* -511 e +3962 também altera o nível de produção das citocinas como observado em outros estudos, porém na população deste trabalho não foi encontrada associação entre esses outros polimorfismos e a DPC. Em relação à distribuição da frequência haplotípica dos SNPs avaliados não foi observado diferença entre a população caso e controle associado à DPC.

## Conclusões

Os indivíduos portadores da forma heterozigota (GA) do *TNF* -308, que corresponde à produção intermediária de TNF- $\alpha$ , apresentam uma resistência ao desenvolvimento da imunopatogênese da DPC. Contudo, para os polimorfismos da região -238 G/A do *TNF* e nas regiões estudadas do gene *IL1* não foram observadas associação com a DPC.

## Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG – UEM) pelo incentivo científico e financeiro. Aos pacientes que contribuíram para o desenvolvimento do estudo, à orientadora Ana Maria Sell e aos integrantes do grupo de estudos sobre a Doença Periodontal, em especial à doutoranda Josiane Bazzo de Alencar.

## Referências

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, 2005.

RODRIGUES, A. Z et al. Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente periodontal. **Periodontia**, v. 19, n. 1, p. 14-21, 2009.

HART, T. C.; MARAZITA, M. L.; WRIGHT, J. T. The impact of molecular genetics on oral health paradigms. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 26-56, 2000.

FREITAS, N. M. **Avaliação da associação entre o polimorfismo dos genes IL-1A (-889), IL-1B (-511), IL-1B (+ 3954), IL-1RN (ínton2-VNTR) e TNFA (-308) e a periodontite agressiva**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2007.

YÜCEL, Ö. Ö et al. Analysis of TNF- $\alpha$  (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF- $\alpha$  levels in aggressive and chronic periodontitis: A preliminary report. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 173-177, 2015.