

Biblioteca Prof. Penildon Silva – ICS- UFBA

C939 __ Juiz, Paulo José Lima

Estudo de Associação entre HLA e Periodontite Crônica Severa/**Paulo José Lima Juiz – Salvador, 2005.**
77f.:il.

Orientadora: Profa. Dra Denise Carneiro Lemaire

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Imunologia, 2005.

1.HLA. 2.Polimorfismo. 3. Periodontite. I. Lemaire, Denise Carneiro. II. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

C.D.U.: 577.27

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de crescimento.

A meus Pais, os meus primeiros mestres.

A Reinaldo, pelo apoio e incentivo em todos os momentos que precisei.

A meus irmãos, que souberam falar quando necessário e ouvir quando preciso.

A Dra Denise Lemaire, mais que uma orientadora, uma amiga que não mediu esforços para meu crescimento.

A Dr. Urbino Tunes, pelos ensinamentos prestados.

A Profa. Dra Eneida e Profa. Dra. Paloma Telles pelas sugestões e contribuições prestadas.

A Terezita, grande parceira e “professora” querida.

A Dra Luiza Fonseca, minha orientadora de iniciação científica, responsável pelo início de tudo.

A Livia Pugliese, minha colega de trabalho, pela nossa vitória.

A Dilcéia pelo empenho e dedicação ao Programa de Pós-graduação em Imunologia.

A Sonia e Aedil pela presença e amizade.

Aos estagiários, funcionários e amigos do Laboratório que direta ou indiretamente contribuíram com o Projeto.

Aos funcionários da FBDC pelo apoio.

Aos pacientes pela contribuição voluntária.

A Todos que fizeram desta experiência mais uma etapa de crescimento como ser humano e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 A DOENÇA PERIODONTAL	13
1.2 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH) HUMANO - HLA (Antígeno Leucocitário Humano)	18
1.3 HLA E DOENÇAS	21
1.4 HLA E DOENÇA PERIODONTAL	22
1.5 HLA E GRUPOS ÉTNICOS	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	31
3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA	32
3.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	33
3.4 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO	34
3.5 GENOTIPAGEM HLA-DR, -DQ	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICES	62
A - ANATOMIA DO PERIODONTO	63
B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	64
C - FICHA PERIODONTAL OU PERIOGRAMA	67
D - FICHA DE ANAMNESE	68
E – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO (POP) PARA EXAME PERIODONTAL	70
ANEXOS	74
A - MAPA DE TIPAGEM HLA	75
B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DA FBDC	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos do grupo de pacientes com periodontite crônica severa e do grupo controle.	p.37
Tabela 2 – Parâmetros clínicos de avaliação periodontal utilizados na análise estatística.	p.38
Tabela 3 - Frequência dos alelos HLA-DRB1*,-B3*,-B4*,-B5*,-DQB1* nos pacientes com periodontite crônica severa (PCS) e no grupo controle (GC).	p.39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa esquemático dos <i>loci</i> CPH humano.	p.19
Figura 2- Distribuição das frequências do locus DRB1.	p.40
Figura 3 – Distribuição das frequências dos alelos HLA-DRB3*,-B4*,-B5*.	p.40
Figura 4 – Distribuição das frequências do <i>locus</i> DQB1.	p.41
Figura 5 – Análise comparativa das frequências de alelos HLA em amostras de estudos realizados no Brasil para o <i>locus</i> DRB1.	p.42
Figura 6 – Análise comparativa das frequências dos alelos HLA em amostras de estudos realizados no Brasil para o <i>locus</i> DQB1	p.42
Figura 7 - Análise comparativa das distribuições de frequência do grupo alélico <i>HLA-DRB1*15</i> entre o grupo PCS do projeto e estudos realizados no Brasil.	p.43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CPH – Complexo Principal de Histocompatibilidade

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP - Doença Periodontal

EBMSP/FBDC - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

EDTA – Ácido diaminotetracético

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

ICS/UFBA - Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

IDDM - Diabetes mellitus insulino dependente

IFN- γ - Interferon- γ

IL – Interleucina

IPV - Índice de placa visível

ISG - Índice de sangramento gengival

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP - Proteína quimiotática de monócitos

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos

NIC - Nível de inserção clínica

OMS - Organização Mundial da Saúde

PC - Periodontite Crônica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCS - Periodontite Crônica Severa

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PS - Profundidade de sondagem

RANTES - *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RE - Retículo endoplasmático

RG - Recessão gengival

TAP – Transportador associado com processamento de antígeno

TGF- β - Fator de crescimento transformante- β

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

UTU - Unidade de Triagem e Urgência

RESUMO

A doença periodontal (DP) é representada por um conjunto de processos inflamatórios e infecciosos que acometem os tecidos periodontais, de etiologia multifatorial, localização sítio-depedente, caracterizada pela interação microrganismo-hospedeiro na superfície do periodonto. Tradicionalmente, a periodontite era analisada estritamente segundo o agente etiológico bacteriano resultado de uma infecção subgingival por um biofilme dental onde os principais microrganismos colonizadores são *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tanerella forsythensis*. Somente parte da variabilidade da doença periodontal na população pode ser explicada levando em questão a etiologia bacteriana. É sabido que a susceptibilidade a DP esta relacionada também a uma predisposição genética. No presente estudo foi investigada a associação entre o HLA e a Periodontite crônica severa (PCS) em pacientes mestiços, na faixa etária de 30 a 50 anos, sem distúrbios sistêmicos, residentes em Salvador-BA. Um total de 84 indivíduos foi estudado, sendo 43 pacientes com periodontite crônica severa e 41 indivíduos sem periodontite que constituíram o grupo controle. A avaliação dos parâmetros clínicos se fez por meio do índice de placa visível, índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem, recessão gengival, nível de inserção clínica, grau de mobilidade dental e grau de envolvimento de furca. Dentes com coroa totalmente destruída por cárie, com aparelho ortodôntico fixo e parcialmente erupcionados foram excluídos do estudo. A determinação dos alelos dos *loci* DRB e DQB foi feita pelo método PCR-SSP. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos alelos identificados no grupo de pacientes com PCS e no grupo controle.

Palavras-chave: HLA, polimorfismo, periodontite.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of the supporting tissues of the teeth. The gram negative facultative anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Tanerella forsythensis* are implicated as the pathogens in periodontitis. In recent years, convincing evidence has emerged that individual susceptibility to the microbial challenging is determined in part by a genetic predisposition. The aim of the present study was therefore to investigate the incidence of HLA association in 43 patients with severe chronic periodontitis in comparison to 41 probands without periodontitis, age of 30-50 years, mestizos, living in Salvador- BA. The clinical assessment included determination of the following parameters: anamnese, visible plaque index, sulcular bleeding index, clinical probing depth, clinical attachment loss and mobility. HLA typing was performed using molecular (PCR-SSP) techniques to DRB and DQB *loci*. No association with HLA allele frequencies was found in patients relative to controls.

Key words : HLA, polymorphism, periodontitis

1. INTRODUÇÃO

A precária saúde bucal da população brasileira representa hoje um grave problema social, que requer políticas federais de controle, ampliação do atendimento e melhoria das condições de atenção básica à população, resgatando assim a idéia de saúde bucal como inclusão social.

Dados do Ministério da Saúde indicam que há no País cinco mil adolescentes desdentados e sem reabilitação oral. Somente 20% dos idosos têm 20 ou mais dentes na boca. Entre os adultos esse percentual sobe para 54%. Na faixa etária entre 15 e 19 anos, apenas 55% dos adolescentes têm todos os dentes presentes na boca (APCD, 2004). Esse quadro é em parte resultado de duas doenças que acometem os dentes e os tecidos de sustentação do elemento dental: a cárie e a doença periodontal, esta última foco deste estudo.

1.1 A DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal (DP) é descrita como um conjunto de processos inflamatórios e infecciosos que acometem os tecidos periodontais, de etiologia multifatorial, localização sítio-dependente e considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das duas principais enfermidades de risco para a saúde bucal (PINTO, 1994).

O processo inflamatório é desencadeado e perpetuado por bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsythensis* e *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans, que colonizam o biofilme dental subgingival (DARVEAU e cols., 1997).

Na doença periodontal, as bactérias e seus produtos como os ácidos butírico e propiônico interagem com o epitélio juncional, possibilitando a invasão no tecido conjuntivo subjacente. Mediadores pró-inflamatórios sintetizados pelo epitélio juncional, como IL-1(interleucina-1), PGE₂ (prostaglandina E₂) e estruturas da parede celular bacteriana, como o LPS (lipopolissacarídeo), ativam as células endoteliais e aumentam a permeabilidade do plexo vascular adjacente, o que possibilita a evasão de um grande número de leucócitos, especialmente neutrófilos, que migram através do epitélio juncional para o sulco gengival e bolsa periodontal.

A amplificação da resposta inflamatória local é induzida pela ativação do sistema complemento, aumento de infiltrado leucocitário predominantemente de linfócitos T, B, neutrófilos, macrófagos e citocinas, incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α (fator de necrose tumoral- α), TGF- β (Fator de Crescimento Transformante- β), IFN- γ (Interferon- γ), bem como quimiocinas, incluindo MCP (Proteína Quimiotática de Monócitos), MIP (Proteína Inflamatória de Macrófagos) e RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*).

Devido à proliferação apical do biofilme supragengival e subgingival, células localizadas apicalmente ao epitélio juncional são estimuladas a proliferarem se estendendo ao longo da superfície radicular, subsequentemente sendo convertidas em um epitélio ulcerado da bolsa periodontal. Com a progressão da doença e o aprofundamento da bolsa periodontal, os componentes da matriz extracelular são destruídos e o osso alveolar reabsorvido (TONETTI, 1997).

Estudos pertinentes sobre a etiopatogenia das doenças periodontais sugerem que a progressão da DP pode ser agravada ou potencializada por diabetes mellitus insulino dependente (IDDM), infecção por HIV, tabagismo (GENCO, 1996; LINDHE, 1999; YOSHIMITUS e cols., 1998), alterações neutrofílicas (PAGE & KORNMAN, 1997).

Os estudos que avaliaram o efeito do tabagismo na saúde periodontal sugerem que o cigarro é o principal fator de risco para periodontite. Em 1994, Bergstrom e Preber reportaram que o hábito de fumar deveria ser considerado o fator principal para periodontite crônica (SBARAGLIA e cols., 2002).

As formas mais severas de doença periodontal são mais frequentes em adolescentes e adultos jovens do que em idosos. Inúmeros trabalhos vêm confirmando que tanto gengivites como periodontites são mais freqüentes em homens do que em mulheres, provavelmente em virtude da pior higiene bucal e menor freqüência de visitas ao dentista. Na avaliação da prevalência de bolsas periodontais por grupo etário, MACHION e cols. (2000) observaram uma maior prevalência e aumento da profundidade de sondagem em sítios dos elementos dentais de indivíduos acima de 31 anos.

Clinicamente, a periodontite caracteriza-se por perda de inserção do ligamento periodontal, perda óssea alveolar, existência de bolsas periodontais e inflamação gengival. Também podem estar presentes recessão gengival, sangramento gengival após sondagem, aumento da mobilidade, migração e esfoliação dentária (SOCRANSKY e cols., 1984; LÖE e cols., 1986; JEFFCOAT & REDDY, 1991). As características histopatológicas da periodontite incluem localização do epitélio juncional apicalmente à junção cimento-esmalte, perda das fibras colágenas subjacentes ao epitélio da bolsa, perda óssea, numerosos leucócitos polimorfonucleares no epitélio juncional e no epitélio da bolsa e um denso infiltrado celular inflamatório com presença de

plasmócitos, linfócitos e macrófagos (SELVIG, 1966; PAGE e cols., 1975; PAGE & SCHROEDER, 1976; SEYMOUR & GREENSPAN, 1979).

Segundo a Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999) a periodontite crônica (PC) é uma doença infecciosa que resulta na inflamação dos tecidos de suporte dentário, com progressiva perda de inserção do ligamento periodontal e perda óssea alveolar. A PC é caracterizada pela formação de bolsa periodontal e/ou recessão gengival e é reconhecida como a mais freqüente forma de periodontite. A prevalência e severidade da doença aumentam com a idade e o número de dentes afetados; a taxa de progressão varia de indivíduo para indivíduo.

A maioria da destruição tecidual que ocorre na PC está relacionada à presença de fatores locais. Cálculo subgengival é um achado característico, bem como a variabilidade da microbiota patogênica, com moderada progressão de destruição tecidual, podendo aparecer surtos de rápida progressão. A PC pode ser classificada com base na sua severidade e extensão, sendo modificada por doenças sistêmicas como diabetes e infecção por HIV, tabagismo e estresse.

A Periodontite crônica é classificada como localizada, quando um número menor ou igual a 30% dos sítios dos dentes presentes na cavidade bucal forem afetados e generalizada se um número maior que 30% forem afetados. A severidade da doença pode ser descrita para toda a dentição, como também para um elemento dental individual e um sítio afetado. A análise da perda de inserção periodontal mensurada clinicamente classifica a PC como: leve (perda de inserção periodontal entre 1 e 2 mm), moderada (perda de inserção periodontal entre 3 e 4mm) ou severa (valores iguais ou acima de 5mm).

Sabe-se que a progressão da doença periodontal é de natureza episódica. Alguns sítios podem apresentar surtos de destruição seguidos de períodos de quiescência,

aspectos importantes para identificação da atividade da doença, que é sítio-dependente, e para prevenção da destruição periodontal. Porém os parâmetros clínicos tradicionais, como a medida de profundidade de sondagem, os índices de biofilme dental e sangramento gengival, o nível de inserção clínica e os aspectos radiográficos da perda óssea, representam apenas o resultado de destruição periodontal progressa. Logo, a identificação de marcadores microbiológicos, genéticos e bioquímicos, tanto da microbiota relacionada quanto do próprio hospedeiro, poderiam trazer informações para o tratamento e prevenção da progressão da doença periodontal.

Lõe e cols. (1986) no clássico estudo longitudinal sobre a história natural da DP no homem observaram que em uma amostra de indivíduos com deficiente higiene oral e sem acesso a tratamento dentário, alguns deles desenvolveram rapidamente a doença, enquanto outros desenvolveram mais lentamente ou até mesmo não desenvolveram. Estas observações levaram os autores a sugerir a existência de fatores genéticos de predisposição para o desenvolvimento da doença periodontal e abriu um novo campo para os estudos em periodontia, sob o ponto de vista da imunologia e da genética.

Vários estudos sugerem que o perfil clínico da doença é consistente com a herança genética (BEATY, 1987; BOUGHMAN, 1986; HART e cols., 1992; LONG e cols., 1987; SCHENKEIN e DYKE, 1994). A herança de determinados alelos poderia predispor indivíduos ao desenvolvimento da periodontite quando eles estivessem expostos a periodontopatógenos, devido a uma resposta imuno-inflamatória exacerbada (SCHENKEIN & VAN DYKE, 1994).

O advento da biologia molecular possibilitou o aparecimento de novas áreas de estudo entre elas a epidemiologia molecular. A hipótese levantada nesta área é que a infecção microbiana atuaria como agente desencadeador de uma resposta imunológica inadequada ou não modulada em hospedeiro geneticamente susceptível, levando à

destruição tecidual. Fatores não genéticos como o sócio-econômico, a dieta e o consumo de cigarros podem ser igualmente importantes no perfil de risco destes indivíduos. Seria possível, então, caracterizar um perfil de susceptibilidade, incorporando componentes genéticos e ambientais.

Alguns estudos relatam que a periodontite pode ser tratada com sucesso quando se realiza um bom controle de placa. Entretanto, os autores ressaltam que há uma variação na resposta ao tratamento entre pacientes e entre os sítios afetados de um mesmo paciente. Estudos longitudinais são realizados com o objetivo de explicar diferentes respostas ao acúmulo de biofilme dental e perda de dentes, baseando-se em susceptibilidade genética (CATTABRIGA e cols., 2001; MACHULLA e cols., 2002; ZHANG e cols., 2004).

Nessa relação, podemos considerar o estudo do polimorfismo do HLA e de genes que codificam citocinas que estão diretamente envolvidos na regulação da resposta imunológica.

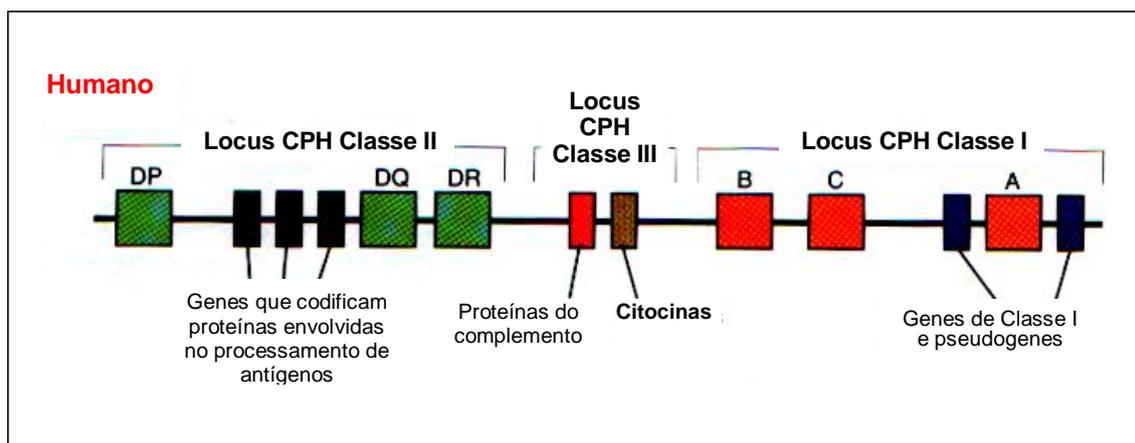
1.2 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH) HUMANO – HLA (Antígeno Leucocitário Humano)

A descrição do CPH aconteceu no modelo murino na década de 20, por Snell e colaboradores. A descoberta do CPH em humano, só ocorreu na década de 60 por Jean Dausset e cols., após o advento das técnicas de transplante de órgãos alogênicos e transfusão sanguínea alogênica como tratamento de uso corrente na Medicina. Foi observado que o soro de pacientes que desenvolviam reações contra o sangue ou órgão recebido continha anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície dos leucócitos do

doador, surgindo daí a terminologia HLA ou Antígeno Leucocitário Humano (MADDEN, 1995).

O Sistema HLA está localizado no braço curto do cromossomo seis e ocupa 0,1% do genoma humano; os genes que compõem este sistema codificam moléculas de membrana cuja função é a apresentação de peptídeos antigênicos ao linfócito T, portanto, moléculas envolvidas na regulação da resposta imune. Didaticamente o sistema HLA é dividido em três regiões (classe I, classe II e classe III). As moléculas de HLA classe I clássicas são: HLA-A, -B, -Cw, e as de classe II: HLA-DR, -DQ, -DP. Alguns componentes do sistema complemento (C2, C4 e BF), a enzima 21- hidroxilase (CYP21), as proteínas do choque térmico 70 (Hsp70) e o fator de necrose tumoral (TNF) são codificados por genes localizados na região de classe III.

Figura 1: Mapa esquemático dos *loci* CPH humano.



No mapa esquemático destaca-se, da esquerda para a direita: a região de classe II, com os *Loci* DP, DQ e DR; a região de classe III, destacando os genes que codificam proteínas do sistema complemento e o gene de TNF- α e a região de classe I, com os *Loci* B, C e A.

As moléculas de classe I são heterodímeros constituídos de uma cadeia pesada glicoprotéica transmembrana (44kDa) associadas não covalentemente com a β_2 - microglobulina (12kDa). A β_2 - microglobulina está associada com a região extracelular da cadeia pesada e é necessária para a expressão e estabilização da molécula na superfície celular. A região extracelular da cadeia pesada da classe I está dividida em três domínios designados α_1 , α_2 , α_3 , cada qual consistindo de aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos.

Os domínios α_1 e α_2 são pareados de modo a formar uma lâmina β -pregueada com oito fitas. Esta lâmina apresenta duas α -hélices superiores que formam uma fenda no topo da molécula. Esta fenda é o local para ligação dos fragmentos de peptídeos antigênicos pelas moléculas de classe I.

A maior parte do polimorfismo das moléculas de classe I é devido às diferenças nas seqüências de resíduos de aminoácidos agrupados nos domínios α_1 e α_2 da cadeia pesada. O domínio α_3 é altamente conservado.

As moléculas de classe II são heterodímeros constituídos de duas glicoproteínas transmembrana não-covalentemente ligadas, uma cadeia α (33-35 kDa) e uma cadeia β (26 a 28 kDa). Os polipeptídeos α e β são divididos em domínios, designados α_1 , β_1 , α_2 , β_2 , cada qual consistindo de aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos. Os domínios amino-terminais α_1 e β_1 das cadeias α e β contêm os resíduos polimórficos, enquanto os domínios α_2 e β_2 são altamente conservados e homólogos aos domínios das regiões constantes das imunoglobulinas. Uma região de aproximadamente 12 aminoácidos conecta o segundo domínio extracelular à região transmembrana hidrofóbica (23 aminoácidos) e a um pequeno domínio intracitoplasmático (8 a 15 aminoácidos). Os domínios α_1 e β_1 formam a fenda de ligação na parte superior da molécula. Como nas moléculas de classe I, a variabilidade de resíduos de aminoácidos

que revestem a fenda de ligação para o peptídeo antigênico cria diferenças nas especificidades de ligação com o peptídeo antigênico.

As moléculas de HLA de classe I estão presentes em praticamente todas as células somáticas nucleadas, embora não sejam detectadas em alguns tipos celulares como células cerebrais e trofoblastos. Os genes de classe I são regulados positivamente por citocinas como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Alguns vírus como o HIV ou tumores malignos podem suprimir a expressão de classe I. Já as moléculas de classe II estão presentes principalmente nos fagócitos mononucleares, células dendríticas, células B, linfócitos T ativados; também podem ser induzidas por IFN- γ em muitos tipos celulares e moduladas por outras citocinas como IL-4, TNF- α .

O Sistema HLA é altamente polimórfico; cada um dos genes HLA possui múltiplos alelos na população, constituindo o sistema genético codificador mais polimórfico do genoma humano. O motivo pelo qual a diversidade alélica dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (ou o polimorfismo das moléculas codificadas por esses genes) tem sido conservada durante a evolução ainda não está esclarecido. Assim, o papel do polimorfismo dessas moléculas, na determinação de susceptibilidade ou resistência às doenças, tem merecido atenção. O rastreamento de alelos de histocompatibilidade, em diversos grupos étnicos de diferentes áreas geográficas, sugere que a conversão gênica e a mutação de ponto são os principais mecanismos de geração de diversidade alélica em nível populacional, sendo que os locais de maior polimorfismo se encontram nas regiões das cadeias α e β , que estão em contato com os peptídeos antigênicos. (DONADI e cols., 2000)

1.3 HLA E DOENÇAS

A associação de um alelo HLA com uma determinada doença pode refletir o envolvimento direto da molécula do HLA em sua etiologia, ou o desequilíbrio de ligação entre um gene do HLA e outro gene diretamente envolvido no processo patológico (URBAN e cols., 1996). Com relação ao envolvimento direto da molécula do HLA existem atualmente algumas hipóteses que tentam esclarecer como ocorre esse envolvimento: 1) uma determinada molécula do HLA agiria como receptor para o patógeno facilitando a sua entrada na célula; 2) apenas uma molécula do HLA em particular, possui a fenda de ligação apropriada capaz de acomodar um determinado peptídeo que, quando ligado a esta molécula, forma um complexo potencialmente imunogênico favorecendo assim, o desenvolvimento da doença; 3) um receptor de célula T, que reconhece o complexo “peptídeo-molécula de HLA” é o responsável pela doença; 4) um produto do gene TAP, cujo *locus* está na região de classe II, e que normalmente transporta peptídeos do citoplasma para o retículo endoplasmático (RE), seria defeituoso e este defeito predisporia à doença alterando a concentração de peptídeos no RE e, conseqüentemente, a densidade de moléculas de classe I na superfície celular; 5) uma molécula HLA associada à doença imunologicamente similar a epítomos antigênicos do patógeno (mimetismo molecular), levaria ao reconhecimento desta como antígeno estranho, ou, alternativamente, essa similaridade impediria que o micróbio fosse reconhecido como estranho e os mecanismos efetores desencadeados; 6) a autoimunidade, como no caso da diabetes do tipo I, que é válida apenas para moléculas de classe II: durante um processo inflamatório, a degradação de moléculas da superfície celular, que ocorre normalmente nos endossomas, se tornaria similar ao processamento de antígenos pelo caminho exógeno. Esses peptídeos, originados de moléculas próprias, passariam a ser expressos e apresentados junto com moléculas de classe II levando o indivíduo a desenvolver uma resposta autoimune (RITCH, 1996).

1.4 HLA E DOENÇA PERIODONTAL

A literatura científica dos últimos 10 anos tem relatado um crescente número de trabalhos que sugerem uma associação entre o polimorfismo genético do HLA e periodontite, embora não existam ainda evidências seguras desta associação.

A seqüência de resíduos de aminoácidos presentes na fenda de ligação para peptídeos antigênicos nas moléculas de HLA classe II pode influenciar na interação fenda/ antígenos bacterianos e desta maneira contribuir para susceptibilidade ou resistência à periodontite. Em comparação com moléculas de HLA classe I, que apresentam peptídeos antigênicos de microrganismos intracelulares, a associação positiva ou negativa destas moléculas no envolvimento da doença periodontal pode ser explicada pelo mimetismo molecular de moléculas HLA por alguns patógenos (EBRINGER, 1983) resultando em uma resposta autoimune com destruição tecidual.

Com relação as moléculas de HLA classe I, Takashiba e cols. (1994) descreveram estudos relevantes quanto ao binômio HLA/periodontite: 1) Frequência reduzida de HLA-A2 e -B12 em um grupo de indivíduos com periodontite agressiva (KASLICK e cols., 1975; KASLICK e cols., 1980) ; 2) Frequência aumentada de HLA-A2, -A9, -A28, e -B15 (REINHOLDT e cols., 1977), HLA-B35 (CULLINAN e cols., 1980), HLA-A33 em pacientes com periodontite agressiva(KLOUDA e cols., 1986); 3) Frequência aumentada de HLA-A9 em pacientes com periodontite agressiva(KLOUDA e cols., 1986); 4) Frequência aumentada de HLA-A23, -A24, HLA-B44 e -Cw4 em pacientes com periodontite crônica (MARGGRAF e cols., 1983); 5) Associação entre resistência a periodontite agressiva e HLA-A10 (AMER e cols., 1988).

Em estudo realizado com um grupo de pacientes judeus cuja origem não era Ashkenaki, com idade inferior a 35 anos e pelo menos dois sítios com nível de

profundidade de bolsa maior que 5 mm, foi observada associação entre HLA-A9 e -B15 e periodontite agressiva generalizada ($p < 0.005$ e $p < 0.05$, respectivamente) (SHAPIRA e cols., 1994).

Segundo Sofaer (1994) o risco relativo de desenvolvimento da doença periodontal em pacientes que possuem HLA-A9 ou -B15 é de 1,5 a 3,5 vezes maior do que naqueles que não possuem estas especificidades HLA.

Nishimura e cols. (1990) relataram uma frequência aumentada dos antígenos HLA -A2, -A44, -A11, -B35, -B54, -B5, -Cw1, -Cw3, em pacientes com periodontite agressiva.

Price e cols. (1999), em estudo com pacientes aidéticos, mostraram que a maioria dos pacientes que expressavam HLA-B8 também apresentaram um índice de sangramento gengival maior, maior perda de inserção periodontal e maior severidade da doença do que aqueles HLA-B8 negativos.

Ainda com relação à destruição tecidual, May e Tatakis (2004) mostraram que a reabsorção óssea alveolar em camundongos transgênicos para HLA- B27 era mais severa que a observada em camundongos do tipo selvagem.

Machulla e cols. (2002) estudaram um grupo de pacientes caucasianos alemães portadores de periodontite crônica e observaram maior frequência dos alelos *HLA-A*11*, *-A*29*, *-B*14*, *-B*18* e *-Cw*08*, e menor frequência dos alelos *HLA-A*03*, *-A*31*, *-A*30/31*, *-B*51* e *-DQB1*04* quando comparados ao grupo controle da mesma etnia. A associação positiva de DP e *HLA-A*11*, *-A*29*, *-B*14* e *-Cw*08* e a associação negativa do alelo *HLA-A*03* foram estatisticamente significante. Os autores sugerem que o *HLA-A*03* é um fator protetor para o desenvolvimento de periodontite crônica e o *HLA -DRB1*13* um fator de risco no desenvolvimento de periodontite agressiva.

Outros estudos também sugerem associação entre o HLA de classe II e DP. Cogen e cols. (1986) observaram uma frequência aumentada do HLA-DR2 em pacientes com periodontite agressiva; Nishimura e cols. (1990) relataram uma frequência aumentada de HLA- DR2 e –DR9 em pacientes com periodontite agressiva; Katz e cols. (1987) relataram uma maior frequência de HLA-DR4 em pacientes com periodontite agressiva, quando comparados ao grupo controle.

O HLA-DR4 é observado com maior frequência em pacientes com artrite reumatóide, doença que apresenta algumas características comuns às observadas na periodontite, como resposta inflamatória persistente, destruição de tecido conjuntivo e ósseo (GARGIULO e cols., 1985; HIRSH e cols., 1989).

Bonfil e cols. (1999) encontraram uma associação positiva significativa entre *HLA- DRB1*04* e doença periodontal agressiva em pacientes franceses.

A influência do antígeno HLA-DR4 tem sido sugerida também por Wennstrom e cols. (1993), Alley e cols.(1993).

Shapira e cols. (1994) não observaram associação significativa entre periodontite agressiva e HLA –DR, em seus estudos com pacientes judeus de origem Ashkenaki, contrapondo os achados de Katz e cols. (1987) que relataram uma forte associação entre HLA-DR4 e periodontite agressiva, em estudos com indivíduos judeus de origem Ashkenaki (provenientes do centro e leste europeu), provavelmente devido ao fato dos estudos terem sido realizados em grupos de origem distintas.

Ohyama e cols. (1996) estudaram a distribuição da frequência dos alelos *HLA-DRB1*, *-DQA*, e *-DQB1* em 24 pacientes japoneses com periodontite agressiva e 47 indivíduos japoneses sem periodontite; os alelos *HLA-DRB1*1401*, *-DRB1*1501*, *-DQB1*0503*, *-DQB1*0602* foram detectados com maior frequência no grupo com periodontite agressiva comparado ao grupo controle; os alelos *HLA-DRB1*0405* e -

*DQB1*0401* foram detectados com menor frequência no grupo de pacientes com periodontite agressiva.

Ohyama e cols. (1996) verificaram que as cadeias polipeptídicas codificadas pelos alelos *HLA-DQB1*0503*, *-DQB1*0602* e *-DQB1*0603* possuem o ácido aspártico na posição 57 e glicina na posição 70. Os autores ressaltam que a frequência destes alelos é maior em pacientes com periodontite agressiva do que nos controles sadios ($p=0,0216$).

Reichert e cols. (2003) em estudo sobre a associação entre gênero e distribuição de frequência do HLA, observaram maior frequência de *HLA-DQB1*0503* em pacientes japoneses do sexo feminino com periodontite agressiva, quando comparadas ao grupo controle feminino. Já para o sexo masculino, a diferença da distribuição das frequências não foi significativa. Nos pacientes com periodontite crônica o alelo *HLA-DQB1*0303* não foi encontrado em indivíduos do sexo feminino, para o grupo do sexo masculino, mostrou uma distribuição normal. Entretanto, o alelo *HLA-DQB1*06* foi significativamente mais frequente apenas nas mulheres.

Zhang e cols. (2004) observaram maior frequência do alelo *HLA-DRB1*1501* em um grupo de pacientes chineses com periodontite crônica severa (PCS), quando comparado ao grupo controle, sugerindo que este alelo pode ser um marcador de susceptibilidade à PCS neste grupo étnico.

Takashiba e cols. (1999) avaliaram a resposta imune celular contra *P. gingivallis* e observaram uma resposta imune mais exacerbada e maior destruição tecidual nos pacientes com o haplótipo *HLA-DRB1*1501*, *-DQB1*0602*, o que sugere uma predisposição genética ao desenvolvimento da periodontite agressiva.

Stein e cols. (2003) relataram uma discreta, porém maior frequência de homozigose para os alelos *HLA-DRB1*15*, *-DRB5*(DR51)*, *-DQB1*06* tanto em pacientes com periodontite agressiva, como periodontite crônica.

Como consequência do Projeto Genoma Humano e projetos relacionados, o conhecimento da estrutura e função dos genes proverá bases para o estudo de doenças com predisposição genética e desenvolvimento de um diagnóstico e plano de tratamento mais condizente com a etiologia da doença.

1.5 HLA E GRUPOS ÉTNICOS

Estudos mostrando que certos alelos ou moléculas do HLA têm uma frequência aumentada em grupo de indivíduos afetados por uma determinada doença têm estimulado os pesquisadores a avaliar o papel desempenhado por essas moléculas no processo da doença.

O estudo na distribuição de frequências dos alelos HLA em vários grupos populacionais ocorreu sistematicamente entre junho de 1970 e junho de 1972, como finalidade do Simpósio Internacional de Histocompatibilidade de 1972. Os dados acumulados de 80 grupos populacionais investigados e de muitos outros estudos subseqüentes (AIZAWA, 1986; IMANISHI, 1992) permitiram várias conclusões: (1) as frequências dos alelos HLA diferem consideravelmente entre os grupos étnicos; (2)

alguns alelos HLA estão restritos ou são encontrados em frequências muito mais elevadas em uma população étnica comparada a outra; e (3) os haplótipos e o desequilíbrio de ligação diferem entre as populações. Estas observações devem ser levadas em conta em estudos em que se pretende estudar a associação HLA e doença periodontal.

O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido seu elevado polimorfismo e forte desequilíbrio de ligação entre alelos de *loci* próximos. Essas propriedades permitem que a tipificação HLA seja utilizada como um instrumento de investigação, levando-se em conta que os haplótipos herdados são característicos de cada grupo étnico (MONTE, 2004).

A população brasileira apresenta uma grande diversidade genética, resultante da miscigenação entre, principalmente três grupos étnicos: caucasóides (brancos), negros e ameríndios. Esse processo teve início no século XVI quando os portugueses aportaram no Brasil.

Pena e cols. (2002), em seus estudos filogeográficos do branco brasileiro, confirmaram cientificamente que o brasileiro branco, de modo geral, é um mestiço tri-híbrido, com 39% de linhagens européias, 33% ameríndias e 28% africanas, mas variando de região para região, na dependência dos fatos históricos que nortearam a colonização de cada região. Assim, o brasileiro branco no sul tem 66% de herança européia, no norte 54% ameríndia e no nordeste 46% negra.

Uma abordagem a respeito da origem étnica da população da Bahia (a população deste estudo) e o seu processo secular de miscigenação explica o inter-relacionamento entre povos diferentes, criando um grupo étnico geneticamente híbrido e culturalmente diversificado.

Segundo Azevedo (1980), a história racial da população da Bahia, assim como a de todo o Novo Mundo, tem duas fases bem distintas: a primeira, mono-racial, começa com a chegada dos primitivos habitantes e se estende por vários milênios; a segunda, pan-racial, se inicia com a colonização e as misturas raciais. A fase mono-racial na Bahia teve início há não mais que dez mil anos atrás, com a chegada dos primitivos habitantes mongolóides. Esses povos tinham a cultura da idade da pedra lascada, falavam várias línguas e viviam em organizações sociais primitivas.

A partir de meados do século XVI, algumas décadas após o descobrimento do Brasil, inicia-se a fase pan-racial. Dois outros povos, Portugueses e Africanos passaram a conviver com os primitivos habitantes da Bahia. As características bio-sociais desse contato tri-racial, constituem os marcos iniciais da modelagem antropogenética da população atual, cada povo com sua constituição genética e aspectos físicos diferentes e poderes sociais desiguais.

Na fase inicial do contato entre brancos, negros e índios, não havia mulheres brancas, conseqüentemente, o fluxo gênico nos cruzamentos iniciais foi do homem branco para os grupos preto e índio. As resultantes genéticas e culturais desses contatos foram bem distintas. As primeiras gerações de neo-baianos eram geneticamente híbridos de branco e preto, ou de branco e índio, mas conservaram-se culturalmente pretos e índios sob a guarda de mães pretas ou índias. Do ponto de vista genético o que houve foi um influxo de alelos característicos de brancos em populações indígenas e africanas.

A história registra uma descendência advinda do português Diogo Álvares Corrêa, o Caramuru, que se fixou na Bahia, e se casou com Catarina Paraguaçu deixando numerosa prole mestiça que preferencialmente casou com brancos. O núcleo Caramuru formava um isolado populacional constituído de aproximadamente 300 casas, único exemplo de microfluxo de alelos característicos de índios na população branca.

Posteriormente chegaram as primeiras mulheres brancas, órfãs, enviadas pela corte de Portugal e o processo de mistura racial propagou-se ainda mais. Atualmente, quase cinco séculos depois, a população atual da Bahia é o melhor testemunho de sua própria história com grande variedade de fenótipos mestiços.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre HLA-DR e -DQ e periodontite crônica severa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

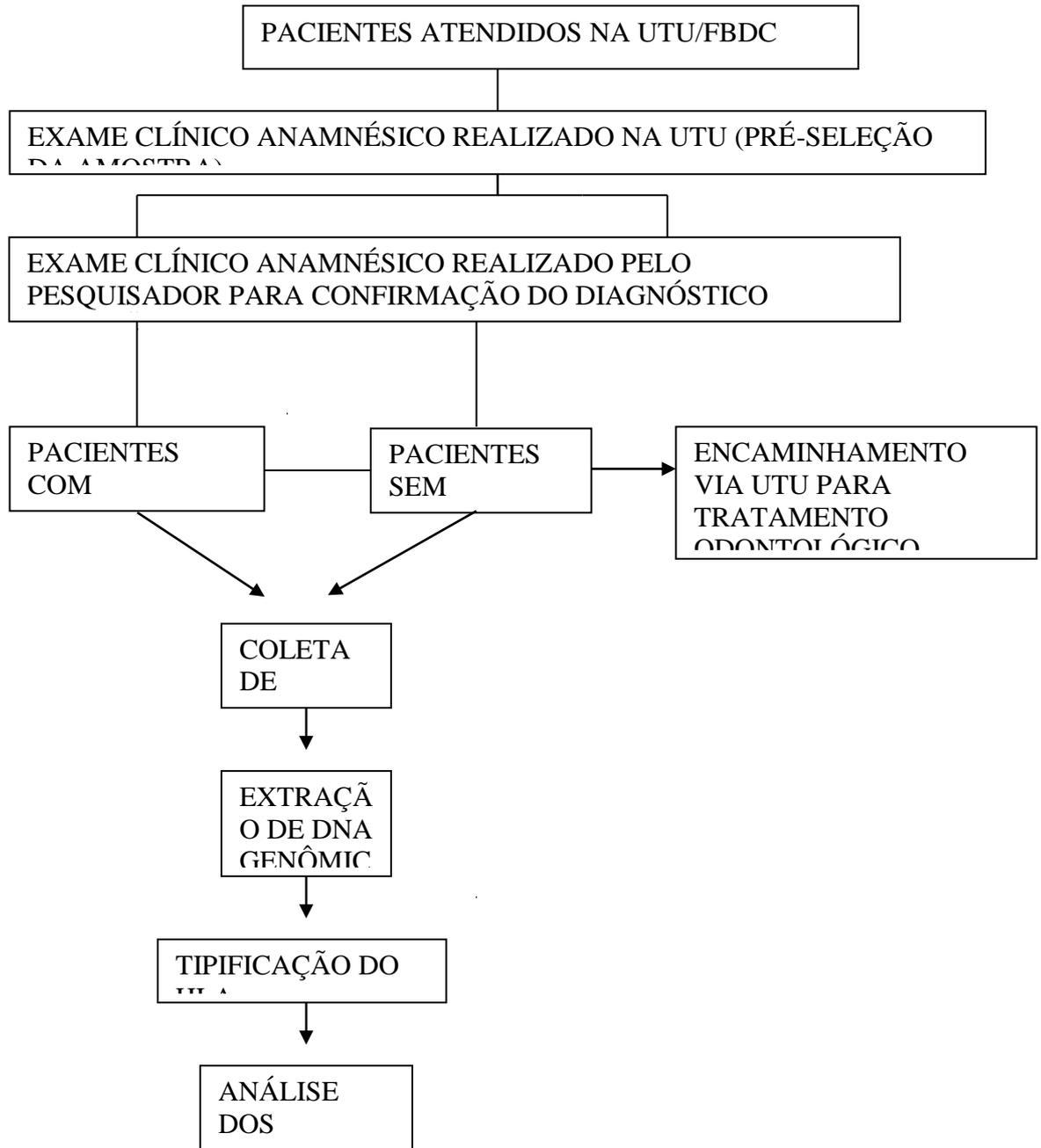
1. Estudar a distribuição de frequência de alelos HLA-DR, -DQ em uma amostra de mestiços da população de Salvador acometidos por periodontite crônica severa.

2. Comparar as freqüência de alelos HLA–DR, -DQ, em uma amostra de mestiços da população de Salvador acometidos por periodontite crônica severa com as freqüências encontradas em um grupo de pacientes sem periodontite.

3. Identificar possíveis marcadores genéticos de susceptibilidade ao desenvolvimento da periodontite crônica severa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO



Este projeto foi desenvolvido com a colaboração do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (EBMSP/FBDC) e Laboratório de Imunologia do

Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA), com a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da FBDC (Parecer N. 09/2003).

3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 43 pacientes com Periodontite Crônica Severa e 41 pacientes sem periodontite (grupo controle) de ambos os sexos, todos classificados quanto ao grupo étnico como mestiços, e na faixa etária entre 30 e 50 anos.

A pré-seleção dos pacientes foi realizada na Unidade de Triagem e Urgência (UTU) do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação para Desenvolvimento das Ciências (EBMSP/FBDC), segundo os critérios: faixa etária entre 30 e 50 anos, não portador de distúrbios sistêmicos, não tabagistas.

Os pacientes selecionados foram esclarecidos acerca do desenvolvimento, dos objetivos e da relevância da pesquisa, e, confirmando a sua participação no projeto, eram encaminhados para realização de exame clínico-anamnésico e preenchimento da ficha periodontal ou periograma.

A fim de promover uma melhor padronização dos indivíduos em estudo e visando evitar fatores que pudessem eventualmente interferir na fidedignidade dos resultados, foram excluídos da seleção pacientes fumantes, portadores de distúrbios sistêmicos, gestantes, imunossuprimidos, assim como pacientes que fizeram uso de anti-inflamatórios nos últimos 10 dias antecedentes à coleta do material .

A avaliação dos parâmetros clínicos, realizada por um único examinador ($\kappa = 0,81$), foi feita utilizando: índice de placa visível (IPV), índice de sangramento gengival – ISG; profundidade de sondagem – PS; recessão gengival – RG, nível de inserção clínica – NIC, grau de mobilidade dental e grau de envolvimento de furca.

Dentes com coroa totalmente destruída por cárie, com aparelho ortodôntico fixo e parcialmente erupcionados foram excluídos da avaliação clínica.

Os pacientes acometidos pela periodontite crônica severa deveriam apresentar quatro elementos dentários com $PS \geq 4$ e $NIC \geq 5$ e pelo menos um sítio com NIC e $PS \geq 5$ mm, com sangramento à sondagem caracterizando processo inflamatório. Foram excluídos aqueles indivíduos com menos de 10 dentes presentes.

O grupo controle foi constituído pelos pacientes que, ao exame clínico periodontal foram classificados como livres de periodontite, com profundidade de sondagem menor igual a 3 e nível de inserção clínica menor igual a 2 milímetros e que preencheram os critérios de inclusão para participação no Projeto.

Os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão para participação no Projeto, incluindo a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), redigido segundo normas da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, foram encaminhados para coleta de amostra de sangue.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA, por um profissional capacitado, através de acesso venoso ante-cubital, em volume de 5,0 mL por paciente e levadas ao laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, onde foi realizada a extração de DNA genômico dos leucócitos e tipificação do HLA .

3.4 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi purificado a partir de leucócitos do sangue periférico utilizando o kit “GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech) conforme a orientação do fabricante: em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL foi colocado 300 µL de sangue coletado em EDTA e adicionado 900 µL de solução de lise de eritrócitos (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA) a mistura foi homogeneizada. Após um período de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada em uma velocidade de 14.000 rpm durante 20 segundos, sendo posteriormente feita a remoção do sobrenadante. Essa etapa de lise foi repetida, porém adicionando-se apenas 400µL de solução de lise de eritrócitos, sendo, ao final, o sedimento ressuspensão no sobrenadante residual com auxílio do vortex. Em seguida, foi adicionado à suspensão 500 µL de solução de extração (solução tampão contendo caotrópico e detergente), a mistura foi homogeneizada e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após ser transferida para uma coluna GFX adaptada ao tubo coletor, a mistura foi centrifugada em uma velocidade de 7.500 rpm durante 1 minuto. Após centrifugação, o eluato foi desprezado do tubo coletor e a coluna GFX recolocada neste mesmo tubo. Em uma etapa subsequente, foi adicionado 500 µL de solução de extração à coluna GFX, e centrifugado em uma velocidade de 7.500 rpm durante 1 minuto sendo, novamente desprezado o eluato do tubo coletor e recolocada a coluna neste mesmo tubo. A próxima etapa da técnica consistiu na lavagem. Para sua realização, foi adicionado 500 µL de solução de lavagem (tampão Tris-EDTA adicionado de álcool etílico) e centrifugado em uma velocidade de 14.000 rpm durante 3 minutos. Após esta etapa o tubo coletor foi descartado, sendo a coluna transferida para um tubo tipo eppendorf esterilizado de 1,5 mL. A etapa de eluição do DNA da matriz de sílica presente na coluna foi feita pela adição de 150 µL de água ultra pura autoclavada e pré-aquecida a 70° C e incubação por 1 minuto à temperatura ambiente, seguida de

centrifugação a 7.500 rpm durante 1 minuto. O DNA obtido após a centrifugação teve sua concentração e pureza avaliadas pela leitura da densidade óptica em 260 e 280 nm, sendo as amostras posteriormente mantidas a -20⁰C até seu uso.

3.5 GENOTIPAGEM HLA-DR, -DQ.

A determinação das especificidades de classe II (HLA-DR, -DQ) foi realizada pelo método PCR-SSP utilizando o kit Micro SSPTM DNA Typing SSP2L (One Lambda, Inc. Canoga Park C.A U.S.A. Lote 05A). Cada placa de tipagem contém, além de um poço controle negativo, ‘primers’ contendo seqüências específicas para a amplificação de alelos DRB1*/B3*/B4*B5* e alelos DQB1* do locus de classe II em diferentes poços. Dado que a amplificação durante a reação da PCR pode ser influenciada adversamente por vários fatores (erros de pipetagem, qualidade deficiente do DNA, presença de inibidores, etc), existe um par de primers de controle interno incluído em todas as reações de PCR. O par de primers de controle amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, que está presente em todas as amostras de DNA, e é usado para confirmar a integridade da reação. O mapa de distribuição dos ‘primers’ mostra as especificidades HLA possíveis de serem determinadas com o uso dessas placas comerciais. Conforme orientação do fabricante, para cada tipagem, foi adicionado ao poço controle negativo da placa 1 μ l de água ultra pura e 9 μ l de uma solução que acompanha o KIT (D-mix: Cresol red, sais de sódio, dideoxynucleotídeos trifosfato, gelatina, ácido hidrolórico, cloreto de potássio, sucrose cristalina e TRIS) contendo 1 μ l de Taq polimerase (5 U/ μ l) (Cenbiot, R.S. Lote 98/1606). Em cada poço teste, foi dispensado 10 μ l deste mesmo ‘D-mix’, ao qual foi adicionado 39 μ l de DNA genômico (100ng/ μ l). Depois de pipetados os reagentes, a placa era então colocada no

termociclador (Perkin-Elmer, 9600) sendo a PCR realizada de acordo com o manual do fabricante do kit: 1 ciclo a 94⁰C-130 segundos; 63⁰C- 60segundos; 9 ciclos de 94⁰C-10 segundos, 63⁰C-60 segundos; 20 ciclos de 94⁰C-10 segundos, 59⁰C- 50 segundos e 72⁰C-30 segundos. Os produtos da PCR eram separados em gel de agarose 2,5% contendo 10 µL de brometo de etídeo e a corrida feita entre 140 e 150 volts, com 40mA no início da migração. Posteriormente, o gel era visualizado em luz UV, fotodocumentado e o padrão de bandas observado era analisado utilizando o mapa de tipagem presente no kit. A técnica de tipificação do HLA tem excelente praticidade e interpretação menos complexa dos resultados obtidos, quando comparada, por exemplo, com a reação de linfocitotoxicidade.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados obtidos pela tipificação do HLA, foi utilizado o Teste Exato de Fisher, de acordo com o método de Woolf, para avaliar se existe ou não diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos alelos no grupo de pacientes com periodontite crônica severa e o grupo controle.

Um valor de *P* corrigido (*P_c*) quando *P* fosse menor que 0,05 foi calculado pela multiplicação do *P* pelo número de alelos testados em um *locus*, sendo 14 para HLA-DRB1*, 3 para HLA-DRB3*,-B4*,-B5* e 7 para HLA-DQB1* (correção de Bonferroni). O valor de *pc*<0.05 foi aceito como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

Dentre os pacientes atendidos na clínica de Periodontia da FBDC no período de março a agosto de 2004, 84 preencheram os critérios de inclusão estabelecidos para participação neste projeto. Destes, 43 foram diagnosticados com Periodontite Crônica Severa (PCS) e constituíram o grupo caso e 41 não apresentaram PCS e constituíram o grupo controle.

A Tabela 1 mostra os dados demográficos dos dois grupos. A distribuição por sexo é semelhante em ambos os grupos ($p=1,0000$), sendo a frequência de indivíduos do sexo masculino e feminino no grupo caso de 41,86 % e 58,14%, respectivamente. No grupo controle as frequências observadas foram 58,54% de indivíduos do sexo feminino e 41,46% do sexo masculino.

Todos os pacientes que participaram da pesquisa eram mestiços e foram classificados como mulato claro (38,10%), mulato médio (51,19%) e mulato escuro (10,71%), com base nos critérios estabelecidos por Krieger e cols. (1965).

Tabela 1 – Dados demográficos do grupo de pacientes com periodontite crônica severa e grupo controle

GRUPO	SEXO		FAIXA ETÁRIA (MEDIANA)	GRUPO ÉTNICO		
	F n(%)	M n(%)		MC n(%)	MM n(%)	ME n(%)
PCS	25 (58,14)	18 (41,86)	47	16 (37,20)	21 (48,84)	6 (13,96)
CONTROLE	24 (58,54)	17 (41,46)	36	16 (39,02)	22 (53,66)	3 (7,32)

PCS - Periodontite Crônica severa

MC = Mulato claro; **MM** = Mulato médio; **ME** = Mulato escuro.

A Tabela 2 mostra os parâmetros clínicos utilizados para avaliação da saúde periodontal.

Tabela 2 – Parâmetros clínicos de avaliação periodontal utilizados na análise estatística

GRUPO	Nº de dentes ($x \pm \sigma$)	Nº de faces com sangramento ($x \pm \sigma$)	Nº de faces com placa ($x \pm \sigma$)	IPV (%) ($x \pm \sigma$)	ISG (%) ($x \pm \sigma$)	No de sítios com PS e NIC ≥ 5 sem sangramento a sondagem ($x \pm \sigma$)	No de sítios com PS e NIC ≥ 5 com sangramento a sondagem ($x \pm \sigma$)	Maior NIC ($x \pm \sigma$)	Maior PS ($x \pm \sigma$)
PCS	23 ± 6	12 \pm 11	74 \pm 27	79,8 5 $\pm 21,$ 73	13, 73 $\pm 7,$ 98	10 \pm 10	4 \pm 3	8 \pm 2	7 \pm 1
CONTR OLE	25 ± 5	4 \pm 4	54 \pm 20	60,6 3 $\pm 17,$ 76	5,9 9 $\pm 3,$ 36	0	0	1 \pm 1	2 \pm 1

PCS = Periodontite Crônica Severa; IPV = Índice de Placa Visível; ISG = Índice de Sangramento Gengival; PS= Profundidade de sondagem; NIC= Nível de Inserção Clínica; x = média. σ = desvio padrão

A distribuição da média do número de dentes por indivíduo em cada grupo mostrou-se semelhante ($p=1,0000$); de acordo com os dados da Tabela 2, a média dos valores do índice de Placa Visível para o grupo de pacientes com PCS (79,85%), quando comparado ao grupo controle (60,63%) foi estatisticamente significativa ($p=0,0032$).

A diferença entre os valores do Índice de Sangramento Gengival (13,73%) do grupo de pacientes com PCS e do grupo controle (5,99%) não foi estatisticamente significativa ($p=0,0970$).

Os valores dos parâmetros clínicos utilizados para diagnóstico da PCS mostraram que para os pacientes portadores de PCS, em média 10 sítios apresentaram profundidade de sondagem clínica e nível de inserção clínico maior ou igual a cinco, destes em média quatro sítios apresentaram também sangramento a sondagem.

Tabela 3. Frequência dos alelos HLA-DRB1*, -B3*, -B4*, -B5*, -DQB1* no grupo de pacientes com periodontite crônica severa (PCS) e no grupo controle (GC).

Grupo Alélico HLA	Correspondente sorológico	CS (%)	P C (%)	G RR (%)	<i>p</i>	Pc
<i>DRB1*01</i>	DR1	1,63	1	2	ns	
<i>DRB1*15</i>	DR15(2)	0,23	3	2	ns	
<i>DRB1*16</i>	DR16(2)	65	4,	2,	ns	
<i>DRB1*03</i>	DR17(3)	3,95	1	7,	ns	(17)
<i>DRB1*03</i>	DR18(3)	0	0,	7,	ns	(18)
<i>DRB1*04</i>	DR4	3,95	1	1	ns	
<i>DRB1*07</i>	DR7	5,58	2	2	ns	
<i>DRB1*08</i>	DR8	6,28	1	2	ns	
<i>DRB1*09</i>	DR9	98	6,	4,	ns	
<i>DRB1*10</i>	DR10	98	6,	1	ns	
<i>DRB1*11</i>	DR11(5)	0,93	2	9,	ns	
<i>DRB1*12</i>	DR12(5)	0	0,	2,	ns	
<i>DRB1*13</i>	DR13(6)	4,88	3	1	ns	
<i>DRB1*14</i>	DR14(6)		0,	9,	ns	

		0	76			
	<i>DRB3*</i>	DR52	6	5		ns
			7,44	3,66		
	<i>DRB4*</i>	DR53	4	5		ns
			8,84	1,22		
	<i>DRB5*</i>	DR51	3	3		ns
			4,88	1,71		
		<i>DR blank</i>	1	4,		
			1,63	88		
2	<i>DQB1*0</i>	DQ2	3	3		ns
			9,53	6,59		
3	<i>DQB1*0</i>	DQ7(3)	3	2		ns
			4,88	1,95		
3	<i>DQB1*0</i>	DQ8(3)	1	1		ns
			3,95	7,07		
3	<i>DQB1*0</i>	DQ9(3)	9,	2,		ns
			30	44		
4	<i>DQB1*0</i>	DQ4	9,	1		ns
			30	9,51		
5	<i>DQB1*0</i>	DQ5(1)	2	5	0,5449	0.0 ns
			7,91	1,22	438	
6	<i>DQB1*0</i>	DQ6(1)	3	3		ns
			9,53	9,02		
		<i>DQ blank</i>	2	1		ns
			5,58	2,20		

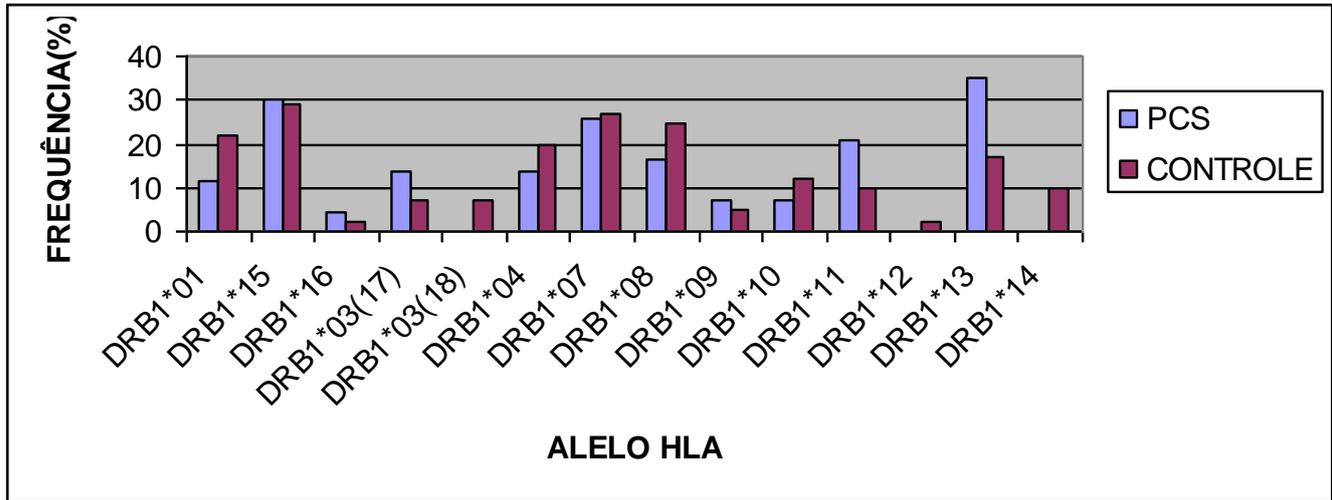
ns = Não significante; PCS = Periodontite crônica severa; NIC = Nível de Inserção clínica; RR = Risco Relativo; *P*_c = valor de P corrigido

A Tabela 3 apresenta a distribuição de frequência dos alelos *HLA-DRB1**, *-B3**, *-B4**, *-B5** e *-DQB1**. Os alelos mais frequentes do grupo de pacientes com periodontite crônica severa foram *HLA-DRB1*13*, *-DRB1*15*, *-DRB3** e *-DQB1*02*, *-DQB1*06*, os alelos mais frequentes no grupo controle foram *HLA-DRB1*15*, *-DRB1*07*, *-DRB3**, *-DQB1*05* e *-DQB1*06*.

Por outro lado, as frequências mais baixas no grupo de pacientes com periodontite crônica severa foram as dos alelos *HLA-DRB1*16*, *-DRB5**, *-DQB1*0302/*0306/*0312* (correspondente sorológico HLA-DQ9) e *-DQB1*04*. Não foram identificados indivíduos portadores dos alelos *HLA-DRB1*0302* (correspondente

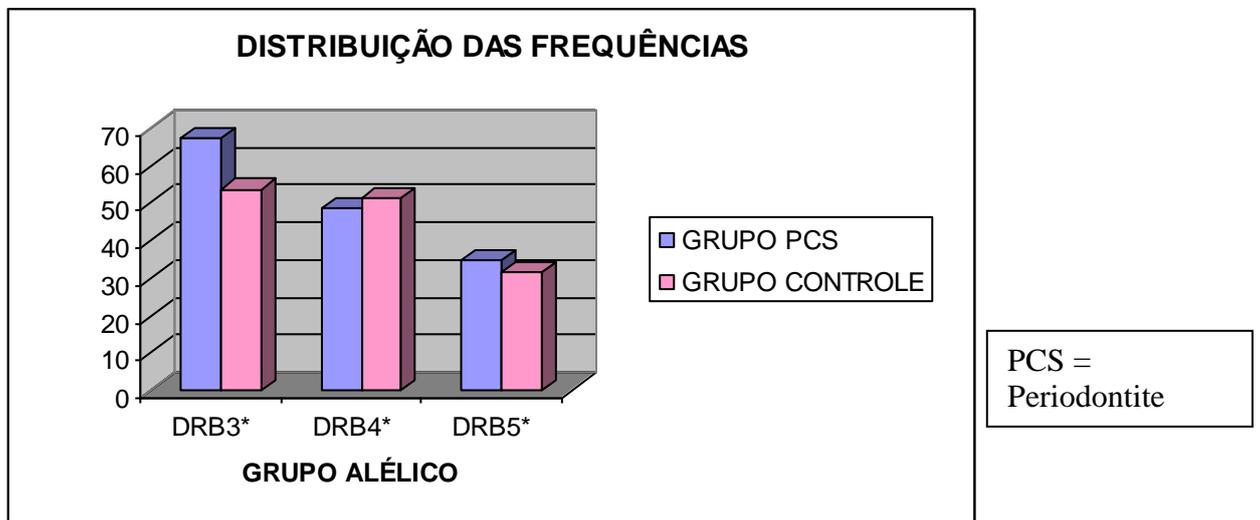
sorológico HLA-DR18), *HLA-DRB1*12* e *-DRB1*14* neste grupo. As frequências mais baixas no grupo controle foram as dos alelos *HLA-DRB1*16*, *-DRB1*12*, *-DRB5** e *-DQB1*0302/*0306/*0312* (correspondente sorológico HLA-DQ9).

Figura 2- Distribuição das frequências do locus HLA-DRB1

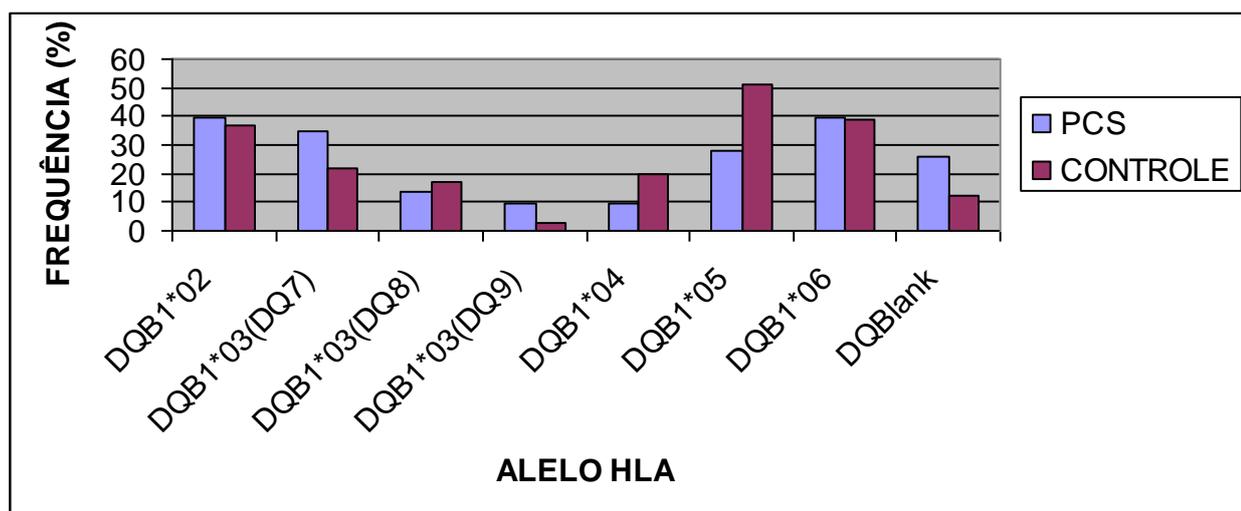


PCS = Periodontite Crônica Severa

Figura 3 – Distribuição das frequências dos alelos HLA-DRB3*,-B4*,-B5*.



PCS =
Periodontite



PCS = Periodontite Crônica Severa

Quando a distribuição das frequências dos alelos foi comparada entre os dois grupos a frequência do alelo *HLA-DQB1*05* no grupo controle foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,0438$), porém ,não confirmado pela correção de Bonferroni.

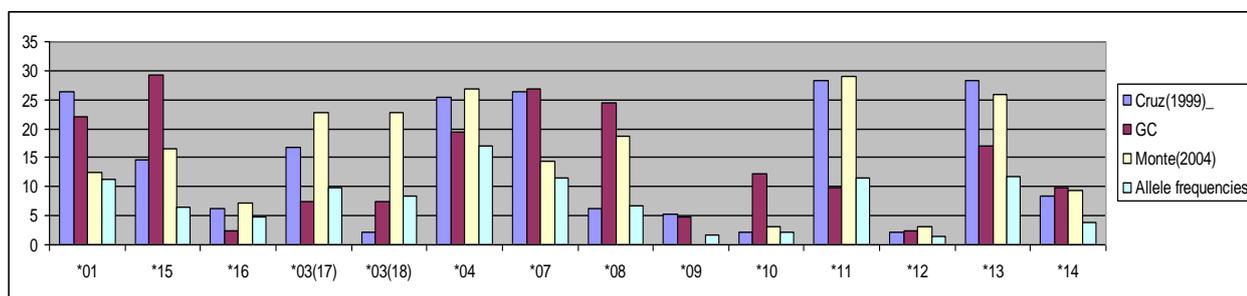
Uma tendência para uma maior frequência do alelo *HLA- DRB1*14* ($p=0,0525$) foi mostrada no grupo controle, quando comparado com o grupo de pacientes portadores de PCS. Essa tendência não foi confirmada pela correção de Bonferroni.

Segundo as conclusões finais estabelecidas pelo Relatório do Simpósio Internacional de Histocompatibilidade de 1972, as frequências dos alelos HLA diferem consideravelmente entre os grupos étnicos e alguns alelos HLA estão restritos ou são encontrados em frequências muito mais elevadas em uma população étnica comparada a outra. Com base nessas observações, a distribuição das frequências dos alelos HLA na população sem doença periodontal (grupo controle - GC) foi comparada com a distribuição das frequências dos alelos HLA em estudos realizados com a população da região Nordeste (banco de dados *allele frequencies* parte do Banco de dados IMGT - *Imuno genetics*), uma amostra de mestiços da população de Teresina (MONTE, 2004) e

ainda uma população de mulheres brancas e mestiças residentes em Salvador (CRUZ, 1999). Vale ressaltar que estes indivíduos não foram avaliados quanto à presença ou ausência de doença periodontal.

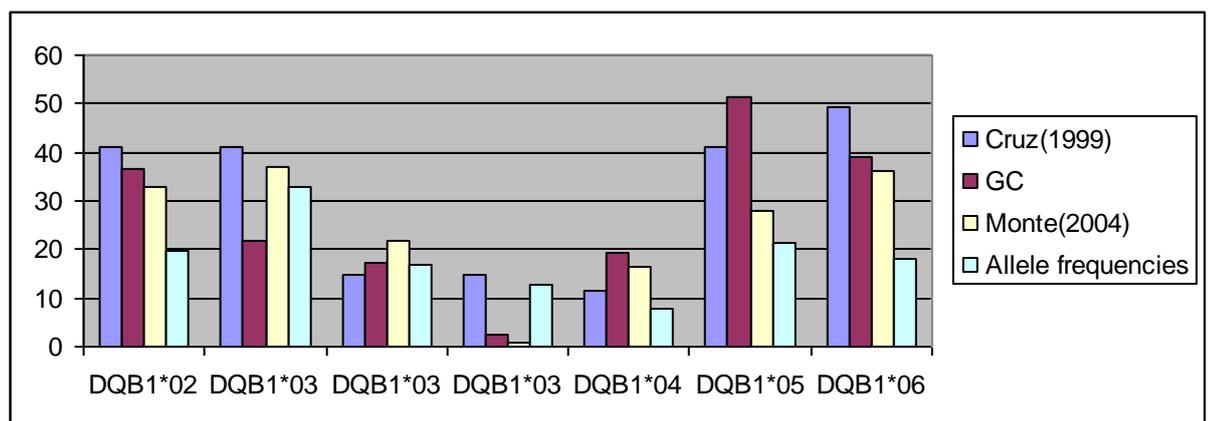
As figuras 5 e 6 ilustram as distribuições das freqüências dos alelos HLA nos quatro grupos comparados. As freqüências mais semelhantes foram observadas entre as populações descritas por Cruz (1999) e Monte (2004); e Cruz (1999) e este trabalho.

Figura 5 – Análise comparativa das freqüências dos alelos HLA em amostras de estudos realizados no Brasil para o locus DRB1.



GC – Grupo Controle

Figura 6 – Análise comparativa das freqüências dos alelos HLA em amostras de estudos realizados no Brasil para o locus DQB1



GC – Grupo Controle

A figura 7 ilustra a análise comparativa das distribuições de freqüência do grupo alélico *HLA-DRB1*15* entre o grupo PCS do projeto e estudos realizados no Brasil.

Figura 7 – Análise comparativa das distribuições de frequências do grupo alélico *HLA-DRB1*15* em amostras de estudos realizados no Brasil.



Com base nos resultados ilustrados na figura 7 foi sugerida uma associação entre o grupo alélico *HLA-DRB1*15* e PCS.

5. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, localização sítio-dependente, cuja patogênese ainda não é totalmente compreendida. É analisada como

uma interação complexa entre a infecção bacteriana e a resposta imune do hospedeiro, que varia de acordo com fatores ambientais e genéticos.

Os critérios utilizados em trabalhos científicos para o diagnóstico clínico da doença periodontal não são padronizados, o que dificulta a comparação dos achados entre estes trabalhos.

Os critérios de exclusão e inclusão utilizados neste projeto diferem de outros estudos realizados com pacientes portadores de periodontite crônica severa. Por exemplo, Stein e cols. (2003) não excluíram indivíduos tabagistas, que no presente estudo foi considerado um fator confundidor para o diagnóstico da etiologia da DP, uma vez que o tabagismo é considerado o principal fator de risco para a DP (SBARAGLIA e cols., 2002).

Reichert e cols. (2003) estudaram indivíduos com periodontite crônica severa na faixa etária entre 38 e 73 anos, sendo o grupo controle na faixa etária entre 38 e 95 anos, diferente deste projeto, cuja faixa etária variou de 30 a 50 anos para ambos os grupos.

Segundo Kinane e cols. (2003) a manifestação dos sinais clínicos significativos na Periodontite Crônica não ocorre até a terceira década de vida, enquanto para a Periodontite agressiva pode ocorrer na primeira, segunda, terceira e quarta décadas. Esta variabilidade dificulta o diagnóstico da DP e pode ser considerada um fator confundidor em estudos sobre esta doença.

Também, a própria classificação das DPs ainda é muito discutida e isso faz acreditar que os estudos nessa área deverão ter uma padronização adequada ao que se propõem.

Os dados demográficos mostram que a distribuição por sexo é semelhante em ambos os grupos estudados ($p=1.000$). Entretanto, quando comparados os índices de placa visível (IPV) entre os indivíduos do sexo masculino e feminino, a média do IPV

para o sexo feminino foi 82,93% e para o sexo masculino 77,80%; esta diferença não foi significativamente estatística ($p=0.4756$), porém estes resultados contradizem Machion e cols. (2000), que relatam uma maior prevalência de bolsas periodontais em homens atribuído pelos autores a hábitos de higiene oral deficientes e menor frequência de visitas ao dentista.

A identificação de fatores genéticos, como o HLA associados à determinada doença é particularmente importante quando protocolos de intervenção e prevenção em grupos com predisposição para a patologia existem, como é o caso da periodontite.

Vários estudos têm sugerido associação entre o HLA e a periodontite agressiva; porém poucos avaliaram a associação entre antígenos HLA de classe II e periodontite crônica severa.

Neste estudo o alelo *HLA-DRB1*15* (29,27%) apresentou uma alta frequência no grupo controle, estes resultados contradizem os achados de Ohyama e cols. (1996) que descreveram uma frequência aumentada deste alelo em indivíduos japoneses portadores de periodontite agressiva. O diferente perfil clínico da DP e o grupo étnico estudado por Ohyama e cols. poderiam explicar a diferença nos resultados obtidos.

Este estudo também relata uma frequência aumentada para o alelo *HLA-DRB1*15* no grupo com PCS. Zhang e cols (2004) relataram uma frequência aumentada, estatisticamente significante, para este alelo em um grupo de pacientes chineses, portadores de periodontite crônica severa. Segundo Takashiba e cols. (1999), o antígeno 53 p141-161 presente na membrana externa da parede celular do *Porphyromonas gingivalis* é apresentado para o linfócito T pela molécula HLA-DR15 resultando em uma ativação exacerbada do linfócito T e destruição do tecido de suporte periodontal.

Stein e cols. (2003) relatam uma discreta, porém, maior frequência dos alelos *HLA-DRB1*15*, *HLA-DQB1*06* e *HLA-DRB5** em pacientes com periodontite crônica quando comparados ao grupo controle, o que está de acordo com os achados deste estudo, embora estatisticamente não significante. O desequilíbrio de ligação entre estes alelos explica as frequências encontradas nos grupos estudados.

Por outro lado, o alelo *HLA-DQB1*04* foi menos frequente no grupo com PCS. Este resultado é também descrito por Machulla e cols. (2002) para um grupo de pacientes caucasianos alemães portadores de PC.

A maior frequência do *HLA-DQB1*05* e *-DRB1*14* no grupo controle ($p=0.0494$ e $p=0,0525$, respectivamente), apenas sugere tendência de associação protetora destes alelos na periodontite crônica severa. Esta tendência não foi confirmada pela correção de Bonferroni. A ampliação da amostra neste estudo poderia confirmar essa tendência protetora. Estudos sobre associações protetoras entre HLA de classe II e a doença periodontal não foram descritos na literatura, porém, Amer e cols. (1988) relataram uma associação de resistência para periodontite agressiva relacionada ao HLA-A10.

Diferenças nas frequências dos alelos HLA entre os indivíduos com periodontite crônica analisados neste projeto e estudos com periodontite agressiva foram observadas. A frequência aumentada do alelo *HLA-DRB1*14* em pacientes com periodontite agressiva foi relatada por Ohayama e cols. (1996), entretanto este alelo não foi encontrado no grupo de pacientes com periodontite crônica neste projeto. Uma associação entre *HLA-DRB1*04* e periodontite agressiva foi sugerida em vários estudos (ALLEY, 1993; BONFIL, 1999; FIRATLI, 1996; KATZ, 1987), porém, a frequência deste alelo no grupo de pacientes com periodontite crônica do nosso estudo não foi significativa. Uma associação entre *HLA-DRB1*13* ($p=0,046$) e periodontite agressiva

foi sugerida por Machulla (2002), porém, a diferença entre as frequências deste alelo nos grupos estudados, deste projeto, não foi significativa.

As figuras 5 e 6 ilustram as distribuições das frequências dos alelos HLA em estudos realizados com a população da região Nordeste (IMGT-*allele frequencies*), uma amostra de mestiços da população de Teresina (MONTE, 2004), uma população de mulheres brancas e mestiças residentes em Salvador (CRUZ, 1999) e o grupo controle (GC) descrito por este estudo. As frequências mais semelhantes foram observadas entre as populações de Cruz (1999) e Monte (2004); e Cruz (1999) e este trabalho.

As semelhanças entre a população estudada por Cruz (1999) e a deste projeto podem ser explicadas pelo fato destes estudos terem sido realizados com uma população residente em Salvador.

Para Monte e cols. (2004), ainda que durante a colonização do Piauí, representantes de tribos Tupis e Tapuias estivessem presentes, com a chegada dos brancos, estes indígenas foram dizimados, de modo que o mestiço de Teresina tem características genéticas predominantemente de brancos e negros, com pouca participação ameríndia, o que pode explicar as semelhanças na distribuição das frequências entre a população estudada por Cruz (1999) e a população do estudo de Monte (2004).

Diante da diversidade na origem étnica dos povos que colonizaram a região nordeste, torna-se difícil estabelecer uma relação entre as distribuições de frequência dos alelos para as populações descritas por Cruz (1999), Monte (2004) e este trabalho, comparadas com o banco de dados *allele frequencies* parte do Banco de dados IMGT (*Imuno genetics*).

Segundo Kinane (2003), em um estudo de caso-controle onde o objetivo é observar a associação entre um alelo HLA e uma determinada doença, é necessário

comparar a frequência deste alelo na população afetada pela doença, com a frequência em uma população controle, sendo esta população controle composta de indivíduos não afetados pela doença e uma amostra escolhida randomicamente da população.

Para a avaliação com uma amostra selecionada randomicamente da população, foi escolhida a população descrita por Cruz (1999), composta de 95 mulheres brancas e/ou mestiças da cidade de Salvador, e a população do banco de dados para frequência dos alelos HLA na população do nordeste (IMGT), composta de 205 indivíduos.

Com base na população de Cruz (1999), uma associação significativamente estatística foi descrita para a frequência do alelo *HLA-DRB1*15* ($p=0.0396$) no grupo de pacientes com periodontite crônica severa. Este resultado reforça a idéia de uma associação entre o *HLA-DRB1*15* e doença periodontal crônica descrita na literatura. Devemos ressaltar que também para o grupo controle, uma alta frequência deste alelo foi observada, o que implica a necessidade de aumentarmos a amostra principalmente deste grupo, para confirmação de uma possível associação entre *HLA-DRB1*15* e PCS.

Com base na população do banco de dados para frequência dos alelos HLA na população do nordeste, a frequência encontrada para o alelo *HLA-DRB1*15* mostrou-se significativa ($p<0,0001$), reforçando a idéia de que este alelo é um possível marcador genético para periodontite crônica. Ainda uma tendência para uma associação protetora entre o alelo *HLA-DRB1*14* ($p=0,0573$) e PCS foi sugerida, embora essa tendência não tenha sido confirmada pela correção de Bonferroni. Por outro lado, associações entre os alelos *HLA-DRB1*07* ($p=0.0250$), *HLA-DRB1*13* ($p=0,0008$), - *DQB1*06* ($p=0,0038$) e o grupo de pacientes com periodontite crônica severa foram mostradas. Embora apenas foram estatisticamente significante pela correção de

Bonferroni apenas as associações entre o *HLA-DRB1*13* ($p=0,0112$),
*DQB1*06* ($p=0,0266$) e PCS.

O estudo do DNA mitocondrial de indivíduos residentes em quatro regiões brasileiras mostrou uma predominância de genes associados a grupos étnicos de origem ameríndia na amazônia, africanos na região nordeste, um equilíbrio de etnias para região sudeste, uma predominância de linhagem européia para a região sul e uma heterogeneidade entre os estados da região nordeste (PARRA e cols., 2004).

Esta heterogeneidade filogeográfica, descrita por Parra e cols. (2004) poderia explicar as diferenças encontradas nos resultados para as três análises entre: (1) grupo com periodontite crônica vs. grupo controle da população em estudo; (2) grupo com periodontite crônica vs. grupo controle da população de Cruz (1999); e (3) grupo com periodontite crônica vs. grupo controle representado pelo banco de dados IMGT.

A terapia periodontal tem como objetivo a saúde periodontal, evitando a perda do elemento dental. Os dentistas procuram novas informações, a fim de torná-los, capazes de identificar e tratar a DP, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças como as cardiovasculares, incluindo endocardite bacteriana, bem como minimizando problemas de cunho psico-social, incluindo auto-estima e oportunidade de emprego no mercado de trabalho, que estão diretamente relacionados às conseqüências que a DP pode gerar; neste contexto novos instrumentos diagnósticos são necessários. Assim, qualquer esforço para a compreensão desta doença será sempre válido.

6. CONCLUSÕES

- A distribuição dos alelos DRB e DQB nos grupos teste e controle é semelhante.
- O alelo HLA-DRB1*15 poderia ser um marcador de predisposição genética para PCS.
- É necessária a realização de novos estudos de associação entre HLA e PCS para confirmação dos resultados.
- É necessária a ampliação da amostra controle.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, M. **HLA in Asia-Oceania**. Sapporo, Japan: Proceedings of the 3rd Asia-Oceania Histocompatibility Workshop Conference. Hokkaido University Press, 1986.

ALLEY, C.S.; REINHARDT, R.A.; MACE, C.A. et al. **HLA-D and T lymphocyte reactivity to specific periodontal pathogens in type I diabetes periodontitis**. Journal of Periodontology, v. 64, p. 974-979, 1993.

AMER, A.; SINGH, G.; DARKE, C. et al. **Association between HLA antigens and periodontal disease**. Tissue Antigens, v. 31, p. 53-58, 1988.

APCD - **Associação Paulista de Cirurgiões-dentista**. ano 39, n. 567, jul./ 2004.

ARMITAGE, G. C. **Development of a classification system for periodontal diseases and conditions**. In: **1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions**. Ann Periodontol, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

ASHIKAGA, T. **Association between HLA-antigens and periodontal disease**. Bulletin of Josi Dental University, v. 13, p. 275-284, 1984.

AZEVEDO ES. **Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil.** Annals of Human Genetics, v. 44, p. 55-60, 1980.

BEATY, T. **Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband** .An J Hum Genet, v. 40, p. 443-452, 1987.

BONFIL, J.J.; DILLIER, F.L.; MERCIER, P. et al. **“A case control” study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis**”. J Periodontol, v .26, p.77-84, 1999.

BOUGHMAN, J. A. **An autossomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc.** J Craniofac Genet al.Dev Biol, v. 6 , p. 341-350, 1986.

CATTABRIGA, M.; ROTUNDO, R.; MUZZI, L. et al. **Retrospective evaluation of the influence of the interleukin 1 genotype on radiographic bone levels in treated periodontal patients over ten years.** J. Periodontol, v. 72, p. 767-773, 2001.

COGEN, R.B.; ROSEMAN, J.M.; AL-JOBURI, W. et al. **Host factors in juvenile periodontitis.** J Periodont Res, v. 13, p. 275-284, 1986.

CRUZ, M. **Estudo de associação entre HLA e Tireoidites auto-ímmunes (pós-parto e Hashimoto) na Bahia-Brasil.** Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Programa de Pós-graduação em Imunologia-Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 1999.

CULLINAN, M.P.; SACHS, J.; WOLF, E. et al. **The distribution of HLA-A antigens and B antigens in patients and their families with periodontosis.** J Periodont Res, v. 15, p. 177-184, 1980.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R.C. **The microbial challenge in periodontitis.** Periodontol. 2000, v. 14, p. 12-32, 1997.

DONADI, E.A. et al. **Associação do Sistema HLA com doenças no Brasil.** Medicina, Ribeirão Preto, v. 33, p.7-18, jan/mar, 2000.

EBRINGER, A. **Ankylosing spondylarthritis, HLA B27 and the theory of crossed tolerance.** Rev Rhum Mal Osteoartic, v. 50, p. 763-769, 1983.

FIRATLI, E.; KANTARCI, A.; CEBECI, I. et al. **Association between HLA antigens and early onset periodontitis.** J Clin Periodontol, v. 23, p. 563-566, 1996.

GARGIULO, A.V.; TOTO, P.D.; ROBINSON, J.A. et al. **Latex slide agglutination vs ELISA system rheumatoid factor detection in inflamed human gingiva.** Journal of Periodontal Research, v. 20, p. 31-34, 1985.

GENCO, R.J. **Current view of risk factors for periodontal diseases.** J Periodontol, v. 67, p.1041-1049, 1996.

HART, T.C. et al. **Reinterpretation of the evidence of X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis.** J Periodontol, v. 63, p. 169-173, 1992.

HART, T.C. **Genetic considerations of risk in human periodontal disease.** Curr Opin Periodontol, v. 1, p. 3-11, 1994.

HIRSH, H.Z.; TARKOWSKI, A.; KOOPMAN, W.J. et al. **Local production of IgA and IgM rheumatoid factors in adult periodontal diseases.** Journal of Clinical Immunology, v. 9, p.273-278, 1989.

IMANISHI, T.; AKAZA, T.; KIMURA, A. et al. **Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups.** Ann. Human. Genet, v. 68, p. 257-264, 1992.

IMGT. **IMGT Database.** Disponível em: <
<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/download.html>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

JEFFCOAT, M. K.; REDDY, M. S. **Progression of probing attachment loss in adult periodontitis.** J Periodontol, v. 62, p. 185-189, 1991.

KINANE, D.F. **Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease.** Crit Rev Oral Biol Med, v. 14(6), p. 430-449, 2003.

KASLICK, R.S.; WEST, T.L.; CHASENS, A.I. et al. **Association between HLA-A2 antigen and various periodontal diseases in young adults.** J Dent Res, v. 54, p. 424, 1975.

KASLICK, R.S.; WEST, T.L.; CHASENS, A.I. **Association between ABO blood groups, HLA antigens and periodontal diseases in young adults: a follow-up study.** J Periodontol, v. 51, p. 339-342, 1980.

KATZ, J.; GOULTSCHIN, J.; BENOLIEL, R. et al. **Human leukocyte antigen (HLA) DR4: Positive association with rapidly progressive periodontitis.** J Periodontol, v. 58, p. 607-610, 1987.

KLOUDA, P.T.; PORTER, S.R.; SCULLY, C. et al. **Association between HLA-A9 and rapidly progressive periodontitis.** Tissue Antigens, v. 28, p. 146-149, 1986.

KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; AZEVEDO, M.P.M.I. **Racial admixture in north – eastern Brazil.** Ann. Hum. Genet. Lond, v. 29, p. 113-125, 1965.

LINDHE, J. **Pathogenesis of periodontitis. In: Clinical Periodontology and Implant Dentistry.** 3 ed. Copenhagen: Munksgaard, p. 189-225, 1999.

LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H. et al. **Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss attachment in Sri Lankan Laborers 14 to 16 years of age.** J Clin Periodontol, v. 13, p. 431-440, 1986.

LONG, J.C. et al. **A comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance.** Genetic Epidemiol, v. 4. p. 13 – 24, 1987.

MACHION, L.; FREITAS, P. M.; CESAR NETO, J.B. et al. **A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsas periodontais.** Pesq Odont Brás, v. 14, n. 1, p.33-37, jan/mar, 2000.

MACHULLA, H.K.G.; STEIN, J.; GAUTSCH, A. et al. **HLA-A, B, Cw, DRB1,DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP).** J Clin Periodontol, v. 29. p. 573-579, 2002.

MADDEN, D.R. **The three dimensional structure of peptide-MHC complexes.**Ann. Rev. Immunol, v. 13, p. 587-62, 1995.

MARGGRAF, E.; VON KEYSERLINGK-EBERIUS, H.J.; KOMISCHKE, B.et al. **Die Assoziation von histokompatibilitatsantigenen (HLA-Antigene) mit profunden Paradontopathien.** Dtsch zahnarzd Z, v. 38, p. 585-589, 1983.

MAY, N.Y.; TATAKIS, D.N. **Accelerated alveolar bone loss in male HLA-B27 transgenic rats: adult onset.** J Periodont Res, v. 39, p. 33-36, 2004.

MONTE, S.J.H.; MOITA NETO, J.M.; RAMPIM, G.F. et al. **Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí.** Ver Assoc Med Bras, v. 50, n. 04, p. 422-426, out/dez, 2004.

NISHIMURA, F.; NAGAI, A.; KURIMOTO, K. et al. **A family study of mother and daughter with increased susceptibility to early onset periodontitis: Microbiological, immunological, host defensive and genetic analysis.** Journal of Periodontology, v. 61, p. 755-765, 1990.

OHYAMA, H.; TAKASHIBA,S.; OYAIZU,K. et al. **HLA class II genotypes associated with early onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease.** J Periodontol, v. 9, p. 888-894, 1996.

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

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. **Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work.** Lab Invest, v. 33, p. 235-249, 1976.

PAGE, R. C.; SIMPSON, D. M.; AMMONS, W. F. **Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease.** J. Periodontol, v. 46, p. 144-155, 1975.

PARRA et al.PNAS, 100(1):177, 2004.

PENA, S.D. **Homo brasiliis: aspectos genéticos, lingüísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro.** Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002.

PINTO, V. G. **Saúde Bucal: odontologia social e preventiva**. São Paulo: Santos, 3 ed, 415p, 1994.

PRICE, P.; CALDER, D.M.; WITT, C.S.; ALLCOCK, R.J.N. et al. **Periodontal attachment loss in HIV infected patients is associated with the major histocompatibility complex 8.1 haplotype (HLA-A1,B8,DR3)**. Tissue Antigens, v. 54, p. 391-399, 1999.

REICHERT, S.; STEIN, J.; GAUTSCH, A. et al. **Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis**. Oral Microbiology Immunology, v. 17, p. 360-368, 2003.

REINHOLDT, J.; BAY, I.; SVEJGAARD, A. **Association between HLA- antigens and periodontitis disease**. J Dent Res, v. 56, p. 1261-1263, 1977.

RITCH, R.R. **Clinical Immunology. Principles and Practice**. Mosby-Year Book, Inc. Missouri, v. 02, 2228 p, 1996.

SAXEN, I.; KOSKIMIES, S. **Juvenile periodontitis – no linkage with HLA antigens**. J Periodont Res, v. 15, p. 177-184, 1984.

SBARAGLIA, M.; TURNBULL, R.S.; LOCKER, D. **Risk indicators for periodontal disease in a remote Canadian community – a dental practice based study**. Winter , v. 62, n. 1, 2002.

SCHENKEIN, H.A. & van DYKE, T.E. **Early-onset periodontal disease.** In: **GENCO, R. Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease.** Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 373-86, 1994.

SCHENKEIN, H. A. & van DYKE, T. E. **Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and pathogenesis.** *Periodontology* 2000, v. 6, p. 7-25, 1994.

SELVIG, K. A. **Ultrastructural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease.** *Acta Odontol Scand*, v. 24, p. 459-500, 1966.

SEYMOUR, G. J.; GREENSPAN, J. S. **The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease.** *J. Periodont Res*, v. 14, p. 39-46, 1979.

SHAPIRA, L.; EIZENBERG, S.; SELA, M.N. et al. **HLA A9 and B15 are associated with the generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases.** *J Periodontol*, v. 65, p. 219-223, 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; GOODSON, J. M.; LINDHE, J. **New concepts of destructive periodontal disease.** *J Clin Periodontol*, v. 11, p. 21-32, 1984.

SOFAER, J.A. **Genetic approaches in the study of periodontal diseases.** *J Clin Periodontol*, v. 65, p. 631, 1994.

STEIN, J.; REICHERT, S.; GAUTSCH, A.; MACHULLA, H.K. **Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis?** J Periodont Res, v. 38, p. 508-517, 2003.

TAKASHIBA, S.; NOJI, S.; NISHIMURA, F. et al. **Unique intronic variations of HLA-DQ β gene in early onset periodontitis.** J Periodontol, v. 65, p. 379-386, 1994.

TAKASHIBA, S.; OHYAMA, H.; OYAIZU, K. et al. **HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early onset periodontitis.** J Periodontal Res, v. 34 , p. 374-378, 1999.

THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. **Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors.** Ann Periodontol, v.1. p.926-932, nov. 1996.

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

URBAN GR; CHICZ RM. **MHC molecules.** RG Landes Company and Chapman & hall, 1996.

WENNSTROM, J.L.; SERINO, E.; LINDHE, J. et al. **Periodontal conditions of adult regular dental care attendants. A 12-year longitudinal study.** Journal of Clinical Periodontology 2000, p. 714-722, 1993.

YOSHIMITUS, A.; NORIYOSHI, S.; MASARU, Y. et al. **Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells.** Ann Periodontol , v. 3, p. 350-69, 1998.

ZHANG, S.J.; YANG, A.L.; ZHANG, J.C.; ZHANG, Y.H. TANG,Y. **Association of HLA-DRB1*15 polymorphism with the susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese Han nationality.** Shanghai Kou Qiang Yi Xue, v. 13, n. 3, p. 182-185, jun. 2004.