

POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS HUMANOS –HPA-2 E A DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Josiane Bazzo de Alencar (pesquisadora), Ana Maria Sell (orientadora), e-mail: amsell@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia/Imunogenética.

Palavras-chave: Periodontite Crônica, Antígenos de Plaquetas Humanas, Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

Resumo

A doença periodontal crônica (DPC) é uma doença multifatorial, polimicrobiana causada por estímulo de bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis* que se acumulam no sulco gengival. O processo inflamatório é um dos fatores responsáveis pelo dano tecidual e posterior perda dos dentes. Nas membranas das plaquetas há glicoproteínas (GP) que carregam os antígenos plaquetários humanos (HPA), cujos genes que os codificam são polimórficos. Como resultado do polimorfismo há formação de aloantígenos decorrentes de diferentes epítomos. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do polimorfismo de antígenos plaquetários humanos, HPA-2, na patogênese da DPC. O HPA-2 foi genotipado em 100 pacientes com DPC e 100 controles pela técnica de PCR-SSP. Os critérios de inclusão da amostra foram indivíduos não fumantes, não relacionados e com idade entre 30 a 65 anos e mínimo de 20 dentes na arcada dentária; pacientes com pelo menos 5 sítios com presença de bolsa periodontal; os critérios de exclusão foram pacientes com periodontite agressiva, indivíduos diagnosticados com doenças inflamatórias e diabetes. As frequências dos alelos HPA-2a e HPA-2b para pacientes e controles foram 84% e 16%, 88% e 12% respectivamente. As frequências dos genótipos A/A, A/B e B/B para pacientes e controles foi 70%, 29% e 1%; 78%, 21% e 1%, respectivamente. As frequências alélicas encontradas se aproximaram dos resultados de outros estudos e não foi observada associação entre o polimorfismo de HPA-2 Thr145Met (482C/T) e DPC. O estudo pretendeu contribuir para a caracterização genética dos pacientes com a doença periodontal e auxiliar no prognóstico e tratamento.

Introdução

A doença periodontal crônica (DPC) é uma doença polimicrobiana multifatorial causada principalmente por estímulos de bactérias gram-

negativas que se acumulam no sulco gengival, principalmente *Porphyromonas gingivalis*. A maior causa de dano tecidual é devido ao processo inflamatório, resultando na formação de bolsas periodontais e destruição do ligamento periodontal e suporte ósseo adjacente que em casos extremos leva a perda de dentes. A imunopatogênese da DPC está relacionada com seu curso clínico e os mecanismos genéticos podem ter impacto nas desordens inflamatórias.

As plaquetas têm origem nas células indiferenciadas da medula óssea, sendo importante no processo de coagulação sanguínea além de desempenhar papel importante nos processos inflamatórios e regeneração tecidual. As plaquetas expressam muitas moléculas imunomoduladoras (por exemplo, P-selectina, TLR, CD40L) e citocinas (por ex., IL-1 β e TGF- β) e tem a capacidade de interagir com várias células do sistema imunológico. Devido a isso, as plaquetas são capazes de influenciar tanto a resposta inune inata quanto a adaptativa (LI *et al.*, 2012).

Nas membranas plasmáticas das plaquetas há glicoproteínas de membrana (GP) que carregam os antígenos plaquetários humanos (HPA), cujos genes que os codificam são polimórficos. A substituição de um aminoácido gera mudanças na estrutura terciária das GPs resultando no reconhecimento aloimune para diferentes epítomos (CURTIS e MCFARLAND, 2013).

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único de HPA-2 na posição Thr145Met na patogenia da doença periodontal crônica.

Materiais e métodos

Neste estudo foram avaliados 100 pacientes diagnosticados com a doença periodontal e 100 indivíduos que não apresentem a doença periodontal (grupo controle) de mesma origem geográfica e faixa etária. Todos os pacientes e controles foram avaliados e selecionados nas Clínicas Odontológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e do Centro Universitário Ingá, ambas localizadas na cidade de Maringá-PR. Os seguintes critérios de seleção foram considerados: *i*- critérios de inclusão: indivíduos não relacionados, não fumantes, com idade entre 30 e 65 anos e arcada dentária com no mínimo 20 dentes; os pacientes com DPC apresentaram pelo menos cinco sítios em diferentes dentes, com presença de bolsa periodontal > 5 mm e perda de inserção >3 mm; os controles apresentaram menos que 30% de sangramento à sondagem e nenhuma bolsa periodontal >4 mm. *ii*- critérios de exclusão: indivíduos com doença periodontal agressiva, infecção aguda, diabetes ou que fizeram tratamento periodontal nos últimos seis meses; indivíduos do grupo controles não poderiam ter apresentado nenhum quadro de doença periodontal anteriormente.

A extração de DNA foi realizada pela técnica de *salting-out* modificada a partir de 10 mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA. A genotipagem foi realizada pela técnica de PCR-SSP de acordo com Nie *et al.* (2010) com alterações. Para a amplificação foi utilizado um *primer*

específico para cada alelo e um de uso comum que amplificou um fragmento de 244 pb. Somado a isso, foi adicionado um par *primers* para o gene do hormônio de crescimento humano (HGH) que amplificou um fragmento de 434 pb como controle interno da reação. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas OpenEpi versão 3.01 e SNPStats para os cálculos de qui-quadrado, odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerou-se o valor de $p \leq 0,05$ com significância estatística.

Resultados e Discussão

O polimorfismo de *HPA-2* Thr145Met foi analisado em 100 pacientes com DPC e 100 controles. Ambos os grupos estavam pareados quanto a sexo e idade, $P = 0,384$ e $P = 0,370$, respectivamente. A média de idade no grupo dos pacientes foi $46,97 \pm 8,84$ e do grupo controle $46,77 \pm 10,21$. A distribuição dos genótipos dos SNPs analisados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Comparando-se as frequências alélicas e genóticas, entre os pacientes com DPC e o grupo controle, para o polimorfismo de *HPA-2* Thr145Met não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 1). A estratificação no grupo dos controles e pacientes, para gênero e idade, também não se mostrou com diferenças estatísticas. Desta forma, não foi observada associação entre o polimorfismo de *HPA-2* e a DPC.

Tabela 1: Distribuição das frequências dos alelos e genótipos de *HPA-2* e comparação entre os grupos de pacientes com doença periodontal crônica e controles.

		Amostra total	Pacientes DPC	Controles	<i>P</i>
		N=100	N=100	N=100	
		n (%)	n (%)	n (%)	
<i>HPA-2</i> Thr145Met					
Alelos	HPA-2a	346 (86)	169 (84)	177 (88)	0,24
	HPA-2b	54 (14)	31 (16)	23 (12)	
Genótipos	A/A	148 (74)	70 (70)	78 (78)	0,14
	A/B	50 (25)	29 (29)	21 (21)	
	B/B	2 (1)	1 (1)	1 (1)	

n= número; *P*= p-valor

A distribuição das frequências e genótipos de *HPA-2* na população deste estudo foi semelhante ao observado por Silvestre e colaboradores (2017) que analisaram a distribuição destes alelos na população brasileira de etnias caucasiana e em descendentes de japoneses. Na população de mesma etnia (brancos), a frequência dos alelos de nosso estudo de daquele foram respectivamente igual a 86%vs 84,4% para *HPA-2a* e 15,6% vs 14% *HPA-*

2b. Estes dados corroboram com a qualidade dos resultados encontrados no presente estudo.

Os antígenos plaquetários humanos foram largamente estudados para doenças oclusivas coronarianas e cerebrais. Abboud e colaboradores (2010) reportaram que os alelos *HPA-1b* e *HPA-2b* tiveram menor frequência em controles que em pacientes com doença arterial coronariana grave. O mesmo estudo mostrou que o haplótipos *HPA-1a/2a* e *HPA-1b/2b* aumenta o risco da doença (OR=3,63 e OR=2,92, respectivamente).

Até o momento esse foi o primeiro estudo que avaliou a influência do polimorfismo de HPA na DPC. Esses resultados contribuem para a caracterização genética dos pacientes com a doença periodontal e auxiliar no prognóstico e tratamento. Estudos adicionais são necessários para compreender o papel destes polimorfismos na patogênese da DPC.

Conclusões

A associação entre o polimorfismo de *HPA-2 Thr145Met* (482C/T) e a DPC não foi observada, tanto para alelos quanto para genótipo.

Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à Fundação Araucária e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG – UEM) pelo incentivo científico e financeiro. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de fazer o curso e ao LIG–UEM por me conceder a possibilidade de desenvolver a pesquisa. Aos pacientes que contribuíram para o desenvolvimento do estudo.

Referências

ABBOUD, N. *et al.*, Polymorphisms of human platelet alloantigens HPA-1 and HPA-2 associated with severe coronary artery disease. **Cardiovascular Pathology**, v. 19, n. 5, p. 302-307, 2010.

CURTIS, B.R.; MCFARLAND, J.G. Human platelet antigens – 2013. **Vox Sanguinis**, v. 106, n. 2, p. 93-102, 2014.

LI, C. de *et.al.* Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. **Advances in Hematology**, v. 2012, 2012.

NIE, Y.M. *et al.* The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors. **Transfusion Med**, v. 20, n. 6, p.376-382, 2010.

SILVESTRE, A. P. A. *et al.* Genetic polymorphism of human platelet antigens in Euro-African and Japanese descendants from Parana, Southern Brazil. **Platelets**, v. 28, n.14, p.607-610, 2017.