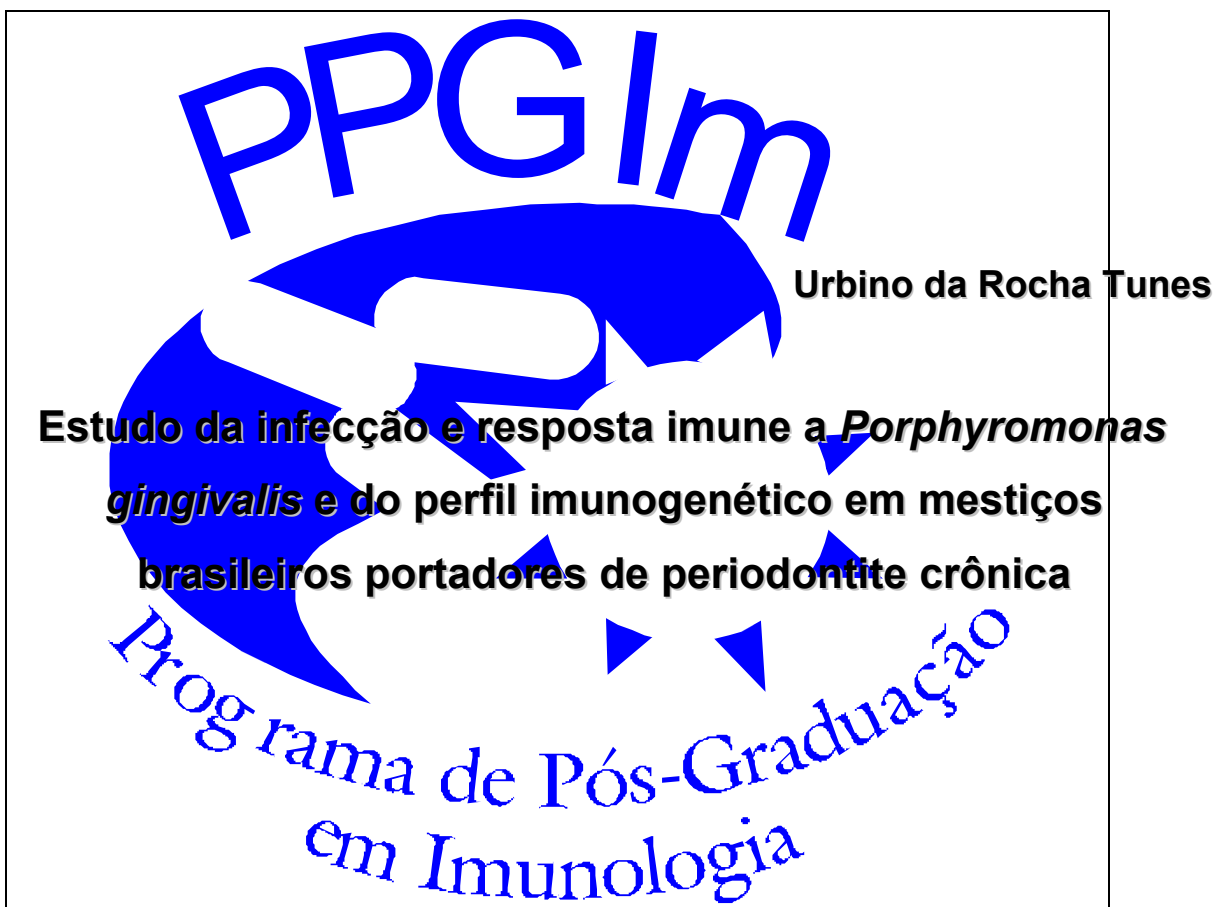


UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Instituto de Ciências da Saúde

*Programa de Pós-Graduação em Imunologia*

Tese de Doutorado



Salvador  
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
Instituto de Ciências da Saúde

*Programa de Pós-Graduação em Imunologia*

Tese de Doutorado



Urbino da Rocha Tunes

**Estudo da infecção e resposta imune a *Porphyromonas gingivalis* e do perfil imunogenético em mestiços brasileiros portadores de periodontite crônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Denise Carneiro Lemaire

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Songeli Menezes Freire

Salvador  
2006

Biblioteca Prof. Penildon Silva – ICS - UFBA

\_\_\_\_\_ Tunes, Urbino da Rocha  
Estudo da infecção e resposta imune a *Porphyromonas gingivalis* e do perfil imunogenético em mestiços brasileiros portadores de periodontite crônica / **Urbino da Rocha Tunes – Salvador, 2006.**  
\_\_f.:il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Carneiro Lemaire  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Songeli Menezes Freire

**Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Imunologia, 2006.**

1. Periodontite. 2. *Porphyromonas gingivalis* 3. Resposta imune 4. Perfil imunogenético I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Título.

C.D.U.: \_\_\_\_\_

A Deus, pela delegação  
da possibilidade  
de viver produtivamente.

Ao meu núcleo familiar -  
Jeanne, Roberta e Roberto,  
e aos demais membros  
da família Tunes,  
pela alegria de tê-los ao meu lado.

A todos da minha convivência,  
pelos ensinamentos  
para a compreensão da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

### **À Profª Drª Denise Carneiro Lemaire**

Pelo exemplo de profissional completa: mente privilegiada a serviço da ciência e do homem; pessoa humana sensível e solidária; orientadora responsável e eficiente. Pelo privilégio de participar do amplo círculo de elementos que constituem a sua vida de trabalho e, especialmente, afetiva.

### **À Profª Drª Songelí Menezes Freire**

Por também encampar, com total disponibilidade, a idéia do desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa no PPGIm, em Imunologia das Doenças Periodontais, e fazer disto uma ponte de união com toda a classe odontológica baiana. Pelo companheirismo e comunhão de ideais no desenvolvimento da docência e da pesquisa.

### **Aos colegas Livia Pugliese e Paulo Juiz**

Pela comunhão de ideário e oportunidade da realização de um trabalho em equipe.

### **À professora Maria Teresita Bendicho**

Pela prestimosa, e solidária, contribuição no ensino e desenvolvimento de trabalhos laboratoriais, e agradável convívio.

### **A todos os membros do corpo docente do PPGIm**

Especialmente a Cláudia Brodskyn, Sílvia Sarti, Gúbio Campos, Maria de Fátima Dias, Mittermayer Reis, Márcia Tosta, Edgar Marcelino de Carvalho e Moisés Sadirguski, pelos ensinamentos competentemente prestados.

### **Ao Prof. Dr. Roberto Meyer**

Pelo exemplo de liderança e trabalho, e pela abertura de visão, ao permitir o desenvolvimento desta nova linha de pesquisa no Labimuno.

### **A toda a equipe de colaboradores do LABIMUNO**

Pela contribuição fundamental no desenvolvimento deste projeto.

### **Aos colegas Lilia Moura Costa e Bruno Paule**

Pela convivência amistosa e solidária.

### **A Dilcéia**

Pela conduta de sempre “bem servir”, com eficiência e carinho, na secretaria do PPGIm.

### **Aos amigos da Periodontia da Odonto-EBMSP/FBDC**

Sylvia, Getúlio, Mônica, Cláudia, Cecília, Sandro e Roberta Tunes, pela convivência saudável e estimuladora, fraterna e solidária, marca de união do nosso grupo.

**Aos colaboradores do Curso de Odontologia da EBMSP/FBDC**

Pela grande ajuda na recepção e encaminhamento dos pacientes participantes da pesquisa, em especial às professoras Roberta Catapano e Suzyane Almeida pelo auxílio na triagem dos pacientes e às funcionárias Sandra Reis e Edna Estrela pela execução da coleta de sangue.

**Ao CD Tiago Galvão e aos estagiários do Curso de Odontologia da EBMSP/FBDC Ana Luíza, Ari, Cíntia, Daniela, Isaura, Januária, Suziane e Rafael**

Pela grande ajuda prestada no atendimento e tratamento dos voluntários da pesquisa.

**Aos voluntários participantes da pesquisa**

Pela doação a uma causa nobre.

**Aos meus amigos e familiares**

Por contribuírem com atos, palavras, e silêncio compreensivo, para o desfecho deste trabalho.

---

Este estudo foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC) e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO/ICS/UFBA).

---

“O conhecimento é um todo jamais completo...”

Piaget

No homem, o trabalho  
é razão  
de viver.

Na mente, o ideário  
é paixão  
do humano ser.

URTunes



## CONSIDERAÇÕES

Este trabalho é parte integrante de um amplo projeto de pesquisa que visa avaliar e correlacionar aspectos clínicos, microbiológicos, imunológicos e genéticos de indivíduos portadores de Periodontite Crônica, numa parceria entre o Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/EBMSP-FBDC e o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular /Labimuno da Universidade Federal da Bahia.

Estão abaixo enumerados os produtos gerados a partir do projeto de pesquisa desta tese de doutorado bem como as futuras perspectivas de pesquisa a serem realizadas.

### ↳ **Produtos**

#### 1) Dissertações de Mestrado:

- VILAS-BOAS MO. Determinação de níveis de IgA e IgG anti-*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, e de IgA e IgG totais e específicos em fluidos de pacientes portadores de periodontite crônica severa. Dissertação (Mestrado em Odontologia); Orientadora: FREIRE SM; Co-orientador: TUNES UR. Programa de Pós-graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia da UFBA, Salvador/BA, 2003.
- JUIZ P JL. Estudo de associação do HLA e periodontite crônica severa. Dissertação (Mestrado em Imunologia); Orientadora: LEMAIRE, DC; co-orientador: TUNES, UR – Programa de Pós-graduação em Imunologia/PPgIm - Instituto de Ciências da Saúde/ICS, UFBA, Salvador/BA, 2005.
- PUGLIESE LS. Estudo da resposta imune a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*: produção de IL-10 e IFN-gama em cultura de células de sangue total e níveis séricos de IgG anti-*Porphyromonas gingivalis* em portadores de periodontite crônica. Dissertação (Mestrado em Imunologia); Orientadora: FREIRE, SM; co-orientador: TUNES, UR – Programa de Pós-graduação em Imunologia/PPgIm - Instituto de Ciências da Saúde/ICS, UFBA, Salvador/BA, 2005.

#### 2) Capítulo de Livro:

- TUNES UR, NOGUEIRA-FILHO GR, TODESCAN SMC, DOURADO MC. Classificação das doenças periodontais. In: Paiva JS, Almeida RV. Periodontia – atuação clínica baseada em evidências científicas. S.Paulo: Edit. Artes Médicas 2005; 107-120.

#### 3) Trabalhos resumidos publicados em eventos:

- PEIXOTO ITA, FRANCA M, VILAS-BOAS MO, TUNES UR, PAULE B, MACEDO E, COSTA LM, FREIRE SM. Nível de IgG sérica contra antígenos de *P.gingivalis* ATCC 33277 em pacientes com periodontite crônica. Pesqui Odontol Brás 2003; 17(Supl 2):103.

- VILAS-BOAS MO, BRANDÃO M, TUNES UR, ITANO E, MEYER R, PEIXOTO ITA, BARRETO E, FREIRE SM. Níveis de Ig anti-*Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo B em fluidos de pacientes com periodontite crônica. Pesqui Odontol Bras 2003; 17(Supl 2)206.
- PUGLIESE LS, TUNES UR, FREIRE SM. Aspectos da resposta imune humoral e celular a antígenos de *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em indivíduos portadores de Periodontite Crônica Severa. I Seminário de Periodontia em Saúde Coletiva/UEFS, 2004.
- PUGLIESE LS, TUNES UR, FREIRE SM. High IL-10 but not IFN-gamma production in whole blood cell culture stimulated with periodontopathogens antigens: correlations between cytokines concentration and humoral immune response in chronic periodontitis patients. 10th International Academy of Periodontology Congress – Salvador, Out 2005.
- JUIZ PJL, TUNES UR, PUGLIESE L, FREIRE S, MEYER R, LEMAIRE DC. Estudo da frequência do HLA em pacientes com doença periodontal crônica severa. Anais IX Cong Bras Transplantes e IV Cong LusoBrasileiro de Transplantes, 2005.

#### 4) Publicações (encaminhamento):

- PUGLIESE, LS; JUIZ, PJL; MOURA-COSTA, L; TRINDADE, SC; BRANDÃO, C; ITANO, EN; MEYER, RN; LEMAIRE, DC; TUNES, UR; FREIRE, SM. High IL-10 but not IFN-gamma production in whole blood cell culture stimulated with periodontopathogens antigens: correlations between cytokines concentration and humoral immune response in chronic periodontitis patients. (Clin Exp Immunol).
- Três artigos (vide Produtos da Tese).

#### ↳ **Perspectivas:**

- Compondo o perfil de infecção por periodontopatógenos associados a periodontite crônica, usando a mesma metodologia (PCR), identificar a presença de *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, na amostra estudada.
- Avaliar a produção de IL-4 e IL-2 em Cultura de Células de Sangue Total (CCST) dos mesmos indivíduos, visando maior esclarecimento sobre o perfil Th1/Th2 de resposta imune.

## RESUMO

Periodontite é uma doença multifatorial que se inicia e é mantida pela agressão das bactérias periodontopatogênicas do biofilme dental subgingival, cuja forma de manifestação clínica é dependente do tipo de resposta imuno-inflamatória provocada pela complexa interação patógeno-hospedeiro. Dentre essas bactérias, a *Porphyromonas gingivalis* tem sido associada com o início e progressão da DP, principalmente em indivíduos adultos. Ademais, há evidências de que variações na resposta imune do hospedeiro estão, em parte, sob controle genético. Diante disto, foram objetivos do presente trabalho: □ identificar a presença de *Porphyromonas gingivalis* no biofilme subgingival; □ avaliar a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue total (CCST) sob estímulo com extrato dessa bactéria, bem como a produção de IgA, IgG e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); □ avaliar os polimorfismos dos genes das citocinas IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>, TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>códons 10T/C e 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> e IL-10<sup>-1082G/A, -819C/T, -592C/A</sup>, e do HLA-DR, -DQ, associando esses achados com a periodontite crônica severa. Oitenta e quatro indivíduos não-fumantes, idade de 30 a 50 anos, de ambos os gêneros, foram selecionados para o estudo: 43 pacientes com periodontite crônica severa constituíram o grupo caso (PCS) e 41 pacientes sem periodontite, o grupo controle (NP). Parâmetros clínicos periodontais foram avaliados. Amostras do biofilme subgingival foram coletadas para identificação da presença de *P.gingivalis*, usando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para identificação dos polimorfismos citados, foi extraído o DNA genômico de amostras de sangue periférico, sendo a genotipagem realizada também pela PCR. Dos voluntários selecionados, levando em conta o leucograma respectivo, CCST foi realizada com amostras sanguíneas de 35 indivíduos, 18 do grupo PCS e 17 do grupo NP, estimulada com antígenos bacterianos. As concentrações das citocinas nos sobrenadantes e das imunoglobulinas séricas foram determinadas utilizando-se o teste ELISA. A análise estatística foi realizada usando os testes t-student, Mann-Whitney, Teste de Correlação de Spearman e Teste Exato de Fisher. Foi detectada a presença de *P.gingivalis* em 29 (67,4%) dos pacientes do grupo PCS enquanto que a presença deste periodontopatógeno não foi observada em nenhum dos indivíduos do grupo NP. Os antígenos testados induziram altas concentrações de IL-10, e baixa de IFN- $\gamma$ , especialmente *P.gingivalis*. CCST do grupo PCS apresentou significativamente ( $p < 0,05$ ) maior produção de IL-10, do que do grupo NP, quando foi estimulada com LPS de *E.coli* e extrato de *P.gingivalis*. Quanto à resposta imune humoral, os níveis séricos de IgG, IgG1, IgG4 ( $p \leq 0,001$ ) e IgG2 ( $p \leq 0,05$ ) anti-*P.gingivalis* foram significativamente mais elevados no grupo PCS em comparação ao grupo NP. Nos polimorfismos estudados foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas entre os indivíduos do grupo PCS e NP em relação ao gene da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C/T)</sup>; o genótipo homocigoto para o alelo 1 (CC), fenótipo previsto como baixo produtor, teve frequência significativamente maior ( $p = 0,03$ ) no grupo NP (81,48%) do que no PCS (65%); inversamente, e com tendência de significância estatística ( $p = 0,08$ ), o alelo 2 da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup>, fenótipo previsto como alto produtor, estava associado mais ao grupo PCS (21,25%) do que ao NP (10,53%). Foi também observada uma frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do alelo HLA-*DQB1*\*05 nos indivíduos do grupo NP em relação ao grupo PCS. A produção elevada de IL-10 e baixa de IFN- $\gamma$  na CCST estimulada com extrato bruto de *P.gingivalis* dos pacientes do grupo PCS, bem como elevados níveis de IgG4 anti-Pg, podem sugerir que este periodontopatógeno desvia a resposta imune para um perfil Th2. Por sua vez, os resultados dos polimorfismos sugerem que o genótipo homocigoto para o alelo 1 (CC) da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C)</sup> pode ser um fator de proteção, assim como o alelo HLA-*DQB1*\*05, e que o alelo 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite crônica severa, em mestiços brasileiros.

**Palavras-chave:** periodontite crônica; *Porphyromonas gingivalis*; resposta imune; polimorfismo;

IL-1 $\beta$ ; TNF $\alpha$ ; IL-6; TGF- $\beta$ 1; IFN- $\gamma$ ; IL-10; HLA-DR, -DQ; IgG.

## ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial disease that begins and is maintained by the aggression of periodontopathogenic bacteria in the subgingival dental biofilm, whose form of clinical manifestation is dependent on the type of immune-inflammatory response caused by the complex pathogen-host interaction. Among these bacteria, *Porphyromonas gingivalis* has been associated with the onset and progression of PD, mainly in adult individuals. Furthermore, there are evidences that variations in the host's immune response are partly under genetic control. In view of this, the following were the aims of this study: □ to identify the presence of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival biofilm; □ to assess the production of IL-10 and IFN- $\gamma$  whole blood cell cultures (WBCC) stimulated with an extract of this bacterium, as well as to determine seric levels of IgA, IgG and sub-classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); □ to assess the polymorphisms of the genes of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>, TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> and IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup>, and HLA-DR, -DQ, associating these findings with severe chronic periodontitis. Eighty-four non-smoker individuals of both genders, aged from 30 to 50 years, were selected for the study: 43 patients with severe chronic periodontitis (SCP) comprised the case group and 41 individuals without periodontitis (NP), the control group. Clinical periodontal parameters were assessed. Subgingival biofilm samples were collected to identify the presence of *P.gingivalis*, using the polymerase chain reaction technique (PCR). To identify the mentioned polymorphisms, genomic DNA was extracted from peripheral blood samples, and genotyping was also done by PCR. Of the selected volunteers, taking into account the respective leukogram, WBCC was performed with the blood samples of 35 individuals, 18 from the SCP group and 17 from the NP group, stimulated with bacterial antigens. The cytokine concentrations in the supernatants and the seric immunoglobulins were determined by using the ELISA test. Statistical analysis was done using the t-Student, Man-Whitney and Spearman Correlation and Exact Fisher tests. The presence of *P.gingivalis* was detected in 29 patients (67.4%) of the patients in the SCP group, while the presence of this periodontopathogen was not observed in any individuals of the NP Group. The tested antigens induced high IL-10, and low IFN- $\gamma$  concentrations, especially *P.gingivalis*. WBCC of the SCP group presented significantly higher ( $p < 0.05$ ) IL-10 production than that of the NP group, when it was stimulated with *E.coli* LPS and *P.gingivalis* extract. The seric levels of IgG, IgG1, IgG4 ( $p \leq 0.001$ ) and IgG2 ( $p \leq 0.05$ ) reactive to *P.gingivalis* were significantly higher in the SCP group in comparison with the NP group. In the studied polymorphisms, statistically significant differences were found in the allelic, genotypical and phenotypical frequencies among the individuals in the SCP and NP groups as regards the IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C/T)</sup> gene; the homozygote genotype for the allele 1 (CC), phenotype foreseen as low producer, had a significantly higher frequency ( $p = 0.03$ ) in the NP group (81.48%) than in SCP (65%); inversely, and with a trend towards statistical significance ( $p = 0.08$ ), the allele 2 of IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup>, phenotype foreseen as high producer, was higher in the SCP group (21.25%) than in NP (10.53%). A significantly higher frequency ( $p < 0.05$ ) of allele HLA-*DQB1*\*05 was also observed in the individuals of the NP group in comparison with the SCP group. The high IL-10 and low IFN- $\gamma$  production in the WBCC stimulated with raw *P.gingivalis* extract, in the patients of the SCP group, as well as the high levels of anti-Pg IgG4, may suggest that this periodontopathogen deviates the immune response to a Th2 profile. In turn, the results of the polymorphisms suggest that the homozygote genotype for the allele 1 (CC) of IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C)</sup> may be a protection factor and that the allele 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> may be a risk factor, and there is also a suggestion that the allele HLA-*DQB1*\*05 may be a genetic protection marker for the development of severe chronic periodontitis in Brazilians of mixed race.

**Key Words:** chronic periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; immune response; polymorphism; IL-1 $\beta$ ; TNF $\alpha$ ; IL-6; TGF- $\beta$ 1; IFN- $\gamma$ ; IL-10; HLA-DR, -DQ; IgG.

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE QUADROS.....	16
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE FIGURAS.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Periodontopatógenos na periodontite crônica.....	24
2.2 Imunopatogenia da doença periodontal.....	30
2.3 A reabsorção óssea na doença periodontal.....	40
2.4 A produção de citocinas.....	42
2.5 A resposta imune a <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	46
2.6 A susceptibilidade genética da doença periodontal.....	53
3 OBJETIVOS.....	74
3.1 Objetivos gerais.....	74
3.2 Objetivos específicos.....	74
4 DESENHO DO ESTUDO.....	75
5 PRODUTOS DA TESE.....	76
5.1 Artigo 1 – “Prevalência de <i>Porphyromonas gingivalis</i> , e leucometria, em mestiços brasileiros com periodontite crônica”.....	77
5.2 Artigo 2 – “Infection and cellular and humoral immune response do <i>Porphyromonas gingivalis</i> in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis”.....	93
5.3 Artigo 3 – “Polymorphism of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> , TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> , IL-6 <sup>-174G/C</sup> , TGF- $\beta$ 1 <sup>códons 10T/C e 25G/C</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> e IL-10 <sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> , and of HLA-DR, -DQ, in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis”.....	117
6 DISCUSSÃO.....	139
7 CONCLUSÕES.....	156
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
APÊNDICES E ANEXOS.....	167

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAP	American Academy of Periodontology
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin (em português, Albumina Sérica Bovina)
CCST	Cultura de Células de Sangue Total
CD	Cluster of differentiation (em português, grupo de diferenciação)
CTL	Linfócito T Citolítico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (em português, ensaio imunoenzimático)
FAPESB	Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia
FBDC	Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências
g	Gram
h	Hora
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
IFN-gama	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina isótipo A
IgG	Imunoglobulina isótipo G
IgM	Imunoglobulina isótipo M
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IPV	Índice de placa visível
ISG	Índice de sangramento gengival
ISS	Índice de sangramento à sondagem
JAKs	Janus kinases (em português: Janus cinases, uma família de tirosina cinase citoplasmática)
LABIMUNO	Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
LB	Linfócito B
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócito T
LTh1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
LTh2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
Ltx	Leucotoxina
µg	Micrograma
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
µL	Microlitro

NIC	Nível de Inserção Clínica
NK	Natural Killer (em português, célula assassina natural)
nm	Nanômetro
OPD	Orto-Fenilenodiamina
OPT	Osteoprotegerina
p	Valor de probabilidade
PBS	Phosphate Buffered Salin (em português, Salina Tamponada com Fosfato)
PBS-t	PBS contendo 0,05% de tween 20
PCS	Periodontite Crônica Severa
pg	Picograma
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PS	Profundidade de Sondagem
PWM	Pokeweed Mitogen (em português: mitógeno Pokeweed, obtido a partir da <i>Phytolacca americana</i> ).
ROC	Receiver Operating Characteristic (Em Português, Curva Operacional Relativa)
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling (em português, família de proteínas supressoras da sinalização de citocinas)
SS	Sangramento à sondagem
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (em português, família de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição)

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Prevalência de <i>Porphyromonas gingivalis</i> em diversas regiões geográficas.	30
<b>Quadro 2</b>	Sumário dos principais achados de trabalhos sobre a variação intersujeitos na produção de citocinas, e periodontite crônica.	42
<b>Quadro 3</b>	Sumário dos principais achados de trabalhos sobre a associação entre HLA e periodontite crônica.	58
<b>Quadro 4</b>	Sumário dos principais achados de trabalhos sobre a associação entre genótipo composto IL-1A/IL-1B associado a periodontite (GAP), e periodontite crônica, incluindo implantes.	62
<b>Quadro 5</b>	Sumário dos principais achados de trabalhos sobre a associação entre genótipos de outras citocinas incluídas neste estudo e periodontite crônica.	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo 1</b>	Sumário de achados sobre prevalência de <i>P.gingivalis</i> em diversas	87
-----------------	---	----



Tabela 1	regiões geográficas	
<b>Artigo 1</b>	Gênero, etnia, dados clínicos e laboratoriais dos grupos caso (PCS) e controle (NP).	88
Tabela 2		
<b>Artigo 2</b>	Gender, ethnicity, age, clinical and laboratory data of the study groups.	107
Tabela 1		
<b>Artigo 2</b>	IL-10 and IFN- $\gamma$ Values, and IL-10:IFN- $\gamma$ ratio without stimulation and with <i>P.gingivalis</i> stimulation, of the groups with chronic periodontitis (SCP) and without periodontitis (NP).	108
Tabela 2		
<b>Artigo 2</b>	Correlations between IL-10 and IFN- $\gamma$ : basal concentration (SE) and with <i>P.gingivalis</i> (Pg) stimulation.	110
Tabela 3		
<b>Artigo 2</b>	Optic densities (OD) of the anti-Pg seric levels of IgA, IgG and sub-classes, of the case (SCP) and control (NP) groups. Description of the percentiles and medians. OD 450-630 nm.	110
Tabela 4		
<b>Artigo 3</b>	Gender, ethnicity, age and clinical data of the study groups.	130
Tabela 1		
<b>Artigo 3</b>	Distribution of the allelic, genotypical and phenotypical frequencies foreseen in the polymorphism of the IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> gene in the case (SCP) and control (NP) groups.	131
Tabela 2		
<b>Artigo 3</b>	Genotypical and phenotypical frequency of polymorphism of the genes TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> , IL-6 <sup>-174G/C</sup> , IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> , IL-10 <sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> <sup>codons 10T/C and 25G/C</sup> , in the individuals in the case (SCP) and control (NP) groups. Exact Fisher Test.	131
Tabela 3		
<b>Artigo 3</b>	Frequency of alleles HLA-DRB1*, -B3*, -B4*, -B5*, -DQB1* in the group of patients with severe chronic periodontitis (SCP) and in the control group (NP).	132
Tabela 4		

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Composição da placa subgingival segundo Socransky <i>et al</i> (1998). Adaptado de Feres & Gonçalves (2001).	25
<b>Figura 2</b>	Modelo de patogênese da DP. Adaptado de Page & Kornman. Periodontology 2000, p.10, 1997.	31
<b>Figura 3</b>	Modelo de osteoclastogênese segundo Taubman <i>et al</i> , 2005.	41

<b>Figura 4</b>	(a) reconhecimento de diferentes PAMPs por múltiplos TLRs acarreta em sinalizações intracelulares variadas e respostas diferentes. (b) O domínio extracelular do TLR4 associa-se com MD-2 e CD-14, enquanto o domínio intracelular forma um complexo de sinalização incluindo MyD88, Tollip, IRAK e TIRAP/MAL. As respostas específicas do TLR4 são mediadas por TIRAP/MAL. O domínio extracelular do dímero TLR2-TLR6 também associa-se com CD-14. O domínio intracelular também inclui MyD88, Tollip e IRAK. TLR2-TLR6 pode associar-se especificamente com PI3 cinase sob regulação de RAc1 para ativar Akt. <i>Reproduzido e Traduzido de UNDERHILL &amp; OZINSKY, 2002.</i>	49
<b>Figura 5</b>	Mapa esquemático dos <i>loci</i> CPH humano	56
<b>Artigo 2</b> Figura 1	Production of IL-10 (a) and IFN- $\gamma$ (b) <i>in vitro</i> in WBCC of individuals with (SCP, n=18), or without (NP, n=17) severe chronic periodontitis. The columns represent the medians of the data. * $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney).	109
<b>Artigo 2</b> Figura 2	Comparison of the ratio of IL-10:IFN- $\gamma$ concentration observed in WBCC among individuals in the case (SCP) and control (NP) groups, under the tested stimuli. The columns represent the medians of the data.	109
<b>Artigo 2</b> Figura 3	The columns represent the medians of the optic densities (OD) of the seric levels of anti- <i>P.gingivalis</i> immunoglobulins in the group with severe chronic periodontitis (SCP) and without periodontitis (NP): a) IgG ( $p \leq 0.001$ ) and IgA; b) IgG1 ( $p \leq 0.001$ ), IgG2 ( $p \leq 0.05$ ), IgG3 and IgG4 ( $p \leq 0.001$ ).	111

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções dentais são as doenças infecciosas mais comuns em humanos e, dentre elas, as doenças periodontais representam importante problema bucal principalmente para indivíduos adultos. Uma das suas principais conseqüências é a perda dental que acarreta transtornos

funcionais, mastigatórios, fonéticos, e estéticos, com relevante comprometimento psicossocial. Além disto, tem-se levantado evidências que as relacionam como possíveis fatores de risco para doenças cárdio-vasculares, incluindo aterosclerose e infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, endocardite bacteriana, infecções respiratórias, nascimento de bebês prematuros de baixo peso, contribuindo, também, para controle glicêmico inadequado em diabéticos. Todas essas repercussões colocam as doenças periodontais como importante problema de saúde coletiva, e alvo de atenção especial em programas de atendimento comunitário.

Doenças periodontais (DPs) incluem um amplo espectro de respostas inflamatórias e destrutivas a bactérias componentes do biofilme dental, no hospedeiro humano susceptível. Enquanto a gengivite, usualmente, está associada a um inadequado controle desse biofilme, a sua progressão para periodontite é influenciada por vários fatores modificadores da resposta do hospedeiro, incluindo os ambientais, condições sistêmicas, e genéticos. Deste modo, o risco para DP não é uniforme em todos os indivíduos, embora a doença esteja presente na maioria das populações. A forma mais comum de DP, a periodontite crônica, acomete cerca de 30-40% da população adulta enquanto que aproximadamente 5-15% dos indivíduos exibem DP severa (PAPAPANOU & LINDHE, 2003; WHO, 2004). No Brasil, apenas cerca de 22% da população adulta e 8% dos idosos apresentam saúde periodontal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Embora esteja estabelecido que a agressão microbiana aos tecidos periodontais, determinada principalmente por bactérias gram-negativas específicas, ditas periodontopatogênicas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythensis* e *Treponema denticola* (AAP, 1996; SOCRANSKY *et al*, 1998; O'BRIEN-SIMPSON *et al*, 2004), seja essencial para o início e progressão da DP, isto, por si só, não é suficiente para determinar a evolução da doença em forma destrutiva (KORNMAN & HART, 1997). Dentre estas, a *Porphyromonas gingivalis* parece contribuir decisivamente para a ruptura do equilíbrio dinâmico entre o hospedeiro e a microbiota que interfere no processo saúde-doença periodontal (BAINBRIDGE & DARVEAU, 2001). No padrão histológico, a lesão estabelecida da gengivite é dominada por células T enquanto que, na lesão avançada da periodontite, as células B e plasmáticas

predominam (OH *et al*, 2002). A compreensão de como e porque nem todos os indivíduos evoluem de uma forma de lesão gengival para doença periodontal permanece indefinida.

Durante os últimos anos, tem-se evidenciado que a chave para o entendimento da patogênese da doença periodontal está no conhecimento dos detalhes da resposta imunológica do hospedeiro à ação do biofilme bacteriano subgengival. Compreender como essa resposta é desencadeada no hospedeiro, que leva à destruição dos tecidos, é primordial para estabelecer um diagnóstico racional e estratégias terapêuticas para aquela condição. Encontra-se estabelecido que citocinas exercem um papel fundamental no processo inflamatório associado à gengivite e à destruição tecidual inicial na doença periodontal, assim como na regulação da resposta imunológica que pode determinar a progressão e as manifestações clínicas da doença (TAYLOR, PRESHAW & DONALDSON, 2004).

Em vista disso, um esforço mundial vem sendo realizado almejando averiguar a resposta imune aos periodontopatógenos, constituindo um vasto campo em diferentes linhas de pesquisa. Inicialmente, os estudos focaram atenção principalmente para a resposta anticórpica aos periodontopatógenos (KINANE *et al*, 1999). Mais recentemente, estudos diversos utilizando amostras e metodologias variadas centraram esforços no papel imunorregulador das citocinas na patogênese da periodontite (GEMMEL & SEYMOUR, 2004).

Na década de 1980, Tim Mosmann e sua equipe propuseram que clones de células T auxiliares (Th) murinas poderiam ser classificados em dois grupos distintos, Th1 ou Th2, de acordo com o perfil das citocinas por eles produzidas, sendo o grupo Th2 caracteristicamente produtor de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e o grupo Th1, caracteristicamente produtor de IFN-gama (MOSMANN *et al*, 1986; CHER *et al*, 1987; FIORENTINO *et al*, 1989). Esse conceito foi posteriormente aplicado a diversos modelos patológicos em humanos, como processos infecciosos e doenças auto-imunes (LUCEY *et al*, 1996), inclusive à doença periodontal (GEMMEL & SEYMOUR, 2004). A IL-10 foi inicialmente descrita como Fator Inibidor da Síntese de Citocinas (CSIF) e associada à inibição do perfil Th1 (FIORENTINO *et al*, 1989). Entretanto, a produção de IL-10 foi observada em células T regulatórias (Tr1) (COTREZ *et al*, 2000) e alguns estudos mostraram um papel inibidor da IL-10 na resposta Th2 em camundongos (ZUANY-AMORIM *et al*, 1995; ZUANY-AMORIM *et al*, 1996) e em células T humanas isoladas do sangue periférico (SCHANDENE *et al*, 1994). Apesar de muitas

pesquisas terem sido realizadas na última década, não há um consenso na literatura quanto ao estabelecimento de um perfil Th1 ou Th2 na periodontite e sua imunopatogênese ainda permanece como um intrigante elemento de estudo.

Por outro lado, foi suscitado o conceito de respostas padrão ou elevada, em que os indivíduos hiper-responsivos produzem maiores quantidades de mediadores inflamatórios e citocinas destruidoras como parte da resposta inflamatória do hospedeiro à presença do biofilme dental. Conseqüentemente, esses indivíduos seriam mais susceptíveis à doença periodontal do que aqueles que apresentam uma resposta padrão, e que produzem níveis mínimos de mediadores inflamatórios diante de um desafio microbiano. A par disto, durante os últimos anos, tem-se mostrado que alguns indivíduos possuem no genoma variações genéticas – polimorfismos – que codificam para o aumento de secreção de citocinas, tornando-os mais susceptíveis, ou protegidos, à doença (KORNMAN & HART, 1997; ARMITAGE *et al*, 2000; CRAANDIJK *et al*, 2002; GONZALES *et al*, 2002).

Assim, evidências de que variações na resposta imune do hospedeiro frente à agressão bacteriana estão em parte sob controle genético, tornam estes fatores hereditários determinantes importantes da susceptibilidade e progressão da doença periodontal (MICHALOWICZ, 1993; MICHALOWICZ, 1994; HART & KORNMAN, 1997; WILSON, 1999; KORNMAN & GIOVINE, 1998; SCHENKEIN, 1998). Desta forma, a doença pode ser considerada multifatorial ou não Mendeliana, já que a genética não é suficiente para acarretá-la e os sinais e sintomas clínicos tornam-se mais evidentes na idade adulta, devido à interação dos fatores ambientais e genéticos na sua expressão (HART & KORNMAN, 1997; SANDROFF, 1998; WILSON, 1999).

O advento da biologia molecular possibilitou o aparecimento de novas áreas, entre elas a epidemiologia molecular. Agora, é possível relacionar uma exposição a agentes ambientais específicos com um polimorfismo genético no processo de doença. Este campo epidemiológico tem alcançado uma rápida relevância na identificação de genes que teriam um papel-chave numa grande variedade de doenças humanas. 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 deste indivíduo (ZURIER, 1993). Seria possível, então, procurar caracterizar um perfil de susceptibilidade, incorporando componentes genéticos e ambientais.

Dessa forma, a identificação da presença da *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais componentes do complexo “vermelho” de Socransky *et al* (1998), nos indivíduos acometidos ou não pela periodontite crônica severa, e o estudo da produção de IFN-gama e IL-10, duas relevantes citocinas da resposta imune, frente ao desafio com essa bactéria periodontopatogênica, bem como a avaliação da respectiva resposta imune humoral, constitui uma contribuição ao entendimento da imunorregulação dessa doença infecciosa em modelo experimental *in vitro*. Ademais, a análise da associação dos polimorfismos das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF $\beta$ , e do HLA-DR, -DQ, com a periodontite crônica, busca definir um perfil imunogenético que poderá contribuir para a compreensão do curso desse possível fator de risco, na população, para o desenvolvimento da periodontite crônica.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Em 1965, quando Løe, Theilade & Jensen estabeleceram de forma definitiva a associação da presença da placa bacteriana dental ao desenvolvimento da gengivite, já se notava que,

apesar de todos os indivíduos terem desenvolvido inflamação gengival em um período de 21 dias, isto aconteceu para cada um em momento diferente, a partir do 10º dia de acúmulo continuado de placa. Na época, o quantitativo de placa era fundamental, daí surgindo o conceito de placa não específica. Nos anos 70, entretanto, Newman *et al* (1976) assinalaram que nem todas as bactérias componentes da placa tinham uma participação efetiva no desenvolvimento da doença; adveio, então, a hipótese da placa específica (HPE).

Em 1986, Løe *et al* em seu estudo, também clássico, sobre *história natural da doença periodontal no homem*, avaliaram longitudinalmente, em cinco momentos durante 15 anos, uma população – faixa etária dos 14 aos 46 anos - de plantadores de chá no Sri Lanka, sem hábitos de higiene oral ou atendimento profissional. Gengivite era amplamente propagada, como esperado. Identificaram, entretanto, três grupos de indivíduos com diferentes formas de progressão da doença: (1) 8% com doença periodontal de rápida progressão; (2) 81% com doença periodontal de progressão moderada; (3) 11% sem progressão da gengivite para a periodontite. Depreende-se, desses resultados, que: a) gengivite precede mas não necessariamente procede em periodontite; b) indivíduos podem ter diferentes níveis de susceptibilidade à infecção; c) alguns poderiam ter sido infectados por diferentes bactérias causadoras da doença. Vê-se, assim, que a patogênese da doença periodontal é representada por uma complexa interação parasito-hospedeiro. Em vista disto, o conceito de susceptibilidade à doença tomou corpo nos anos 90, estudando-se com mais atenção os fatores de risco (SALVI *et al*, 1997). Fator de risco pode ser definido, de forma simples, como um atributo ou exposição que aumenta a probabilidade de ocorrência da doença.

Periodontite crônica é a forma mais comum de manifestação das doenças periodontais (DPs). Há uma carência de dados precisos com relação à real expressão das DPs na população mundial. Os dados epidemiológicos relativos à prevalência dessas doenças possuem complicações inerentes não somente aos diferentes critérios de definições de caso e de severidade, mas também aos diferentes critérios de exame e índices epidemiológicos aplicados (AAP, 1996b; PAPAPANOU, 1996; GJERMO *et al*, 2002). Apesar das discrepâncias metodológicas entre os estudos populacionais estima-se que, no mundo, 5 a 15% dos indivíduos na faixa etária dos 35 aos 44 anos são acometidos por periodontite crônica severa (WHO, 2004).

Nas Américas Central e do Sul, estudos nacionais representativos são quase inexistentes. Numa revisão dos estudos epidemiológicos disponíveis, Gjermo *et al* (2002) mostraram que a prevalência da DP severa varia entre 4 a 19%, nos adultos, entre os diferentes países da região.

No Brasil, os dados populacionais representativos mais recentes são provenientes do Projeto SB 2003, referentes a informações coletadas no período de 2002 a 2003. Os resultados apontam que 9,9% dos indivíduos adultos na faixa etária dos 35 aos 44 anos, possuem profundidade de sondagem (PS)  $\geq 4$  mm. Na região Nordeste do País a prevalência é de 9,8%, semelhante aos dados nacionais. O projeto não avaliou o nível de inserção clínica (NIC) da população e foi realizado de acordo com o índice periodontal comunitário - IPC, um índice preconizado pela OMS e baseado em exame parcial da boca (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Os exames parciais são amplamente criticados na literatura e podem subestimar a prevalência da doença e a extensão dos sítios afetados (PAPAPANOU, 1996; BORGES-YÁÑEZ *et al*, 2004).

Diante dos fatos acima e para melhor compreensão da imunopatogenia da periodontite crônica, esta revisão aborda aspectos referentes à infecção pelo periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* e consequente resposta imune, bem como o perfil imunogenético que, como fator de risco, pode influenciar nessa resposta do hospedeiro.

## **2.1 – Periodontopatógenos na periodontite crônica**

Ainda hoje, o método mais apropriado de impedir a progressão da doença periodontal (DP) é por meio de um efetivo controle dos microrganismos que habitam o biofilme dental. Assim, é importante conhecer a composição deste biofilme com o intuito de propor uma terapia eficaz de tratamento (LOPEZ *et al*, 2005).

O diagnóstico microbiológico utilizado como ferramenta de trabalho proporciona aos clínicos um direcionamento adequado para uma efetiva terapia periodontal, avaliação do tratamento e medidas de controle, podendo-se estimar a prevalência dos periodontopatógenos em indivíduos com ou sem doença periodontal.

Das cerca de 400 espécies bacterianas que podem colonizar a microbiota subgingival, apenas poucas são relacionadas à patogênese da periodontite. A presença de complexos microbianos foi sugerida por Socransky *et al* (1998) que, utilizando o método de *Checker-*



*board DNA-DNA hybridization*, estudaram a presença de 40 espécies bacterianas em 13.321 amostras de placa subgingival (máximo de 28 amostras por indivíduo) de 185 pacientes adultos com DP, examinando as relações existentes entre os microrganismos. Identificaram seis grupos bacterianos intimamente correlacionados. Conforme visto na Figura 1, as bactérias componentes dos grupos amarelo, verde e azul, seriam os colonizadores primários da superfície dentária, precedendo os demais. O complexo “vermelho” é formado por *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tanarella forsythensis* (*Tf*) e *Treponema denticola* (*Td*) que, juntamente com *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*), são considerados os principais patógenos periodontais. A colonização das bactérias do complexo “vermelho” é dependente daquela do grupo laranja que a precede, cujos microrganismos são, por isto mesmo, importantes no desenvolvimento da DP.

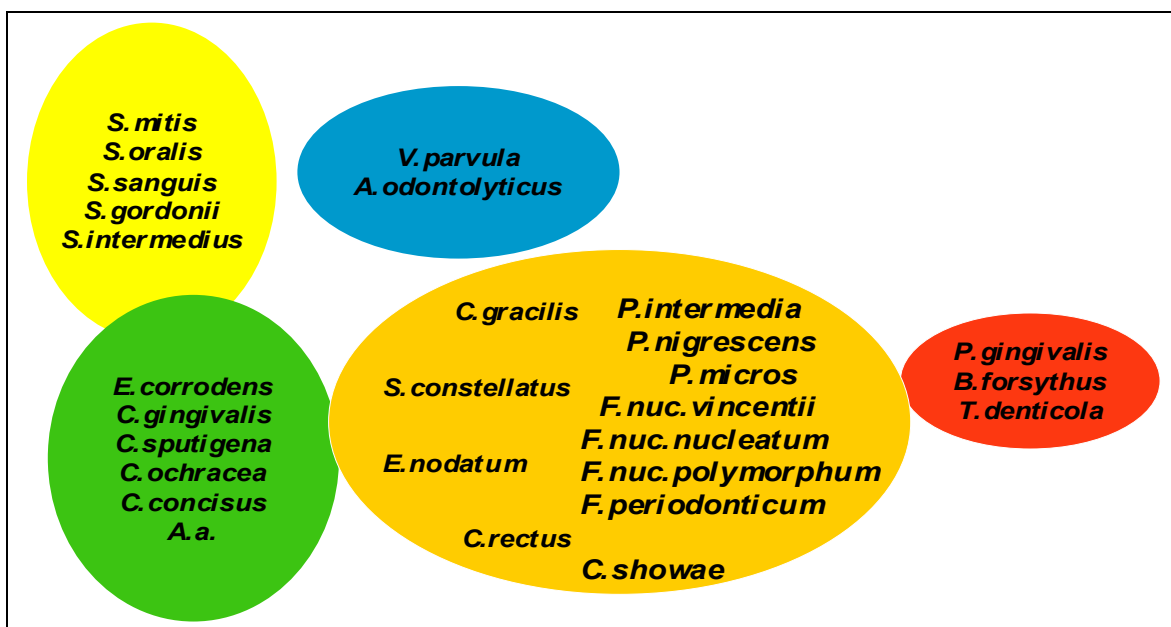


Figura 1 – Composição da placa subgingival segundo Socransky *et al* (1998). Adaptado de Feres & Gonçalves (2001).

Corroborando com esses achados e utilizando a mesma metodologia, Ximénez-Fyvie *et al* (2000) compararam a composição microbiana da placa supra e subgingival de 22 sujeitos periodontalmente saudáveis (média de idade 32±16 anos) e 23 com periodontite do adulto (média de idade 51±14 anos), de um total de 2.358 amostras de placa. A contagem média total de provas de DNA ( $\times 10^5 \pm \text{SEM}$ ) para a presença das bactérias estudadas em placa supragingival foi, para sujeitos saudáveis, 72.1±11 e, com periodontite, 132±17.5 ( $p < 0.01$ ), enquanto na placa subgingival foi, respectivamente, 22.1±6.6 e 100.3±18.4 ( $p < 0.001$ ). Espécies *Actinomyces* foram observadas predominantemente em ambas placas supra e subgingival de sujeitos saudáveis (63.2% vs 47.2%) e com periodontite (48.1% vs 37.8%). Nos pacientes com periodontite, foram detectadas subgingivalmente proporções aumentadas de *P.gingivalis*, *B.forsythus*, e espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Treponema*, sendo que *P.gingivalis*, *B.forsythus* e *T.denticola* foram significativamente mais prevalentes tanto nas placas supragingival quanto subgingival desses pacientes. As principais diferenças entre placas supra e subgingival bem como entre sítios saudáveis e doentes, ficaram por conta das proporções e dos níveis elevados de *Actinomyces*, e espécies dos complexos “laranja” e “vermelho”.

Estudos feitos com base na mesma metodologia e realizados em diferentes populações seriam importantes para caracterizar diferenças na microbiota subgingival entre indivíduos de diferentes áreas geográficas, o que poderia determinar uma abordagem terapêutica adequada para cada região ou grupo étnico, especialmente no que se refere a antibioticoterapia (SANZ *et al*, 2000).

Anteriormente, diferenças na composição da microbiota subgingival e severidade da doença entre grupos étnicos diferentes foram mostradas por Bial *et al* (1987). Estes autores descreveram que pacientes negros portadores de periodontite crônica albergavam *Pg* em maior proporção do que pacientes brancos. Ainda, chineses que vivem nos Estados Unidos têm baixa prevalência de *Aa*, enquanto americanos de origem africana apresentam alta prevalência tanto de *Aa* como de *Pg* (SCHEIKEIN *et al*, 1993; BECK *et al*, 1992; UMEDA *et al*, 1998).

Altos índices de infecção por *Aa*, *Pi* e *Pg* foram observados em adultos do Kênia e Tailândia com periodontite crônica (DAHLEN *et al*, 1989). Do mesmo modo, Slots *et al* (1991) observaram uma prevalência de 50% para *Aa* em pacientes da República Dominicana.

Já Mombelli *et al* (1994) reportaram que esta prevalência era de 63% em uma população de pacientes chineses.

Takamatsu *et al* (1999) verificaram, em Tóquio/Japão, que indivíduos com periodontite eram infectados com *T.forsythensis* (77,9%), *P.gingivalis* (65,4%) e *A.actinomycetemcomitans* (16,4%), cujos níveis decresceram a 35,6%, 22,1% e 8,7%, respectivamente, em um mês após terapia inicial. Também em japoneses, Mayanagi *et al* (2004) detectaram *P.gingivalis* em 70% dos indivíduos com periodontite, estando ausente nos sujeitos periodontalmente saudáveis. Já pacientes coreanos, conforme Choi *et al* (2000), eram colonizados em todos os sítios avaliados, dentre outros periodontopatógenos, principalmente por *Fusobacterium sp.* enquanto *P.gingivalis*, *Treponema sp.* e *T.forsythensis* foram identificados em mais de 96% dos 116 sítios doentes estudados. *P.micros*, *Aa* e *P.intermedia* estavam presentes em 82%, 74% e 71% dos sítios com doença, respectivamente. Em sítios saudáveis, *Fusobacterium sp.* estava presente em alta prevalência (58%), enquanto *Treponema sp.*, *Pg* e *Tf* foram identificados em 22%, 18% e 18% dos sítios saudáveis, respectivamente.

Utilizando os mesmos critérios de seleção da amostra e técnicas microbiológicas para ambos os grupos, Sanz *et al* (2000) compararam a composição da microbiota subgengival em espanhóis e holandeses. Concluíram que o *Aa* foi significativamente mais detectado no grupo holandês (23,3% vs 3,2%), enquanto *Pg* foi mais observada no grupo de indivíduos espanhóis (64,5% vs 36,7%). *T.forsythensis* e a maioria dos microrganismos comensais mostraram prevalência similar, exceto *P.micros* que foi mais encontrado em pacientes holandeses (96,7% vs 74,2%).

Craig *et al* (2001) mostraram diferenças na microbiota subgengival entre grupos étnicos residentes em Nova York. As bactérias *A.actinomycetemcomitans*, *N.mucosa*, *Selenomona noxia* e *Treponema socranskii*, foram identificadas principalmente em um grupo de americanos de origem asiática enquanto que *P. micros* foi detectada principalmente no grupo de americanos de origem africana.

Em norte-americanos, Rudney *et al* (2003) verificaram que 11 (52,3%) de 21 pacientes com periodontite do adulto severa estavam infectados com *P.gingivalis*, a partir do estudo de amostras de *pool* de placas subgengivais de 4 bolsas mais profundas, utilizando PCR

quantitativo. Em nenhum dos indivíduos controles, periodontalmente saudáveis, foi observada a presença desse periodontopatógeno.

Lopez *et al* (2004) em seus estudos com indivíduos chilenos residentes em Santiago, e americanos, todos portadores de periodontite crônica, observaram uma significativa diferença entre as duas populações quanto à infecção periodontal; com exceção do patógeno *P.intermedia*, todas as espécies testadas foram encontradas em 75% dos sítios periodontalmente afetados, incluindo *P.gingivalis*, *T.forsyensis*, *T.denticola*, bem como *F.nucleatum*, *C.rectus*, *P.micros* e *T.socranskii*. Já para os indivíduos que representaram o grupo dos Estados Unidos, foi descrita uma alta prevalência de *Actinomyces*. Estes autores procuraram explicar a alta prevalência de periodontopatógenos na população de chilenos com base em estudos da influência do fator sócio-econômico-cultural no desenvolvimento da DP, já que estes fatores podem limitar o acesso a serviço odontológico especializado bem como restringir o conhecimento sobre métodos efetivos de controle da placa bacteriana.

Na Alemanha, Nonnenmacher *et al* (2005) verificaram que embora as espécies relacionadas a periodontite também fossem encontradas em indivíduos saudáveis, as proporções estavam muito maiores nos doentes. Encontraram correlação positiva entre altos níveis de colonização por *P.gingivalis* e *Micromonas micros* e a presença de bolsas periodontais profundas.

Lotufo *et al* (1994) detectaram *T.forsythensis* e *P.gingivalis* em 53% de indivíduos brasileiros com periodontite, embora Rodrigues *et al* (1999) apenas tenham mostrado uma frequência de 4% de *Pg* nos pacientes brasileiros avaliados em seus estudos, e alta prevalência de *Aa* no grupo controle (sem doença). Segundo Colombo *et al* (2002) a microbiota subgingival de indivíduos brasileiros com periodontite crônica é altamente complexa, incluindo alta proporção de periodontopatógenos comumente encontrados em outras populações, bem como espécies não usuais. *T.forsyensis*, *P.gingivalis* (detectada em cerca de 60% dos sítios doentes), *E.nodatum* e *F. nucleatum ss vincentii*, apresentaram significativa correlação positiva com medidas de PS e perda de inserção. Dentre as espécies não frequentes encontradas na microbiota subgingival de pacientes com periodontite crônica não tratada, encontram-se *A. baumannii*, *Bartonella sp.*, *E.coli* e *E. faecalis*.

Haffajee *et al* (2004), em seus estudos usando técnicas de hibridização de DNA, mostraram diferenças na composição da microbiota subgengival em indivíduos residentes em quatro regiões distintas: Estados Unidos, Suécia, Chile e Brasil. Dentre as espécies com maior variabilidade entre os países destacaram-se *P. gingivalis* e *T. denticola*.

Cortelli *et al* (2005) estudaram a prevalência dos periodontopatógenos *A.actinomycescomitans*, *C.rectus*, *P.gingivalis*, *P.intermedia* e *T.forsythensis*, em 203 brasileiros diagnosticados com periodontite agressiva (n=25) e periodontite crônica (n=178). A prevalência de *P.gingivalis* era dominante nos dois grupos - 68% nos indivíduos com periodontite crônica, similar a estudos em outras populações sulamericanas. O *A.actinomycescomitans*, altamente leucotóxico, era mais prevalente na periodontite agressiva, estando positivamente associado com bolsas profundas (> 6mm) e idade jovem (<29 anos).

Embora os métodos de cultura sejam considerados *gold standard* dentre as técnicas microbiológicas para detecção de periodontopatógenos em amostras do biofilme subgengival, e os únicos capazes de realizar o antibiograma, a reação em cadeia da polimerase (PCR) oferece a grande vantagem de detectar um microrganismo alvo em baixas concentrações, com alta especificidade (SANZ *et al*, 2004). O Quadro 1, sumariza os principais achados sobre infecção por *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com periodontite crônica, utilizando a técnica da PCR, em diversas regiões geográficas.

Determinar a distribuição global dos periodontopatógenos pode ser importante uma vez que os agentes infecciosos freqüentemente têm uma distribuição geográfica limitada. Exemplos notáveis de agentes infecciosos e sua distribuição incluem *Rickettsia rickettsii*, a causa de *Rocky Mountain Spotted Fever* (RIZZO *et al*, 2004), nos Estados Unidos, *Borrelia burgdorferi*, responsável pela Doença de Lyme (STEERE *et al*, 2004), na Europa, e *Plasmodium falciparum*, a causa da malária (BASCO *et al*, 2002), no Brasil. A ocorrência de diferenças na distribuição dos periodontopatógenos em diferentes populações pode resultar em diferentes exposições e riscos para o desenvolvimento da DP; o estudo dessa variação é importante, tanto para dados epidemiológicos como para a sua prevenção e tratamento.

Quadro 1 – Sumário de achados sobre prevalência de Pg em diversas populações.

Origem dos grupos estudados	Autores	Prevalência de Pg
Japão	Takamatsu <i>et al</i> , 1999	65,4%
	Amano <i>et al</i> , 2000	87,1%
	Nozaki <i>et al</i> , 2001	80%
	Takeuchi <i>et al</i> , 2001	95,3%
	Mayanagi <i>et al</i> , 2004	70%
Coréia	Choi <i>et al</i> , 2000	96%
Taiwan	Yang <i>et al</i> , 2004	85,7%
Reino Unido	Darby <i>et al</i> , 2000	54,5%
	Doungudomdacha <i>et al</i> , 2001	93,9%
Espanha	Sanz <i>et al</i> , 2000	64,5%
Holanda	Sanz <i>et al</i> , 2000	36,7%
Chile	Lopez <i>et al</i> , 2004	75%
USA	Ashimoto <i>et al</i> , 1996	70%
	Umeda <i>et al</i> , 1998	
	• Caucasianos	15,4%
	• Afro-americanos	0%
	• Asiáticos	41,2%
	• Hispânicos	42,9%
	Griffen <i>et al</i> , 1999	79%
Ximénez-Fyvie <i>et al</i> , 2000	50%	
Rudney <i>et al</i> , 2003	52%	
Brasil	Colombo <i>et al</i> , 2002	60%
	Avila-Campos & Velásquez-Meléndez, 2002	78%
	Cortelli <i>et al</i> , 2005	68%

## 2.2 – Imunopatogenia da doença periodontal

A doença periodontal tem início pela presença de bactérias predominantemente anaeróbicas gram-negativas, acumuladas sobre a superfície dental, que ativam a resposta imuno-inflamatória, levando à destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar (KORNMAN *et al*, 1997).

A presença do biofilme bacteriano é necessária para o início do desenvolvimento da doença periodontal, porém não é o único fator envolvido na patogênese desta doença. A susceptibilidade do hospedeiro é, da mesma forma, importante (KORNMAN *et al*, 1997; NEWMAN 1997; PAGE *et al*, 1997). Fatores de risco adquiridos e ambientais, tais como

fumo, e traços geneticamente transmitidos modificam o padrão de destruição tecidual, e determinam a susceptibilidade, o início, a progressão e a severidade da doença (PAGE & KORNMAN, 1997). A Figura 2 retrata o modelo de patogênese da DP, aceito neste momento.

Muitos avanços no conhecimento das atividades celulares, moleculares e da genética têm sido alcançados na tentativa de elucidar os caminhos e mecanismos através dos quais as bactérias presentes no biofilme dental iniciam e perpetuam a resposta imuno-inflamatória que destrói o tecido conjuntivo da gengiva e do ligamento periodontal e reabsorve o osso alveolar (PAGE & KORNMAN, 1997).

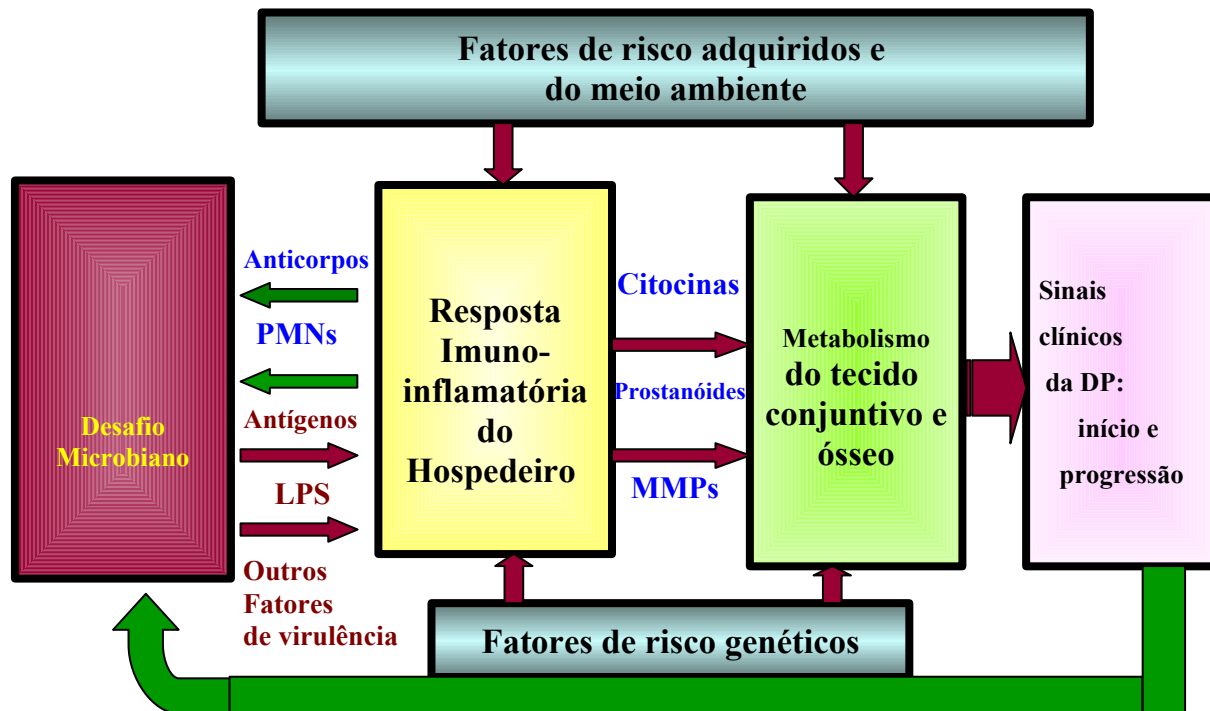


Fig 2 – Modelo de patogênese da DP. Adaptado de PAGE & KORNMAN, Periodontology 2000, p.10, 1997.

A resposta imune pode ser classificada em inata (ou não específica) e adaptativa (ou específica). A resposta inata inclui a resposta inflamatória e não envolve mecanismos específicos do sistema imune. Por outro lado, a resposta adaptativa tende ser mais efetiva e envolve a ativação de linfócitos T e B e a produção de anticorpos. A degradação dos tecidos periodontais parece ser devida, principalmente, aos mecanismos da imunidade inata, notadamente a ação de enzimas lisossomiais de neutrófilos e macrófagos. Entretanto, os mecanismos da imunidade adaptativa, envolvendo a secreção de anticorpos e citocinas, podem parcialmente regular o sistema inato (FIGUEREDO *et al*, 2001).

Os neutrófilos migram em grande número para o sulco ou bolsa periodontal, porém não há diferença significativa entre a quantidade presente em uma gengivite ou periodontite; isto sugere que uma hiperatividade celular, e não o número de neutrófilos, seria um fator importante para a iniciação da destruição dos tecidos do periodonto. Dentre as substâncias que podem pré-ativar a atividade neutrofílica estão as citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (FIGUEREDO *et al*, 2001).

### **2.2.1 Citocinas pró-inflamatórias**

Nos estágios iniciais de inflamação, as citocinas pró-inflamatórias são secretadas por monócitos ativados, macrófagos e outras células, tais como os fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. O macrófago é considerado a célula-chave na progressão da doença periodontal da fase aguda para a fase crônica mediada por constituintes da resposta imune adaptativa.

Os macrófagos dos tecidos locais produzem a IL-8 e proteínas quimioatrativas de monócitos e macrófagos (MCP-1) que determinam o recrutamento de monócitos adicionais (que se diferenciam em novos macrófagos) e linfócitos que, por sua vez, são ativados por macrófagos. O infiltrado na lesão periodontal consiste de linfócitos e macrófagos e, a partir de estudos histológicos de lesões periodontais estabelecidas, verifica-se que o tipo celular predominante da lesão crônica é o linfócito. Células T estão mais presentes na gengivite enquanto células B e plasmócitos predominam na periodontite (SEYMOUR *et al*, 1981; OH *et al*, 2002). Os linfócitos são fontes secretoras de uma variedade de citocinas que têm um papel fundamental na imunorregulação e na perpetuação das ações destrutivas da inflamação



crônica. Entretanto, o perfil de citocinas secretadas é considerado crítico na determinação da progressão da DP, podendo levar a uma resposta imune protetora e estabilização da doença, ou a uma resposta inadequada que determinará sua progressão (TAYLOR *et al*, 2004).

As citocinas são efetivas em baixas concentrações, são produzidas transitoriamente e agem no local onde ocorre sua produção. Elas são ainda auto-regulatórias, capazes de induzir uma ação autócrina ou parácrina e influenciar a atividade metabólica de vários tipos celulares. As citocinas atingem as células-alvo através de ligações com receptores específicos iniciando, assim, a transmissão de sinais intracelulares que resultam em mudanças fenotípicas da célula pela alteração da regulação do gene. Muitas citocinas possuem funções semelhantes, porém não agem isoladamente, tornando complexa a resposta do hospedeiro (TAYLOR *et al*, 2004).

As citocinas são, portanto, mediadores inflamatórios e também podem modular os componentes da matriz extracelular e do tecido ósseo constituintes dos tecidos periodontais (KORNMAN & HART, 1997; KORNMAN *et al*, 1997). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF estimulam vários eventos que ocorrem durante a DP. Em periodontite experimental, o uso de antagonistas destas citocinas tem mostrado uma relação causa-e-efeito entre a atividade de IL-1 e TNF e a extensão de uma frente inflamatória aprofundada no tecido conjuntivo, perda de tecido conjuntivo de inserção, formação de osteoclastos e perda de osso alveolar. Em adição, a perda de fibroblastos que ocorre durante infecção com patógenos periodontais é, em parte, mediada por TNF. Assim, muitos dos danos que ocorrem durante a destruição dos tecidos periodontais podem ser atribuídos à atividade da IL-1 e TNF (GRAVES & COCHRAN, 2003).

### **2.2.1.1 - A interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ )**

A relação entre a interleucina-1 e a DP tem sido reportada em diversos estudos. Esta é produzida nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo gerada por genes diferentes, agrupados no cromossomo 2q13, porém utilizando o mesmo receptor para as duas formas; assim há três tipos de moléculas IL-1: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1 antagonista do receptor (IL-1ra). Estas são codificadas pelos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN, respectivamente (KORNMAN & HART, 1997; KORNMAN *et al*, 1997; FIGUEREDO *et al*, 2001).

A IL-1 $\beta$  é secretada principalmente por macrófagos, mas também pode ser produzida por neutrófilos, sendo considerada a principal citocina encontrada na periodontite. É produzida em resposta à presença de substâncias imuno-estimulatórias, como lipopolissacarídeos (LPS) e produtos da degradação tecidual. A IL-1 $\beta$  pode ativar células endoteliais, regulando a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e selectina-E, o que provoca aumento do fluxo de leucócitos; é um potente estimulador de destruição do tecido conjuntivo e ósseo, induzindo células como fibroblastos e neutrófilos a secretarem metaloproteinases da matriz (MMPs) e prostaglandinas, e ativando osteoclastos, eventos que são críticos para o desenvolvimento da DP e que levam à destruição periodontal, representada pela perda de inserção e reabsorção óssea (FIGUEREDO *et al*, 2001). Níveis elevados de IL-1 $\beta$  nos tecidos periodontais e no fluido gengival crevicular (FGC) têm sido encontrados associados a periodontite (KORNMAN & HART, 1997; GORE *et al*, 1998; FAIZUDDIN *et al*, 2003; TAYLOR *et al*, 2004).

### **2.2.1.2- O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  é um importante mediador nas reações inflamatórias e parece exercer um papel central na patogênese de doenças inflamatórias crônicas severas. O TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por monócitos e macrófagos, possui ação sinérgica com a IL-1, embora o TNF- $\alpha$  seja menos potente (TAYLOR *et al*, 2004). Parece estar associado à exacerbação da resposta do hospedeiro, exercendo outros efeitos sobre a fisiologia dos tecidos, incluindo a reabsorção óssea (KINANE *et al*, 1999). Diferenças na média de produção do TNF- $\alpha$  têm sido mostradas e tem sido visto existir uma agregação familiar para produzir altos ou baixos níveis da citocina (POCIOT *et al*, 1993). A síntese de TNF- $\alpha$  pode ser influenciada pela presença de certos polimorfismos genéticos (WILSON & di GIOVINE, 1995) e resultados conflitantes têm sido assinalados a propósito da associação do polimorfismo TNFA<sup>-308</sup> e periodontite (KORNMAN *et al*, 1997; GALBRAITH *et al*, 1998, 1999; CRAANDIJK *et al*, 2002).

### **2.2.1.3 - A interleucina-8 (IL-8)**

A IL-8 é uma citocina que possui ação quimiotática para neutrófilos, e por isto chamada de quimiocina, mas não para monócitos. É também considerada um mediador inflamatório ativador de neutrófilos. Alguns estudos sugerem que não há diferenças significativas entre os

níveis de IL-8 em sítios com gengivite e periodontite (FIGUEREDO *et al*, 2001; TAYLOR *et al*, 2004).

#### **2.2.1.4 - O fator transformador do crescimento-beta (TGF $\beta$ )**

Os fatores transformadores do crescimento (TGF), por sua vez, também apresentam função importante na patogênese das doenças periodontais, uma vez que sendo citocinas multifuncionais, exercendo tanto atividades pró-inflamatórias como imunossupressoras, exercem importante papel na regulação do processo inflamatório (STEINSVOLL *et al*, 1999). Eles compõem uma família de polipeptídeos homólogos que incluem três isoformas principais: TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e TGF- $\beta_3$ , sendo que o TGF- $\beta_1$  é o mais amplamente distribuído no organismo (SYRRIS *et al*, 1998). Este fator, produzido por uma variedade de tipos celulares, como plaquetas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos, apresenta uma potente atividade supressora tanto da imunidade celular como humoral, favorecendo a expressão de genes do colágeno e deposição da matriz extracelular, culminando com o processo de reparo e fibrose tecidual (KIM *et al*, 1989; STEINSVOLL *et al*, 1999; DE SOUZA *et al*, 2003). Há, pois, uma dualidade de funções que o TGF- $\beta_1$  apresenta em relação à resposta imuno-inflamatória de defesa do hospedeiro. Como um regulador bifuncional dos eventos inflamatórios, esta citocina pleiotrópica pode, ao mesmo tempo, promover ou suprimir a inflamação, dependendo do contexto biomolecular em que é sintetizada ou secretada. Assim, ela é capaz de favorecer o reparo e cicatrização dos tecidos periodontais, por possuir atividades imunossupressoras tanto da resposta imuno-celular quanto da humoral, contribuindo para a homeostase tecidual, da mesma forma em que pode exacerbar o processo inflamatório, na medida em que representa um instrumento para o recrutamento, aderência e atividade enzimática necessária para o extravasamento vascular de leucócitos, contribuindo para seu acúmulo e diferenciação nos sítios inflamatórios. A maior expressão do TGF- $\beta_1$  em lesões de pacientes com periodontite crônica parece contrabalançar a resposta inflamatória gengival destrutiva em fases agudas da doença (STEINSVOLL *et al*, 1999). Já em casos de doença periodontal mais severa as condições pró-inflamatórias parecem sobrepor-se às condições reparadoras, de modo que os níveis desta citocina diminuam. Isto foi evidenciado por Skaleric *et al* (1997) que mostraram que, apesar dos níveis de TGF- $\beta_1$  terem sido elevados na doença periodontal moderada, estes declinaram nas amostras de fluido obtido de bolsas

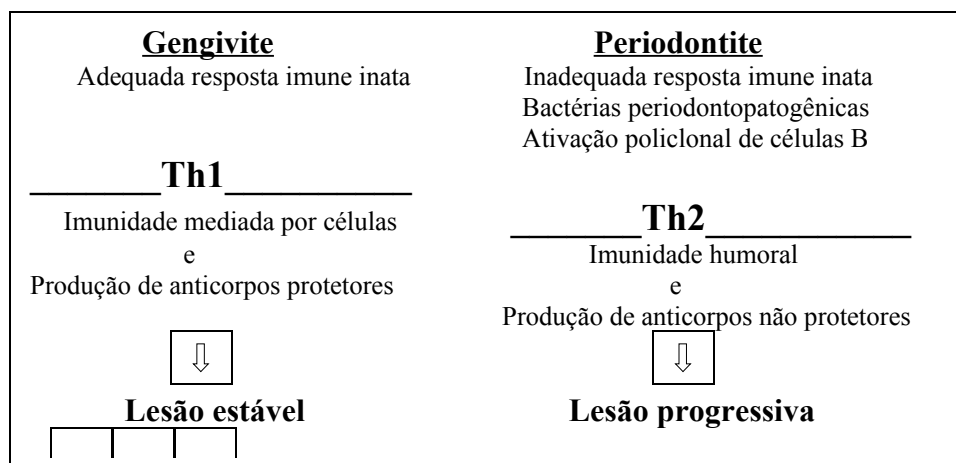
com uma periodontite experimental mais avançada. A explicação para este declínio está no fato de que à medida que os neutrófilos, monócitos e linfócitos estão submetidos à ativação por esta citocina em resposta a um estímulo inflamatório, o número de receptores é alterado e a sensibilidade à estimulação do TGF- $\beta_1$  é revertida (WAHL *et al*, 1993; SKALERIC *et al*, 1997). Ao mesmo tempo, anticorpos contra esta citocina foram capazes de inibir uma doença inflamatória crônica destrutiva, a artrite, em um modelo animal experimental. Verifica-se então que, tanto uma maior como uma menor expressão do TGF- $\beta_1$  pode influenciar na progressão da doença periodontal crônica, em suas várias gradações de atividade da doença (TONETTI & MOMBELLI, 1999).

### **2.2.2 Citocinas secretadas por células Th1 e Th2**

Muitas pesquisas têm sido direcionadas para os subtipos de linfócitos T que são distinguidos de acordo com o perfil das citocinas secretadas. Tanto células Th1 quanto Th2 podem ser encontradas na inflamação gengival. O dogma surgido afirma que o papel das citocinas secretadas por células Th1 e Th2 está relacionado à função exercida por estas. Assim, as citocinas tipo 1 (IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- $\gamma$ ) mediarão respostas do tipo Th1 e ativação da resposta imune mediada por células. As citocinas tipo 2 (IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) mediarão respostas do tipo Th2 e ativação da resposta imune humoral, mediada por anticorpos (TAYLOR *et al*, 2004). Alguns estudos relacionam a resposta Th1 à presença da doença periodontal estável, enquanto que as respostas Th2 parecem estar relacionadas à doença progressiva (SCAREL-CAMINAGA *et al*, 2002). Dão suporte a essa hipótese estudos que mostram diminuição de citocinas Th1 no FGC (PILON *et al*, 1991), em células mononucleares gengivais de sítios com DP (FUJIHASHI *et al*, 1991), bem como em células mononucleares do sangue periférico de pacientes periodontais estimuladas com mitógenos (SIGUSCH *et al*, 1998) e com *P.gingivalis* e *F.nucleatum* (GEMMELL & SEYMOUR, 1994). Em concordância, aumento das respostas Th2 na periodontite foi reportado em estudos utilizando sangue periférico (YAMAZAKI *et al*, 1994; AOYAGI *et al*, 1995), tecidos gengivais (LAPPIN *et al*, 2001; TOKORO *et al*, 1997; YAMAZAKI *et al*, 1994), células mononucleares de extratos gengivais (MANHART *et al*, 1994) e FGC (REINHARDT *et al*, 1989). Entretanto, outros estudos apresentam resultados consistentes com a predominância de células tipo Th1 ou respostas Th2 reduzidas em tecidos doentes (EBERSOLE & TAUBMAN,

1994; SALVI *et al*, 1998; TAKEICHI *et al*, 2000). Estudos mais recentes sugerem o envolvimento de ambos tipos celulares, Th1 e Th2, na DP. Foi mostrada a presença de RNA mensageiro (mRNA) de citocinas Th1 e Th2 em células extraídas de lesões periodontais (FUJIHASHI *et al*, 1994; PRABHU *et al*, 1996).

Gemmell & Seymour (2004) propuseram, baseados na regulação das respostas Th1 e Th2, o seguinte modelo quanto ao desenvolvimento de lesão periodontal estável ou progressiva:



É reconhecido que células plasmáticas tornam-se dominantes na periodontite, quando a perda do osso alveolar e do ligamento periodontal é observada, enquanto as células T predominam na gengivite precoce e a lesão assemelha-se à da hipersensibilidade tipo IV (tardia). Os fatores que causam a progressão da gengivite para periodontite ainda precisam ser bem esclarecidos. Se as reações celulares são reconhecidas como benéficas na gengivite e destrutivas na periodontite, respectivamente, a conversão de uma resposta de células T para células B pode ser mais destrutiva. Baseada nesta noção, a resposta mediada por células Th1 pode ser protetora e a ativação de células B pode ser destrutiva (SEYMOUR *et al*, 1993). Vários fatores podem determinar o desenvolvimento de respostas Th1 ou Th2. As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 induzem a expansão Th1 e IL-4 é requerida para a ativação da resposta Th2. A IL-12 é produzida pelas células apresentadoras de antígenos, incluindo macrófagos e células dendríticas, enquanto IL-4 é produzida por células Th2 e outras. O aspecto contraditório quanto a estas respostas fica por conta do fenótipo de produção de citocinas que possuem as diversas células, tais como os macrófagos e linfócitos B. As citocinas inflamatórias como a IL-1 ou IL-6 podem ser consideradas como prejudiciais. Como mais do que um tipo de células

produzem estas citocinas, é difícil determinar qual deles está ativamente produzindo os fatores inflamatórios. Por exemplo, ambos macrófagos e células B produzem IL-1. Se a produção de IL-1 por macrófagos for mais relevante para a destruição periodontal, a ativação de macrófago por células Th1 pode ser prejudicial, e a sua regulação por IL-4 pode ser benéfica. Entretanto, se células B forem a principal fonte de IL-1, sua ativação por células Th2 pode ser prejudicial (SEYMOUR *et al*, 1993).

#### **2.2.2.1 - A interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-12 (IL-12)**

A IL-2 está relacionada à ativação de linfócitos-B e estimula a proliferação de macrófagos e de linfócitos-T, que estão envolvidos na resposta mediada por células. Estudos sugerem que esta interleucina esteja associada ao aumento da atividade dos osteoclastos na reabsorção óssea (SCAREL-CAMINAGA *et al*, 2002).

A secreção de IFN- $\gamma$  é um aspecto chave de respostas Th1, servindo para promover uma resposta mediada por células dirigida para atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos. Por sua vez, IL-12 estimula o desenvolvimento de células T em um fenótipo Th1. Existe uma analogia com hipersensibilidade do tipo IV (tardia), principalmente associada com infecções crônicas, nas quais uma patologia dominada por células T e macrófagos leva a uma lesão contida. Em teoria, a secreção de IFN- $\gamma$  por células T e a presença de IL-12 poderiam ser aspectos chave de uma lesão periodontal estável (TAYLOR *et al*, 2004).

Contrariamente, alguns autores assinalam que elevados níveis de IFN- $\gamma$  no FGC provê um estímulo adicional para a sobre-regulação de respostas monocíticas ao LPS de bactérias periodontopáticas. Isto pode levar a aumento da secreção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas ligados à reabsorção óssea como PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas que estimulam a reabsorção óssea cumprem significativo papel na patogênese da DP. Ademais, foi reportado um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  no FGC em grupos de dentição terminal com ambas periodontite do adulto e periodontite de início precoce (SALVI *et al*, 1998).

#### **2.2.2.2 - A interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10)**

A IL-4 possui um papel fundamental na ativação de linfócitos T subtipo Th2, ativando células B e aumentando a resposta imune mediada por anticorpos. A célula B ativada produz,

de forma excessiva e crônica, altas concentrações de IL-1, levando à destruição tecidual. Assim, uma resposta Th2 pode ser determinante de lesão destrutiva e progressiva (TAYLOR *et al*, 2004).

A IL-10 foi descrita primariamente como um fator inibidor de síntese de citocina (CSIF) secretada por células murinas Th2 e capaz de inibir o perfil de citocinas de células Th1, particularmente IFN- $\gamma$  (FIORENTINO *et al*, 1989); esta citocina está relacionada à resposta imune humoral - mediada por anticorpos. É sintetizada por monócitos ativados, linfócitos Th2 e células B, em resposta a estímulo inflamatório. Correntemente, existe um grande interesse nas propriedades regulatórias da IL-10 na resposta imune. Assim, a IL-10 também possui a capacidade de modular a ação de outras citocinas, reduzindo a produção de IL-1 (TAYLOR *et al*, 2004) e de IL-6 (KINANE *et al*, 1999). Regula ainda a ação do TNF- $\alpha$ , e uma deficiência nos níveis de IL-10 pode estar associada à susceptibilidade à doença periodontal (KINANE *et al*, 1999; GONZALES *et al*, 2002). Tem sido apontada na regulação e controle do balanço entre resposta inata inflamatória e adquirida humoral. Esta interleucina pode estar relacionada com a prevenção da resposta inflamatória excessiva e danosa ao periodonto (KINANE *et al*, 1999). Neste aspecto, estudos têm demonstrado uma alta expressão de IL-10 no FGC em sítios saudáveis e uma baixa expressão desta citocina em sítios com periodontite (YAMAZAKI *et al*, 2001; GOUTOUDI *et al*, 2004). Também, notou-se um aumento significativo na quantidade de IL-10, bem como diminuição do nível de IL-1 $\beta$ , no FGC seguinte à terapia periodontal (GOUTOUDI *et al*, 2004; CUTLER *et al*, 2000).

Visando mostrar o papel protetor da IL-10 em relação à perda óssea alveolar (POA), Sasaki *et al* (2004) testaram a hipótese de que IL-10 endógena é um potente supressor desta perda, *in vivo*, induzida por *P.gingivalis* (*Pg*). Camundongos “IL-10 knockout” (-/-) e tipo-selvagem foram inoculados intra-oralmente com *Pg*, servindo como controles animais não infectados. POA, níveis gengivais de citocinas, e expressão do gene em tecido gengival foram avaliados usando análise morfométrica, ELISA, e RT-PCR, respectivamente. Os animais “IL-10 knockout” (-/-) infectados exibiram POA severa comparados com os não infectados “IL-10 knockout” (-/-) e com os camundongos tipo-selvagem, durante 42 dias. Embora IL-1 $\beta$  estivesse aumentada marginalmente, o seu bloqueio com antissoro neutralizante falhou em reduzir a POA em animais “IL-10 knockout” (-/-), indicando a operação de um mecanismo

independente de IL-1. As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 e PGE<sub>2</sub> encontravam-se levemente sobre-reguladas nos animais infectados “IL-10 knockout” (-/-). Concluíram, afirmando que camundongos “IL-10 knockout” (-/-) são altamente susceptíveis à perda óssea induzida pelo patógeno *P.gingivalis*, a qual é mediada via um processo independente de IL-1.

### **2.2.2.3 - A interleucina-6 (IL-6)**

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com ampla gama de efeitos imunes celular e humoral, relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual. Não é expressa constitutivamente, mas altamente induzível, e produzida em resposta a vários estímulos tais como IL-1, TNF- $\alpha$ , produtos bacterianos como endotoxinas e infecção viral. Funciona como fator ativador e quimiotático para neutrófilos. Assim como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , age aumentando a reabsorção óssea, como mediador autócrino ou parácrino que estimula o desenvolvimento de osteoclastos de células precursoras. A IL-6 tem sido, adicionalmente, implicada na regulação dos efeitos pró-inflamatórios dessas citocinas (PAPANICOLAOU *et al*, 1998). É, também, uma citocina importante na regulação da resposta mediada pelas células B (TAYLOR *et al*, 2004).

## **2.3 - A reabsorção óssea na doença periodontal**

A Figura 3 retrata a reabsorção óssea mediada por células imunes infiltradas nos tecidos periodontais, segundo Taubman *et al* (2005). Macrófagos estimulados por LPS de periodontopatógenos produzem entre outras citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que, com outros fatores, induzem a expressão de RANKL (receptor ativador do fator nuclear ligante  $\kappa$ B) nos osteoblastos. RANKL ligando-se a RANK expresso nos progenitores hematopoiéticos dos osteoclastos, ativam um sinal de transdução em cascata que leva à osteoclastogênese na presença do fator de sobrevivência MCSF. Osteoprotegerina (OPG) produzida por osteoblastos é um engodo de receptor para RANKL, que inibe osteoclastogênese e ativação de osteoclastos por ligação a RANKL. Semelhantemente, células T ativadas podem afetar a fisiologia óssea por produzirem citocinas tais como TNF- $\alpha$ , IL-11 e IL-17 que leva à expressão de RANKL nos osteoblastos (células T provocando uma estimulação indireta da reabsorção óssea). Macrófagos ativados (i.e., macrófago MHC classe II + antígeno) ativam células T que expressam e produzem RANKL que diretamente induzem a formação e ativação



de osteoclastos. Recentemente, células B têm também mostrado diretamente expressar RANKL ligado à célula e nas formas solúveis (CHOI *et al*, 2001), indicando a importância de ambos tipos de células imunes na gênese da osteoclasia. Todos os tipos de RANKL podem combinar-se com RANK para conduzir à osteoclastogênese. OPG (engodo de RANKL) bloqueia todas as vias (direta e indireta de células T ou B [osteoblasto/célula estromal]). Estas reações ocorrem quando infiltrados de células imunologicamente ativadas penetram nos tecidos periodontais e produzem osteoclasia.

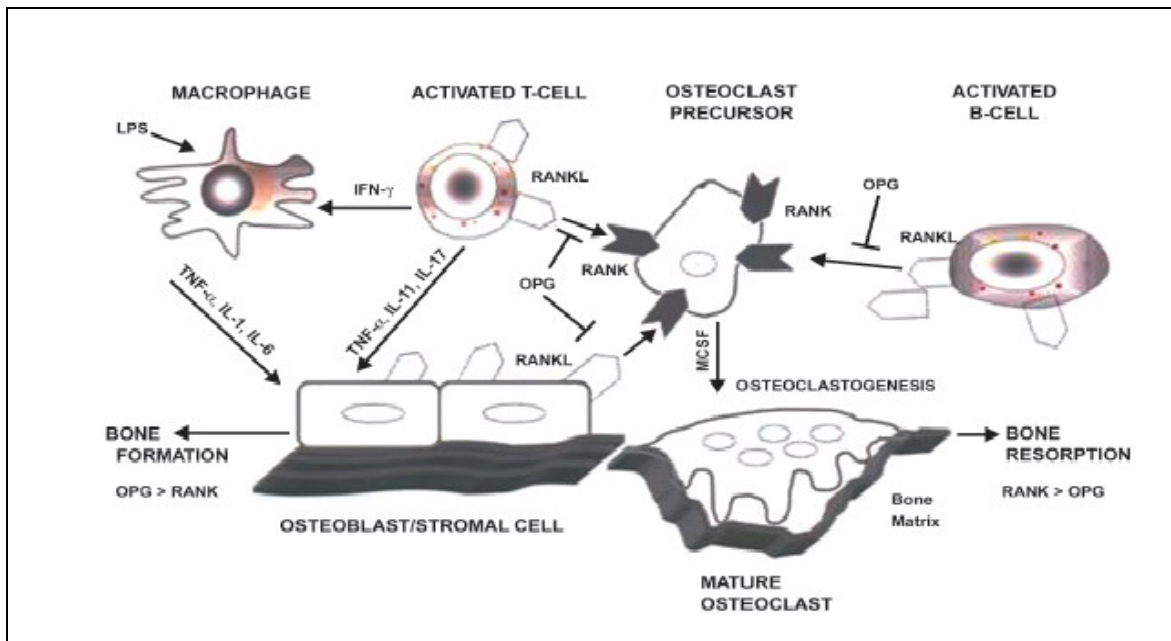


Figura 3 – Modelo de osteoclastogênese segundo Taubman *et al*, 2005.

Valverde *et al* (2005) encontraram uma correlação negativa entre os níveis de mRNA de RANKL e OPG em tecidos gengivais e periodontais de pacientes com periodontite crônica e indivíduos periodontalmente saudáveis, evidenciando os pressupostos acima. Ademais, a porcentagem de células T positivas para RANKL (50 a 60%) nas lesões periodontais foi substancialmente menor do que a porcentagem de células B positivas para RANKL (>90%); entretanto, isto não se torna um indicativo claro de que células B podem contribuir mais extensivamente para a reabsorção óssea do que células T, nas lesões periodontais (MATSUYAMA *et al*, 2005).

## 2.4 - A produção de citocinas e periodontite crônica

Vários trabalhos têm assinalado uma concentração elevada de IL-1 $\beta$  nos tecidos gengivais inflamados. Um dos métodos mais utilizados tem sido a sua detecção, pela técnica ELISA, no fluido gengival crevicular (FGC) de sítios doentes comparados com sadios. Preiss & Meyle (1994) desenvolveram um método de coleta do FGC, utilizando cones de papel de filtro. Testaram a concentração em pacientes com periodontite (N=19, idade média: 29,3 anos) comparados com controles periodontalmente sadios (N=14, idade média: 22,8 anos). Este grupo apresentou concentrações médias entre 22.8 ng/mL e 150 ng/mL, enquanto que no grupo periodontal as médias estiveram significativamente mais elevadas (entre 85.8 ng/mL e 882.2 ng/mL). Não houve diferença relacionada ao gênero nos indivíduos investigados.

Anteriormente, Stashenko *et al* (1991) avaliaram, em estudo longitudinal, a concentração de IL-1 $\beta$ , usando a técnica ELISA, em tecidos biopsiados obtidos de 12 pacientes com periodontite destrutiva do adulto, caracterizando sítios: 1) doentes, ativos; 2) doentes, inativos; 3) sadios. IL-1 $\beta$  estava presente em níveis de 0-82 ng/mL. Sítios ativos doentes tinham níveis significativamente ( $p < 0.05$ ) mais elevados do que os inativos e sadios. Atividade da doença ocorria mais frequentemente em sítios com níveis maiores do que 25 ng/mL ( $p < 0.01$ ). Estes dados indicam que IL-1 $\beta$  é útil na detecção de sítios com atividade, sugerindo ser um importante mediador da perda de inserção na periodontite humana.

O Quadro 2 mostra os principais achados de outros trabalhos sobre a variação intersujeitos na produção de citocinas associada à periodontite crônica.

Quadro 2 - Sumário dos principais achados de trabalhos sobre variação intersujeitos na produção de citocinas, e periodontite crônica (PC)

Autor / Ano Desenho do estudo	Citocina reportada	Sujeitos	Principais achados
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			
Figueredo <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	IL-1 $\beta$ , no FGC Técnica: ELISA	13 pac c/gengivite (GG); 18 pacientes com periodontite: bolsas rasas (GP) e profundas (PP)	Foram encontrados níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$ em pacientes com periodontite, independentemente da severidade da doença no sítio amostrado, sugerindo que esses níveis são singulares a cada paciente

Mogi <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ e outros fatores, no FGC Técnica: ELISA	-36 pac com PC leve (n=17), e PC severa (n=19) -35 controles sadios	Níveis de IL-1 $\beta$ significativamente mais altos em pac com DP severa do que nos controles (p<0.05); igualmente, concentração de IL-6 era 3 vezes mais alta, o mesmo não ocorrendo com IFN- $\gamma$ .
---	---	--	--

continua...

## Quadro 2 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Citocina reportada	Sujeitos	Principais achados
Rawlinson <i>et al</i> , 2000 Caso-controle	IL-1 $\beta$ e receptor antagonista IL-1 (IL-1ra), no FGC Técnica: ELISA	-40 amostras de 10 pac. c/ periodontite moderada a severa, e de 10 controles sadios. Exame de sítios com e sem DP, dentes ant. superiores	A concentração média para IL-1 $\beta$ foi 0.11 pg/ $\mu$ l para sítios periodontais sangrantes, 0.04 pg/ $\mu$ l para sítios periodontais não-sangrantes, e 0.01 pg/ $\mu$ l para sítios sadios (p<0.001). Os resultados sugerem forte relação entre a severidade da periodontite do adulto e o aumento dos níveis no FGC de IL-1 $\beta$ e níveis decrescentes de IL-1ra.
Rawlinson <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	IL-1 $\beta$ e receptor antagonista IL-1 (IL-1ra), no FGC Técnica: ELISA	-39 amostras de 13 pac. fumantes pesados; 30 amostras de 10 pac. não-fumantes, com PC moderada a severa	Níveis significantes de IL-1 $\beta$ e IL-1ra foram encontrados nos fumantes, comparando-se sítios sadios versus sangrantes profundos e não-sangrantes profundos. Diferenças nas concentrações de IL-1 $\beta$ no FGC em fumantes versus não-fumantes foram significantes, somente, para os sítios sangrantes profundos.
Gorska <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 em tecido gengival inflamado e amostras séricas Técnica:ELISA	-25 pac c/ periodontite crônica severa -25 indivíduos sadios periodontalmente	As concentrações daquelas citocinas, em média, encontravam-se significativamente elevadas em amostras séricas e de tec.gengival nos pac.periodontais do que nos controles. A alta variabilidade das concentrações de citocinas e a baixa frequência de sua detecção em amostras séricas de pac.periodontais faz disto elemento pouco útil para determinação da doença e/ou de sua severidade. Em contraste, os altos níveis absolutos de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ e suas altas proporções com IL-4 e IL-10 nos tec.inflamados, estavam proximamente associados com a severidade da DP.
<b>Outras citocinas</b>			
Yamazaki <i>et al</i> , 1994 Caso-controle	-presença de cél IL-4+ e IL-6+ em tec. periodontais biopsiados, usando imunohistoquímica e hibridização <i>in situ</i>	19 pac com periodontite do adulto e 5 espécimes de tecidos com gengivite sem perda de inserção, como grupo controle	Os percentuais de células produtoras de IL-4 eram significativamente elevados nos tecidos com lesões periodontais do que naqueles com gengivite; igualmente estavam elevados os percentuais das células produtoras de IL-6 nas lesões periodontais, embora não estatisticamente significativos. Esses resultados sugerem que células do tipo Th2 acumulam-se predominantemente nos sítios com lesões periodontais.
Kabashima <i>et al</i> , 1996 Caso-controle	IL-4 e IL-1ra, no FGC, por ELISA, e biópsia de tec.gengival com imunohistoquímica	8 pac c/periodontite do adulto generalizada, e amostras de voluntários sadios	Foram detectados níveis de IL-1ra e IL-4 no FGC de sítios doentes, e não de sítios sadios. Células CD68 produtoras de IL-1ra foram identificadas como monócitos/macrófagos; para IL-4, foram identificadas cel Thelper CD4. Esses resultados sugerem ser IL-4 um dos mediadores que regulam o grau de inflamação nos tecidos periodontais.
Salvi <i>et al</i> , 1998 Caso-controle	PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-6, no FGC, de monócitos séricos estimulados, e de tec.gengival	-2 grupos com dentição terminal (DT): 8 pac c/ periodontite crônica (PC-DT) e 8 com periodontite agressiva (PA-DT); 21 pac c/PC	No FGC, detectados 3 níveis de titulações: alto, com PGE <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ e IL-2; médio, com TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ , e baixo, com IL-4 e IL-6. Em ambos grupos DT, dominaram níveis de mediadores monócitos, PGE <sub>2</sub> e IL-1 $\beta$ , e Th1, IL-2 e INF- $\gamma$ , sobre mediadores Th2, IL-4 e IL-6. Monócitos LPS-estimulados dos pac produziram mais IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub> e TNF- $\alpha$ , do que dos controles. Células mononucleares gengivais

		moderada	expressaram mRNA de citocinas Th1 e Th2, com baixos níveis de IL-4 e IL-12. Embora no FGC houvesse predomínio de níveis de citocinas Th1 sobre Th2, ativação de monócitos foi a principal origem dos mediadores pró-inflamatórios.
--	--	----------	--

continua...

## Quadro 2 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Citocina reportada	Sujeitos	Principais achados
Boström <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	Influência do fumo sobre níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ no FGC	108 pac com formas moderada a severa de DP: 45 fumantes, 28 ex-fumantes, 35 não-fumantes	Os níveis médios para IL-6 e TNF $\alpha$ foram, respectivamente: em fumantes – 5.0 pg/ml e 61.0 pg/ml; em ex-fumantes – 13.0 pg/ml e 51.0 pg/ml; e em não-fumantes – 10.0 pg/ml e 12.0 pg/ml. As diferenças entre os grupos em relação a IL-6 não foram significantes, sugerindo que os níveis de IL-6 não eram influenciados pelo fumo. Em contraste, os níveis de TNF- $\alpha$ estavam significativamente aumentados em fumantes quando comparados a não-fumantes. Esses resultados, em pac com moderada a severa DP, podem indicar diferentes funções mediadoras da IL-6 e TNF- $\alpha$ em resposta ao fumo.
Steinsvoll, Halstensen & Schenck, 1999 Caso-controle	TGF- $\beta_1$ + em células gengivais	11 pac c/ periodontite crônica e 7 indiv c/ gengiva saudável	Tec.inflamados continham 100 vezes mais células TGF- $\beta_1$ + (compreendendo: macrófagos 21-29%, células T 2-3%, células B 3-9%, neutrófilos 34-35%, e mastócitos 7-10%) do que na gengiva saudável. Nos pac.periodontais a densidade de células TGF- $\beta_1$ + estava fortemente elevada no tec.conjuntivo adjacente ao epitélio da bolsa, na lâmina própria e adjacente ao epitélio oral. Embora TGF- $\beta_1$ seja uma citocina imunossupressiva que estimula a cicatrização, sua sobre-regulação na gengiva inflamada pode contrabalançar para respostas inflamatórias gengivais destrutivas nos pacientes com periodontite.
Kobayashi <i>et al</i> , 2000 Caso-controle	IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-12, produzidas por CMSP (células mononucleares do sangue periférico)	CMSP estimuladas c/ periodontopatógenos de pac com PC e de sujeitos sadios (SS)	CMSP de pac com PC e de sujeitos sadios produziram IFN- $\gamma$ e IL-12, enquanto IL-4 foi raramente observada. IFN- $\gamma$ foi produzida por cels T nas CMSP, variando entre os indiv, estando correlacionada c/quant.de IL-12 produzida em um particular indiv. Produção de IFN- $\gamma$ não estava relacionada com condição periodontal. Sugere-se que polarização de resposta Th1 contra periodontopatógeno é dependente da produção de IL-12 por monócitos que, por sua vez, estimula produção de IFN- $\gamma$ . Diversidades individuais na produção de IFN- $\gamma$ podem não estar relacionadas diretamente com a severidade da periodontite
Alpagot, Font & Lee, 2003 Longitudinal	IFN- $\gamma$ , no FGC Períodos: <i>baseline</i> , e 6 meses após Técnica:ELISA	Status periodontal de 33 pac HIV+, durante período de 6 meses	Sítio com DP progressiva foi definido como aquele $\geq 2$ mm de <b>PI</b> . Dos 264 sítios examinados, 25 apresentaram-se em progressão durante o período de exame. Altos níveis de IFN- $\gamma$ foram encontrados, significativamente, nos sítios em progressão do que naqueles estáveis. Níveis de IFN- $\gamma$ estavam altamente ( $p=0.001$ ) correlacionados com os parâmetros clínicos nos exames iniciais e finais. Estes dados podem indicar que sítios com altos níveis de IFN- $\gamma$ no FGC tinham alto risco para progressão da periodontite em pac HIV+
Cezário & Figueredo, 2004	TGF- $\beta$ , no FGC Técnica:ELISA	17 pac com PC 19 pac-controles s/ <b>PI</b> →Foram estudados	A quantidade de TGF- $\beta$ foi significativamente maior nos sítios PP (8,2 ng) do que nos GP (2,2 ng). Não houve diferenças significantes entre sítios GP e GG, e PP e GG.

Caso-controle		sítios c/ PI (PP), sem PI (GP), e apenas com gengivite (GG).	Conclui-se que a diferença nos níveis entre os sítios PP e GP sugere ter essa citocina papel significativo na destruição tecidual em portadores de periodontite crônica
---------------	--	--	---

continua...

## Quadro 2 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Citocina reportada	Sujeitos	Principais achados
Erdemir <i>et al</i> , 2004 Longitudinal	IL-6 e TNF- $\alpha$ , no FGC Técnica:ELISA	-41 pac (22 fumantes e 19 não-fumantes) com PC, comparando com parâmetros clínicos, avaliados 1, 3, e 6 meses após trat.periodontal não- cirúrgico	Embora as diferenças de IL-6 e TNF- $\alpha$ entre os dois grupos não tenham sido significantes, a quantidade total de TNF- $\alpha$ no FGC decresceu do exame inicial aos 6 meses nos fumantes. Não houve correlação significativa entre os quantitativos médios de IL-6 e TNF- $\alpha$ e os parâmetros clínicos em ambos períodos de avaliação nos fumantes. Assim, assinalaram que o fumo aumenta o IP no decorrer do tempo, e não influencia os conteúdos de IL-6 e TNF- $\alpha$ no FGC de pacientes periodontais.
Zong <i>et al</i> , 2005 Longitudinal	Níveis séricos circulantes de IFN- $\gamma$ e IL-4, antes e após 4 e 6 meses da terapia inicial Técnica:ELISA	15 pac. c/ periodontite crônica, e 15 indivíduos sadios controles,	-Diferença significativa foi observada nos níveis séricos de IFN- $\gamma$ e IL-4 entre os pac.periodontais e os controles. Após terapia, os níveis de IFN- $\gamma$ decresceram significativamente, o mesmo não acontecendo com os de IL-4. Concluíram, afirmando que os níveis séricos de IFN- $\gamma$ e IL-4 estavam associados com PC e que o controle da infecção gengival pode reduzir a concentração de IFN- $\gamma$ mas, não, de IL-4.

Além dos trabalhos iniciais de Stashenko *et al* (1991) e de Preiss & Meyle (1994), o Quadro 2 mostra vários outros que apresentam uma associação positiva entre níveis elevados de IL-1 $\beta$  em portadores de periodontite crônica comparados com indivíduos periodontalmente saudáveis (SALVI *et al*, 1998; FIGUEREDO *et al*, 1999; MOGI *et al*, 1999; RAWLINSON *et al*, 2000; RAWLINSON *et al*, 2003; GORSKA *et al*, 2003) sugerindo, ademais, ser essa citocina um importante mediador da perda de inserção na periodontite humana. Igualmente foram encontrados níveis elevados de TNF- $\alpha$  bem como de IL-6 em pacientes periodontais (YAMAZAKI *et al*, 1994; BOSTRÖM *et al*, 1999; GORSKA *et al*, 2003), mas sem influência do fumo (ERDEMIR *et al*, 2004). Níveis altos de TGF- $\beta$  foram associados à periodontite crônica (STEINSVOLL, HALSTENSEN & SCHENCK, 1999; CEZÁRIO & FIGUEREDO, 2004).

Berglundh *et al* (2002) estudaram, por imunohistoquímica, o perfil de citocinas produzido por células T auxiliares, em tecido gengival de lesões periodontais, de 22 pacientes adultos com periodontite crônica avançada generalizada. Foi similar o número de células expressando

um perfil de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  + IL-2) e Th2 (IL-4 + IL-6), sugerindo que as lesões periodontais são reguladas por uma função combinada Th1 e Th2. Anteriormente, Yamazaki *et al* (1994) tinham observado percentuais mais elevados de células produtoras de IL-4 e IL-6 nos tecidos com lesões periodontais do que naqueles com gengivite, sugerindo que células do tipo Th2 acumulam-se predominantemente nos sítios com lesões periodontais. Em seguida, Kabashima *et al* (1996) sugeriram ser IL-4, produzida por células Th2 CD4, um dos mediadores que regulam o grau de inflamação nos tecidos periodontais; enquanto Salvi *et al* (1998) mostraram que células mononucleares gengivais expressaram mRNA de citocinas Th1 e Th2, com baixos níveis de IL-4 e IL-12. Já Kobayashi *et al* (2000) sugeriram que polarização de resposta Th1 contra periodontopatógeno é dependente da produção de IL-12 por monócitos que, por sua vez, estimula a produção de IFN- $\gamma$ , e que diversidades individuais na produção de IFN- $\gamma$  podem não estar relacionadas diretamente com a severidade da periodontite. Enquanto Alpagot, Font & Lee (2003) indicaram que sítios com altos níveis de IFN- $\gamma$  no FGC poderiam significar alto risco para progressão da periodontite em pacientes HIV+, Zong *et al* (2005) afirmaram que os níveis séricos aumentados de IFN- $\gamma$  e IL-4 estavam associados com periodontite crônica e que o controle da infecção gengival pode reduzir a concentração de IFN- $\gamma$ , mas, não a de IL-4.

## **2.5 A resposta imune a *Porphyromonas gingivalis***

O cocobacilo *Porphyromonas gingivalis*, anteriormente denominado *Bacteroides gingivalis*, é uma bactéria anaeróbica estrita, gram-negativa, imóvel, e não formadora de esporos. Tem sido associada com o início e progressão da DP, principalmente em indivíduos adultos, sendo encontrada na maioria dos sítios com alta atividade de doença na periodontite crônica (CONDORELLI *et al*, 1998). O interesse inicial neste microrganismo e em outros bacteróides de pigmentação negra surgiu diante do importante papel que desempenham em infecções mistas (MacDONALD *et al*, 1956), bem como por apresentarem um grande número de fatores de virulência capazes de induzir intensa destruição tecidual (vanWINKELHOFF *et al*, 1988; MIHARA & HOLT, 1993; WILSON *et al*, 1993). A associação de *P. gingivalis* com DP adveio dos estudos demonstrando a sua presença incomum em condições de saúde periodontal e gengivite, porém muito freqüente em formas destrutivas de periodontite (SLOTS *et al*, 1986; DAHLEN *et al*, 1992; KASUGA *et al*, 2000; TAKEUCHI *et al*, 2001). Ademais,

mostra-se reduzida em sítios tratados com sucesso, mas é comumente encontrada em amostras de placa provenientes de sítios que exibem recorrência de doença pós-terapia (EDWARDSSON *et al*, 1999; KAMMA *et al*, 2003).

Diversas tentativas de sorotipagem de *P. gingivalis* foram realizadas, enfocando diferenças dos antígenos capsulares, fimbria e antígenos da membrana externa (O'BRIEN-SIMPSON *et al*, 2004). A sorotipagem com base no reconhecimento de antígenos da membrana externa é a mais amplamente utilizada, sendo os sorotipos A e C os mais associados com a periodontite crônica (EBERSOLE & STEFFEN, 1995).

Dentre os diversos fatores de virulência da *P. gingivalis*, destacam-se os antígenos K da cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), fimbria, hemaglutininas, antígenos da membrana externa (O'BRIEN-SIMPSON *et al*, 2004), gingipainas (YONEDA *et al*, 2003) e fatores proteolíticos capazes de clivar anticorpos (GREGORY *et al*, 1992). Ademais, a invasão celular pode representar um mecanismo de escape dessa bactéria ao sistema imune. A *P. gingivalis* é capaz de invadir as células epiteliais (LAMONT *et al*, 1995) num mecanismo no qual a fimbria e a hemaglutinina (DU *et al*, 1997; NJOROGÉ *et al*, 1997; JOTWANI *et al*, 2004) exercem um papel fundamental, em provável interação com a citoqueratina das células epiteliais (SOJAR *et al*, 2002).

O LPS da *P. gingivalis* possui baixa endotoxicidade (OGAWA *et al*, 2000) e difere de outras bactérias gram-negativas pela sua incapacidade de estimular diretamente a produção de E-selectina em células endoteliais humanas com conseqüente baixa adesividade dos neutrófilos ao endotélio (DARVEAU *et al*, 1995). Seu Lipídio A, o centro bioativo e endotóxico da molécula de LPS, exhibe padrão de fosforilação e acilação diferenciados quando comparado com o lipídio da *E. coli*, bactéria cujo LPS é amplamente utilizado nas pesquisas experimentais (OGAWA *et al*, 1996). Em contraste com a *E. coli*, o LPS da *P. gingivalis* é capaz de induzir resposta mitogênica tanto em ratos C3H/HeN responsivos ao LPS de *E. coli*, quanto nos animais C3H/HeJ portadores de uma mutação no gene do TLR-4 que os tornam hiporresponsivos a esse LPS (OGAWA *et al*, 1996; ITO *et al*, 1996).

Alguns padrões moleculares altamente conservados, denominados PAMPs, são partilhados por grupos de microrganismos. Dentre os PAMPs, destacam-se o LPS das bactérias gram-

negativas; ácido lipoteicoico das bactérias gram-positivas; peptidoglicano, componente da parede celular de bactérias gram-negativas, gram-positivas e micobactérias; motivo CpG não metilado, uma típica característica de muitos microrganismos inferiores não observada no DNA dos mamíferos; RNA de dupla fita de origem viral; e manose, componente da parede celular de fungos. Os PAMPs são reconhecidos pelas células do sistema imune inato pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) (UTHAISANGSOOK *et al*, 2002). Os Toll Like Receptors (TLR) são PRRs que possuem um papel central no reconhecimento das “assinaturas moleculares” microbianas, iniciam diferentes vias de sinalização e exercem influência no controle da maturação de células dendríticas e diferenciação de células Th (MEDZHITOV, 2001; JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). As células imunes usam diferentes combinações de TLRs, organizados em homodímeros ou heterodímeros, para detectar características diversas de um microrganismo (UNDERHILL & OZINSKY, 2002) (Figura 4).

Com a maioria das infecções por bactérias gram-negativas ocorre reconhecimento do LPS bacteriano pelo TLR-4 em interação com as moléculas CD-14 e MD-2. A *Porphyromonas gingivalis*, entretanto, é uma bactéria gram-negativa que possui um LPS pouco usual que se liga ao TLR-2, podendo ainda haver dimerização entre TLR2 e TLR-6 (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Na literatura disponível, os resultados dos estudos são conflituosos no que diz respeito à sinalização da *P. gingivalis* via TLR-4. Hirschfeld *et al* (2001) sugeriram que essa bactéria não exerce sinalização via TLR-4. Em adição, outros autores observaram que o LPS da *P. gingivalis* exerceu ação de antagonista ao TLR-4 em seus experimentos (YOSHIMURA *et al*, 2003; BRAINBRIDGE & DARVEAU, 2001; COATS *et al*, 2003). Entretanto, existem relatos de sinalização pela *P. gingivalis* tanto via TLR-2 quanto via TLR-4 (BAINBRIDGE & DARVEAU, 2001; OGAWA *et al*, 2002). Ogawa *et al* (2002) sugeriram que o LPS da *P. gingivalis*, uma vez corretamente purificado, exerce sinalização via TLR-4, enquanto que moléculas associadas ao lipídio A desse LPS, provavelmente lipoprotéicas, induzem sinalização via TLR-2. Já Bainbridge & Darveau (2001) ressaltam que o LPS da *P. gingivalis* é estruturalmente heterogêneo, podendo apresentar cadeias de ácidos graxos com diferentes comprimentos. Essas diferenças estruturais nos múltiplos lipídios A possibilitariam sinalização ora via TLR-4 ora via TLR-2. A fimbria da *P. gingivalis* também é capaz de



induzir sinalização via TLR-2, num mecanismo que envolve a ativação de integrinas e a utilização de CD-14 e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) (HAROKOPAKIS & HAJISHENGALLIS, 2005).

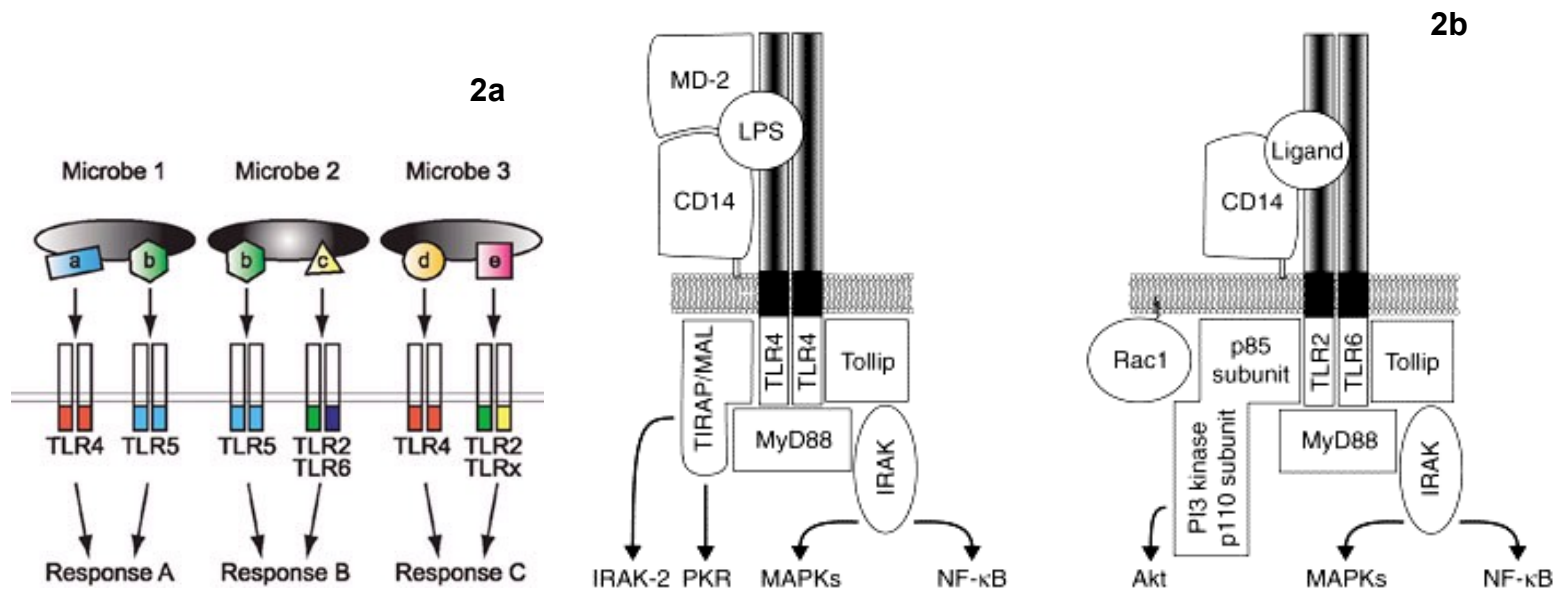


Figura 4: (a) O reconhecimento de diferentes PAMPs por múltiplos TLRs acarreta em sinalizações intracelulares variadas e respostas diferentes. (b) O domínio extracelular do TLR4 associa-se com MD-2 e CD-14, enquanto o domínio intracelular forma um complexo de sinalização incluindo MyD88, Tollip, IRAK e TIRAP/MAL. As respostas específicas do TLR4 são mediadas por TIRAP/MAL. O domínio extracelular do dímero TLR2-TLR6 também associa-se com CD-14. O domínio intracelular também inclui MyD88, Tollip e IRAK. TLR2-TLR6 pode associar-se especificamente com PI3 cinase sob regulação de RAC1 para ativar Akt. *Reproduzido e Traduzido de UNDERHILL & OZINSKY, 2002.*

Estudos recentes indicam ainda que outros componentes indeterminados da *P. gingivalis*, diferentes do LPS e da fimbria, ligam-se ao TLR-2 induzindo uma secreção de citocinas ainda mais elevada que esses dois importantes fatores de virulência dessa bactéria (KASUMOTO *et al*, 2004). Recentemente, Asai *et al* (2005) identificaram uma lipoproteína associada ao LPS da *P. gingivalis* denominada PG1828 e observaram uma acentuada redução na sinalização do TLR-2 quando se utilizou LPS livre dessa lipoproteína, indicando que esse componente lipoprotéico pode ser um novo e importante fator bacteriano envolvido na patogênese da periodontite. O LPS da *P. gingivalis*, sua fimbriolina e a bactéria inteira na sua forma inativada são capazes de estimular a produção de IL-8 e MCP-1 em células endoteliais (NASSAR *et al*, 2002). Existem indícios desse estímulo ser dependente da molécula CD-14 (MAO *et al*, 2002). Entretanto, quando adicionada viva à cultura de células endoteliais, a *P. gingivalis* promove redução da expressão dessas quimiocinas. A supressão da secreção de IL-8 e MCP-1 pela *P. gingivalis* não depende de aderência ou invasão epitelial e está possivelmente associada à ação proteolítica de gingipaínas secretadas pela bactéria viva sobre a molécula CD-14 (TADA *et al*, 2002).

Jotwani *et al* (2001) observaram baixa concentração de IL-12 e alta concentração de IL-10 por células dendríticas em cultura pulsadas com *P. gingivalis*, bem como uma baixa taxa proliferativa e baixa produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4+ estimulados por essas células dendríticas. Num estudo de Kikuchi *et al* (2004), a *P. gingivalis* induziu baixíssimas concentrações de IL-12 tanto nas células dendríticas quanto nos macrófagos. Houve indução de IL-10, porém em menor quantidade que a IL-10 induzida pelo *A. actinomycetemcomitans*. Contraditoriamente ao estudo de Jotwani e colaboradores, somente os macrófagos em cultura e não as células dendríticas produziram essa citocina.

Yun *et al* (2002) mostraram que o LPS da *P. gingivalis* é capaz de induzir secreção de IL-12 pelos monócitos e conseqüente secreção de IFN-gama por células T. Entretanto, a gingipaína da *P. gingivalis*, uma cisteína proteinase extraída da membrana externa bacteriana, é capaz de clivar IL-12 e IFN- $\gamma$  mesmo em presença de soro (YUN *et al*, 1999; YUN *et al*, 2001), sendo um mecanismo que pode contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune Th2 com conseqüente predominância de células B na lesão periodontal avançada. Em adição a esses achados, mais recentemente, Yun *et al* (2003) observaram que

a IL-4 é resistente à proteólise pela gingipaina da *P. gingivalis* quando em presença de soro. A adição de fatores séricos na metodologia de estudo das gingipainas é importante visando mimetizar um ambiente rico em inibidores de protease, como provavelmente é o ambiente da lâmina própria periodontal e fluido gengival.

Num estudo de Herminajeng *et al* (2001), observou-se que na ausência de IL-10, induzida pela administração de anti-IL-10, camundongos desafiados com LPS da *P. gingivalis* num modelo de abscesso murino apresentaram uma resolução mais rápida do processo cicatricial, com uma resposta imune tipicamente celular. Porém, Sasaki *et al* (2004) infectaram camundongos *knockout* para IL-10 com *P. gingivalis* via administração oral de  $10^9$  bactérias em uma escala pré-determinada de doses. A deleção de IL-10 promoveu uma perda óssea alveolar mais severa independente de aumento de IFN-gama ou IL-1 e com notório aumento da expressão de RANKL em comparação aos animais controles.

Referente à resposta imune humoral em humanos, níveis elevados de IgG sérica anti-*P. gingivalis* têm sido encontrados em indivíduos com periodontite (EBERSOLE *et al*, 1986; LOPATIN & BLACKBURN, 1992) e parece haver uma relação direta entre os níveis séricos de IgG anti-*Porphyromonas gingivalis* e a colonização subgengival por essa bactéria (KOJIMA *et al*, 1997). Ebersole *et al* (1986) observaram ainda que pacientes doentes apresentam níveis mais elevados de IgA, IgM e IgE anti-*Porphyromonas gingivalis* que indivíduos saudáveis. Mesmo após o término do tratamento periodontal, os níveis de IgG específica para *P. gingivalis* mantêm-se elevados tanto no soro quanto no fluido gengival. Mouton *et al* (1987) observaram que um ano após o término do tratamento os níveis séricos de IgG anti-*P. gingivalis* haviam reduzido à metade dos níveis iniciais e Papapanou *et al* (2004) não observaram redução dos níveis séricos de IgG, mesmo após 30 meses decorridos do término da terapia periodontal. No fluido gengival, Alexander *et al* (1996) observaram permanência de níveis elevados de IgG mesmo após tratamento.

Mouton *et al* (1987) detectaram dois subgrupos distintos em indivíduos com periodontite crônica quanto ao padrão de resposta imune humoral: um subgrupo cuja resposta assemelhava-se à dos saudáveis, com ausência de IgA anti-*P. gingivalis* e níveis séricos de IgG e IgM semelhantes aos dos saudáveis; e um segundo subgrupo, que apresentava

IgA anti-*P. gingivalis* e altos níveis de IgG específica. Ebersole & Steffen (1995) também observaram uma dicotomia entre os indivíduos com periodontite, classificando-os em altos e baixos respondedores, sendo que esses últimos possuíam níveis séricos de imunoglobulina anti-*P. gingivalis* semelhantes aos dos indivíduos sadios.

A *P. gingivalis* possui um potencial para ativação policlonal de células B, o que acarreta num número elevado de células B nos tecidos periodontais (BICK *et al*, 1981). Champaiboon *et al* (2000) observaram um papel da *P. gingivalis* na ativação policlonal de células B tanto diretamente quanto indiretamente, através da indução à produção de IL-10 pelos monócitos. Katz *et al* (1992) observaram, num estudo em ratos, que a produção de IgG anti-*P.gingivalis* foi dependente de células T, e Kato *et al* (2005) observaram uma dependência do papel das células T na ativação de células B e produção de anticorpos com perfil misto de produção de citocinas e proporção Th2/Th1 elevada na produção de IgG específica contra um antígeno de 53 kDa (Ag53) da membrana externa da *P. gingivalis*.

Diversos estudos encontraram uma prevalência da subclasse IgG2 no soro de indivíduos com periodontite. A secreção de IgG2 é estimulada pelo IFN- $\gamma$ , citocina característica de uma resposta Th1. Lopatin & Blackburn (1992) observaram níveis séricos significativamente elevados de IgG2 e IgG1 anti-*P. gingivalis*, bem como de IgG1 anti-LPS da *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite crônica em relação a controles clinicamente sadios. Apesar de ter sido a subclasse mais prevalente, a IgG2 encontrada apresentava baixa avidéz. Whitney *et al* (1992) encontraram predominância de IgG2 e IgG3 sérica anti-*P.gingivalis* em indivíduos com periodontite agressiva e Polak *et al* (1995) observaram que a subclasse IgG2 foi predominante no reconhecimento de antígenos da membrana externa em indivíduos com periodontite crônica, seguida de IgG3, IgG1 e IgG4. Gemmel *et al* (2004a) observaram em camundongos imunizados com *P. gingivalis* uma prevalência da subclasse IgG1, característica do perfil Th2 nesses animais.

Estudos acerca da concentração, no fluido gengival, de IgG específica para *P. gingivalis* apresentaram resultados sugestivos de um padrão de resposta imune localizada nos tecidos gengivais distinto daquele observado nos estudos de titulações séricas. Wilton *et al* (1992) observaram níveis mais elevados de IgG1 e IgG4 anti-*P. gingivalis* no fluido gengival em indivíduos periodontais em comparação ao grupo controle, apesar da detecção

de IgG4 não ter sido observada em muitos casos. Num experimento posterior no qual analisaram as concentrações séricas e no fluido gengival das subclasses de IgG anti-*P. gingivalis*, Wilton *et al* (1993) observaram indícios de que a concentração de IgG1, IgG2 e IgG3 no fluido gengival é amplamente derivada do plasma, mas que uma fração da IgG4 pode ter síntese localizada nos tecidos periodontais. Um estudo prévio, realizado por Reinhard *et al* (1989) contemplou a relação da IgG4 com a atividade de doença periodontal. Foi detectada uma concentração mais elevada de IgG4 e IgG1 em sítios em atividade de doença em comparação com sítios com estabilidade periodontal. A IL-4 estimula a secreção de IgG4 por plasmócitos.

Num estudo usando a técnica Western Blot, Laosrim *et al* (1990) observaram uma forte reação com antígenos de alto peso molecular, nos soros de indivíduos acometidos por periodontite crônica e com proteínas de peso molecular mais baixo, nos soros de indivíduos acometidos por periodontite agressiva. Epítomos protéicos de *P. gingivalis* são reconhecidos pela maioria dos pacientes, enquanto anticorpos de alguns pacientes reconhecem LPS e carboidrato como determinantes antigênicos. Assim, a porção proteica da *P. gingivalis* parece representar uma importante fração imunodominante desse antígeno (BOUTSI, 1993), em especial proteínas na faixa de 41 a 43 kDa (BOUTSI *et al*, 1996).

## **2.6 - A susceptibilidade genética da doença periodontal**

Os humanos compartilham entre si 99% da sua informação genética, sendo assim considerados indivíduos da mesma espécie. O restante 1% do seu genoma difere de pessoa para pessoa, diferença esta envolvida na variabilidade da espécie (NARES, 2003). Fatores genéticos-hereditários podem estar relacionados com as variações no mecanismo imuno-inflamatório de defesa do hospedeiro, de modo a interferir na susceptibilidade, expressão e progressão das doenças periodontais, sendo estas consideradas multifatoriais ou não Mendelianas (HART & KORNMAN, 1997; SCHENKEIN, 2002; NARES, 2003).

A contribuição dos fatores genéticos para a doença periodontal foi inicialmente identificada em estudos realizados com gêmeos adultos, criados juntos ou separados, de modo que os dados, para todas as medidas clínicas, foram mais concordantes entre si entre gêmeos monozigóticos (idênticos) do que entre dizigóticos (fraternal), chegando-se à estimativa de que a periodontite crônica seja 50% hereditária. Não foi encontrado um

componente hereditário para a gengivite. Concluiu-se que metade da susceptibilidade à doença na população se deve às variações genéticas e não aos aspectos comportamentais (MICHALOWICZ *et al*, 1991, 2000). Também em modelo animal foi verificado que susceptibilidade e resistência à doença periodontal são traços hereditários; Baker (2005) estudou camundongos com linhagens imune-normais oriundas de cruzamentos entre as espécies, determinadas como susceptíveis ou resistentes à DP, avaliando a expressão tecidual de um grupo de genes imunologicamente chave (TNF, IL-1, OPT, IL-15, STAT-6), na gengiva e no baço daqueles animais, usando a técnica de QR-PCR. Concluiu que linhagens com diferenças na expressão basal do mRNA de determinados genes correlacionavam com diferenças na susceptibilidade à doença.

Os indícios sobre essa influência genética na patogênese da doença periodontal advêm do conhecimento de que a prática de uma higiene oral deficiente apenas não é suficiente para levar a uma doença periodontal destrutiva severa, e que certos indivíduos estão sob risco relativamente alto à destruição periodontal (LÖE *et al*, 1986). Apesar da microbiota bucal específica periodontopatogênica ser necessária para o início e continuação da doença periodontal, o grau e a severidade de sua manifestação clínica dependem da forma pela qual os diferentes componentes da susceptibilidade do hospedeiro, como a resposta imuno-inflamatória de defesa, são modulados por fatores de risco sistêmicos ou mesmo ambientais (HART & KORNMAN, 1997; KORNMAN & GIOVINE, 1998; WILSON, 1999).

Nesta defesa, o sistema imune produz mediadores inflamatórios, tais como as citocinas, para proteger os tecidos de agentes agressores, invasão de microrganismos e injúrias ao hospedeiro. Na maioria das vezes, ocorre o retorno da homeostasia pela ação regulatória deste sistema. No entanto, há casos em que a produção excessiva de determinadas citocinas pode causar danos ao hospedeiro. Polimorfismos genéticos nas regiões regulatórias de genes responsáveis pelos mediadores inflamatórios podem agir criando diferentes respostas ao desafio microbiano entre indivíduos (KORNMAN & HART, 1997; JEPSEN *et al*, 2003), podendo alterar a quantidade ou a habilidade daqueles em exercerem sua função na resposta imune (NEWMAN, 1997; BICKEL *et al*, 2001; TAYLOR *et al*, 2004).

O polimorfismo genético corresponde a uma alteração no genoma de um indivíduo dentro do parâmetro que é considerado biologicamente normal (KORNMAN *et al*, 1997;

NARES, 2003). É definido como uma seqüência de nucleotídeos, em uma posição particular na molécula de DNA, que exibe pelo menos duas variantes estruturais (alelos) e que ocorre em uma população numa freqüência maior que 1% (TAYLOR *et al*, 2004).

### **2.6.1 – Polimorfismos do HLA de classe II**

George Snell *et al*, na década de 20, descreveram o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) murino. A descoberta do CPH humano, só ocorreu na década de 60 por Jean Dausset *et al*, 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).

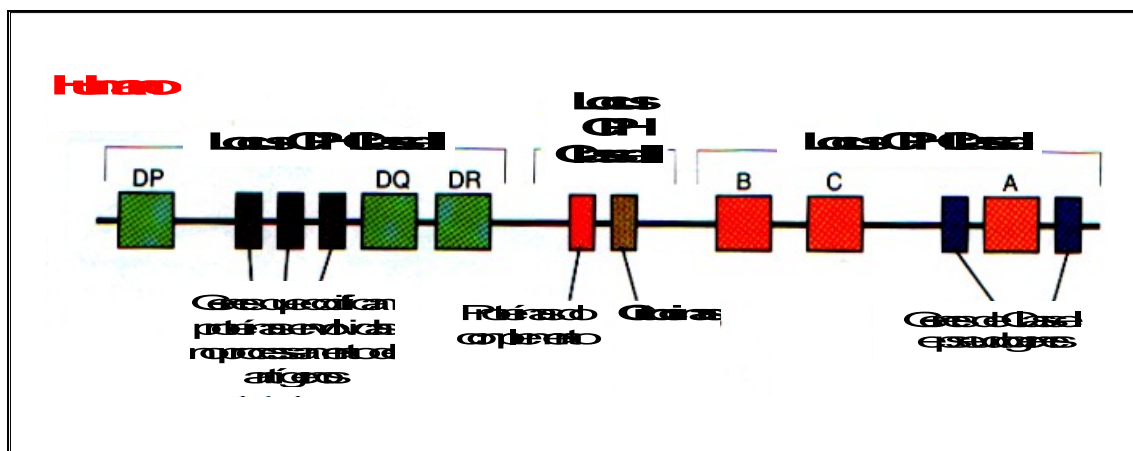
O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 e ocupa 0,1% do genoma humano; os genes que compõem este sistema codificam moléculas de membrana cuja função é a apresentação de peptídeos antigênicos ao linfócito T, portanto, moléculas envolvidas na regulação da resposta imune. Os genes HLA exercem um papel central nas respostas imunes aos antígenos protéicos. Isto porque os linfócitos T antígeno-específicos não reconhecem antígenos na forma livre ou solúvel, mas ao contrário, reconhecem porções de antígenos protéicos (isto é, peptídeos) não covalentemente ligados aos produtos dos genes HLA. Assim, as moléculas das classes I e II codificadas pelo HLA ligam-se a antígenos peptídicos estranhos e formam complexos que são reconhecidos pelos linfócitos T antígeno-específicos. Essas moléculas, portanto, proporcionam um sistema para apresentar peptídeos antigênicos às células T, permitindo que esses linfócitos cumpram o seu papel de vigilância imunológica. Os peptídeos antigênicos gerados no citosol (em geral, de proteínas sintetizadas endogenamente) ligam-se a moléculas de classe I e são reconhecidos pelos linfócitos T citolíticos CD8+, enquanto que os fragmentos peptídicos gerados nos endossomos ou nos fago-lisossomos pelas proteínas endocitadas (geralmente exógenas) ficam associados à classe II e são reconhecidos pelas células T auxiliares CD4+. 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 IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . 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, podendo também ser induzidas por IFN- $\gamma$  em muitos tipos celulares e moduladas por outras citocinas como IL-4 e TNF- $\alpha$  (ABBAS *et al*, 2000).

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 5: 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- $\alpha$  e a região de classe I, com os *Loci* B, C e A. Adaptado de ABBAS *et al*, 2000.

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  $\alpha$  e  $\beta$ , que estão em contato com os peptídeos antigênicos (DONADI, 2000).

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 *et al*, 1996). Existe, atualmente, algumas hipóteses que tentam esclarecer como ocorre esse envolvimento direto da molécula do HLA com as doenças (DONADI, 2000):

1<sup>a</sup>) **as moléculas de histocompatibilidade podem funcionar como receptores para alguns agentes etiológicos** - uma determinada molécula do HLA agiria como receptor para o patógeno facilitando a sua entrada na célula; 2<sup>a</sup>) **a molécula HLA seleciona o peptídeo antigênico a ser apresentado ao linfócito T** - 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<sup>a</sup>) **um receptor de célula T que reconhece o complexo “peptídeo-molécula de HLA” é o responsável pela doença**; 4<sup>a</sup>) **mimetismo molecular entre os antígenos HLA e os agentes etiológicos** - uma molécula HLA associada à doença, imunologicamente similar a epítopos antigênicos do patógeno, levaria ao reconhecimento desta como antígeno estranho ou, alternativamente, essa similaridade impediria que o micróbio fosse reconhecido como estranho e os mecanismos efetores desencadeados; 5<sup>a</sup>) **indução aberrante de expressão de moléculas HLA de classe II** – células teciduais que normalmente não expressam moléculas HLA de classe II podem ser estimuladas a apresentá-las, na presença de citocinas derivadas, por exemplo, de células infectadas por vírus. Estas células podem apresentar aos linfócitos T, assim, antígenos derivados da degradação do próprio tecido, gerando uma resposta auto-imune; 6<sup>a</sup>) **participação de outros genes do HLA, ou mesmo de fora do CPH, que estejam em desequilíbrio de ligação com os genes de histocompatibilidade** – alguns fatores do complemento, fatores de necrose tumoral, peptídeos processadores e transportadores de determinantes antigênicos (TAP), proteínas do choque térmico, citocinas TNF- $\alpha$ , têm algum papel na resposta imune, sendo codificados por genes situados dentro

do CPH. Da mesma forma que os genes da classe I podem estar em desequilíbrio de ligação com os de classe II, é possível que esses também estejam em desequilíbrio com os outros genes de dentro ou de fora do CPH.

O sistema HLA é altamente informativo em estudos de genética de populações, devido ao 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 a distribuição de alelos e haplótipos são característicos de cada grupo étnico (MONTE, 2004).

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. Em vista disto, 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. Os principais achados de estudos realizados sobre a associação entre HLA e periodontite crônica encontram-se sumarizados no Quadro 3.

Quadro 3 - Sumário dos principais achados de trabalhos sobre associação entre HLA e periodontite crônica (PC)

Autor /Ano / Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Marggraf <i>et al</i> , 1983 Caso-controle	HLA-A23, -A24 HLA-B44 e Cw4	Pacientes com PC	Frequência aumentada desses alelos
Michalowicz <i>et al</i> , 1991 Caso-controle	HLA-A9 ou -B15	Pacientes com DP	O risco relativo de desenvolvimento da DP em pac que possuem essas especificidades HLA é de 1.5 a 3.5 vezes maior do que em pac que não as possuem
Bonfil <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	HLA-DR4	-48 pac.c/periodontite severa -55 suj controle, sem periodontite	-os subtipos HLA-DR4 0401, 0404, 0405 e 0408 tenderam a ser mais frequentes (p=0.08) nos casos do que nos controles. Sugerem que esses subtipos podem ser considerados como fator de risco para “periodontite rapidamente progressiva”
Price <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	HaplótipoMHC 8.1 (HLA- A1,B8,DR3)	- 2 grupos de 16 homens caucasianos adultos, HIV+, com ou sem fenótipos HLA-B8	Maioria dos pac que expressavam HLA-B8 apresentaram maiores índices SS, PI e severidade de doença periodontal do que aqueles HLA-B8 negativos
Machulla <i>et al</i> , 2002 Caso-controle	HLA-A,B,Cw DRB1,DRB3/4/ 5, DQB1	-102 pac alemães caucasianos com PC -102 grupo controle sem periodontite	Maior frequência dos alelos HLA-A*11, -A*29, -B*14, -B*18 e -Cw*08 e menor frequência dos HLA-A*03, -A*31, -A*30/31, -B*51 e DQB1*04 quando comparados ao grupo controle. Sugerem que HLA-A*03 é um fator protetor para PC e o HLA-DRB1*13 um fator de risco para desenvolvimento de periodontite agressiva

continua...

### Quadro 3 – continuação...

Autor /Ano / Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Stein <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	HLA-A,B,Cw DRB1,DRB3/4/ 5, DQB1	-102 pac alemães caucasianos com PC -102 grupo controle sem periodontite	Alta proporção na homozigotose dos alelos HLA-DRB1*15 : DRB5*(DR51) : DQB1*06, e baixa frequência da homozigotose HLA-DRBblank*, nos pacientes com PC
Zhang <i>et al</i> , 2004 Caso-controle	HLA- DRB1*1501	-134 pac chineses com PC severa (PCS) -81 suj grupo controle, periodontalmente sadios	Observaram maior frequência desse alelo nos pac com doença comparados ao grupo controle, sugerindo que pode ser um indicador de susceptibilidade à PCS naquele grupo étnico

## 2.6.2 - Polimorfismos de citocinas

Os mecanismos biológicos por trás da associação entre genótipo positivo e doença periodontal repousam na hipótese de que esses polimorfismos podem modular a secreção de citocinas. Entretanto, essa relação não tem sido completamente demonstrada. No contexto desta hipótese, as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas relacionadas a citocinas podem contribuir para a susceptibilidade e severidade, ou para a proteção, dos indivíduos quanto ao desenvolvimento da periodontite crônica severa. Dentro desta lógica, e compondo um perfil imunogenético de populações estudadas, as seguintes possibilidades são levantadas:

1. pacientes portadores dos seguintes alelos e genótipos, cujos fenótipos previstos são de alta produção dessas citocinas pró-inflamatórias, seriam mais susceptíveis ao desenvolvimento da periodontite crônica severa:

a) alelo 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953 (T)</sup> (genótipos **TT+ CT**)

b) alelo 2 TNF- $\alpha$ <sup>-308 (A)</sup> (genótipos **AA +GA**)

c) alelo 1 IL-6<sup>-174 (G)</sup> (genótipos **GG + GC**).

2. pacientes portadores dos alelos 1 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> <sup>codons 10(T), 25(G)</sup> (genótipos **TT + GG, TC + GG**), relacionados com fenótipos previstos de alta produção, desenvolveriam doença menos severa, uma vez que o TGF- $\beta$ <sub>1</sub> pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , reduzir a síntese e liberação de MMPs

(metaloproteinases) pelos fibroblastos, além de estimular a produção de TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases). Contrariamente, em DP mais severa, pode influenciar a exacerbação do processo inflamatório devido ao seu papel no estímulo ao recrutamento e ativação de leucócitos.

3. pacientes portadores do alelo 1 da IFN- $\gamma$ <sup>+874(T)</sup> (genótipos **TT + TA**), cujos fenótipos previstos são de alta produção, desenvolveriam doença menos severa devido a resposta mais predominantemente protetora, do tipo Th1, com maior eficiência da imunidade mediada por células e produção de anticorpos protetores.
4. pacientes portadores de polimorfismo da IL-10<sup>-1082(G), -819(C), -592(C)</sup> (genótipos **GCC/GCC + GCC/ACC + GCC/ATA**) – fenótipos previstos de alta produção, poderiam ter doença mais severa, dentro de um perfil de resposta imune do tipo Th2, capaz de inibir o perfil de citocinas de células Th1, particularmente IFN- $\gamma$ , ou mesmo, contrariamente, teriam perfil mais protetor, provavelmente diminuindo a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6.

### **2.6.2.1- Estudos sobre o polimorfismo da IL-1**

Muitos estudos têm descrito que polimorfismos genéticos nos grupos de genes da IL-1 estão associados ao aumento da severidade de doenças inflamatórias. Um exemplo é o polimorfismo no alelo 2 do gene IL-1 antagonista do receptor (IL-1RA) que está associado à colite ulcerativa, lupus eritematoso sistêmico, alopecia areata e líquen esclerosante (KORNMAN & HART, 1997).

Em relação à doença periodontal, Pociot *et al* (1992) mostraram que monócitos de pacientes portadores do alelo 2 do gene IL-1B no sítio +3954 produziam uma maior quantidade de IL-1 $\beta$  do que pacientes sem este alelo. Engebretson *et al* (1999) também encontraram elevados níveis (2.5 vezes mais) de IL-1 $\beta$  no FGC em sítios rasos de pacientes portadores de genótipo positivo, antes de tratamento, e 2.2 vezes mais após tratamento, com diferença menos aparente para sítios profundos. Gore *et al* (1998) encontraram que neutrófilos de pacientes com periodontite avançada que eram portadores de alelo 2 IL-1B<sup>+3954</sup> produziam elevados níveis de IL-1 $\beta$  comparados com pacientes sem este alelo; entretanto, as diferenças não foram significativas devido à ampla variabilidade inter-

individual. Galbraith *et al* (1999) encontraram relação significativa entre genótipo e a produção de IL-1 $\beta$  por neutrófilos orais e do sangue periférico. Já Figueredo *et al* (1999) observaram níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$  no FGC de pacientes com periodontite, independentemente da severidade da doença no sítio amostrado, sugerindo que esses níveis são singulares a cada paciente. Em outro estudo (MARK *et al*, 2000) não foram encontradas diferenças significantes na produção de IL-1 $\beta$  por monócitos do sangue periférico, obtidos de pacientes genótipo-positivos e negativos. Embora existam muitas evidências da associação entre o polimorfismo IL-1B e níveis de IL-1 $\beta$ , este assunto não se encontra, ainda, totalmente esclarecido.

O primeiro estudo a sugerir associação entre polimorfismo genético nos genes da IL-1 e periodontite data de 1997, realizado por KORNMAN e colaboradores, que avaliaram em pacientes não-fumantes o polimorfismo do gene IL-1A, na posição -889, e do gene IL-1B, na posição +3953, cujo alelo 2 tem sido associado com o aumento de produção de IL-1 $\beta$ . Neste estudo, os indivíduos (> 35 anos) eram descendentes de caucasianos do norte da Europa e foram divididos em 3 grupos: com periodontite leve ou sem diagnóstico de periodontite (N=49); com periodontite moderada (N=42), e com periodontite generalizada severa (N=43). Foram excluídos indivíduos com história de diabetes, mulheres grávidas ou lactantes, uso crônico de drogas anti-inflamatórias, história de hepatite ou infecção por HIV. Foram realizados os exames periodontais de profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem. Foram realizadas radiografias de todas as regiões, sendo avaliada, por um examinador calibrado, a medida interproximal da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte, expressa em porcentagem em relação ao comprimento total da raiz. A classificação “leve” corresponde a nenhuma PS > 3 mm e nenhum sítio com perda óssea > 15%. A classificação “moderada” corresponde a um número < 4 sítios interproximais com perda óssea  $\geq$  50% e a perda óssea total entre 17 a 28%. A classificação “severa” requer um número  $\geq$  7 de sítios interproximais com um índice  $\geq$  50% de perda óssea e perda óssea total > 34%. A distribuição dos alelos de IL-1A, IL-1B e IL-1RA foram avaliados nos 3 grupos de indivíduos segundo a classificação anteriormente citada. Dos indivíduos classificados como portadores da periodontite severa, 58,1% eram fumantes, comparados com 10,2% e 11,9% nos grupos de periodontite leve e moderada, respectivamente. Entre os não-fumantes, foi observada uma forte associação

entre a severidade da periodontite e o genótipo composto, constando o polimorfismo no alelo 2 do gene IL-1A<sup>-889</sup> associado ao polimorfismo no alelo 2 do gene IL-1B<sup>+3953</sup>. Quando se avaliou a idade dos indivíduos, observou-se que aqueles não-fumantes que são genótipo-positivos para esse polimorfismo composto (alelos 2 IL-1A<sup>-889</sup> e IL-1B<sup>+3953</sup>) apresentam uma prevalência aumentada da severidade da doença em todas as idades. A doença periodontal severa em indivíduos genótipo-negativos somente foi observada naqueles com mais de 60 anos, mas verificou-se estar presente 20 anos mais cedo em indivíduos genótipo-positivos. Observou-se ainda que o alelo 2 de IL-1B estava associado à severidade da doença periodontal. Ainda neste mesmo estudo, os polimorfismos do IL-1RA e do TNF- $\alpha$  não foram encontrados estar associados à severidade da doença.

O polimorfismo do alelo 2 dos genes IL-1A<sup>-889 (+4845)</sup> e da IL-1B<sup>+3953(+3954)</sup>, associados à periodontite crônica, tem sido denominado “polimorfismo genótipo composto associado a periodontite (GAP)”. Há referência do polimorfismo IL-1B<sup>+3953</sup> como IL-1B<sup>+3954</sup>, devido à mudança na nomenclatura (GREENSTEIN & HART, 2002). Presentemente, o alelo 2 do SNP IL-1A<sup>+4845</sup> é acessado no lugar do IL-1A<sup>-889</sup> porque são concordantes e é tecnicamente mais fácil analisar o SNP IL-1A<sup>+4845</sup> (KORNMAN & Di GIOVINE, 1998).

O Quadro 4 discrimina os principais achados de trabalhos realizados por vários autores, em diversos grupos populacionais, sobre a observação da frequência dos polimorfismos da IL-1, seja do polimorfismo composto GAP, seja da IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> visto isoladamente, na periodontite crônica.

Quadro 4 – Sumário dos principais achados de estudos sobre associação entre genótipo composto IL-1A / IL-1B associado a periodontite (GAP), e periodontite crônica (PC), incluindo implantes

Autor / Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Kornman <i>et al</i> , 1997 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3953</sup> *	-49 suj sem PC/PC leve -42 pac PC moderada -43 pac PC severa Todos $\geq$ 35 anos	-Em não-fumantes, assoc estat/signif entre GAP e severidade de periodontite. -Em fumantes, severidade da doença não foi correlacionada com genótipo.
Gore <i>et al</i> , 1998 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3953</sup> *	-32 pac c/ periodontite -32 pac periodontalmente sadios controles, idade e gênero- combinados	-Assoc não estat/signif entre GAP e severidade de periodontite. Entretanto, frequência do alelo 2 IL1B+3953 sozinho era signif/te aumentada em pac com periodontite severa comparados com pac com periodontite leve, mas não comparável a pac sadios.

continua...

**Quadro 4 – Continuação...**

Autor / Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Ehmke <i>et al</i> , 1999 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-33 pac em manutenção periodontal monitorados por 2 anos	-Não foram encontradas diferenças nas taxas de sobrevivência de sítios ou dentes não exibindo perda de inserção $\geq 2$ mm comparados, na database, entre pacientes GAP+ e GAP-.
Galbraith <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	SNP Alelo 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953*</sup>	-20 pac c/gengivite -20 pac com PC -45 suj referência de pop c/ status periodontal desconhecido	-Aquele alelo estava significativamente aumentado em pacientes com periodontite avançada. -Existiu correlação significativa entre o genótipo e produção de IL-1 $\beta$ por PMNs orais e do sangue periférico.
Engebretson <i>et al</i> , 1999 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL-1A <sup>+4845</sup> IL-1B <sup>+3953</sup> TNF $\alpha$ , no FGC, e tec. biopsiado. Técnicas: PCR, e ELISA	22 pac adultos com DP moderada a severa, não- fumantes, > 35 anos	-Sete dos 22 indiv. eram GAP+. Observaram-se elevados níveis (2.5 vezes mais) de IL-1 $\beta$ no FGC em sítios rasos (<4mm) de pac GAP+, antes de trat.periodontal, e 2.2 vezes mais após terapia, com diferença menos aparente para sítios profundos. Maior redução da concentração de IL-1 $\beta$ ocorreu nos pac genótipos(-), o mesmo não acontecendo para GAP+. Níveis médios teciduais de IL-1 $\beta$ foram 3.6 vezes mais altos em GAP+ do que em GAP-. As quantidades totais de TNF- $\alpha$ e de IL-1 $\beta$ no FGC foram significativamente correlacionadas para pac GAP+, na baseline, o mesmo não acontecendo para os GAP-. Nas amostras teciduais, TNF- $\alpha$ estava abaixo dos níveis de detecção.
McGuire & Nunn, 1999 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-42 pac em manutenção, monitorados por 14 anos	-Ambos, fumo e presença de GAP estavam significativamente assoc com perda dental. Ambos, fumo e status GAP+ aumentaram o risco à perda dental.
Wilson & Nunn, 1999 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-27 pac com 33 implantes perdidos ou com $\geq 50\%$ de perda óssea, comparados a 38 pac sem perda óssea ou de implantes	-Não existiu evidência para associar aumento do risco de perda de implante com status GAP. -Entretanto, fumo aumentou o risco para falha de implante 2.5 vezes mais.
Armitage <i>et al</i> , 2000 Corte-transversal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	Amostra de conveniência de 300 chineses voluntários	-Somente 2,3% dos sujeitos eram GAP+. Também, poucos dos sujeitos que eram GAP+ estabeleciam alguma relação com susceptibilidade a periodontite crônica.
Cutler <i>et al</i> , 2000 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-52 sujeitos com PC localizada leve a moderada	-Não foram evidenciadas diferenças clínicas entre pacientes GAP-positivos e GAP-negativos.
De Sanctis & Zucchelli, 2000 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-40 pac periodontais submetidos a cirurgia de RTG	-Não foram identificadas diferenças estat/signif entre pac GAP+ ou GAP- , na database, quanto aos <b>IP</b> ou <b>SS</b> , <b>PS</b> , <b>NIC</b> ou recessão gengival
Lang <i>et al</i> , 2000 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-323 pac em manut. periodontal monitorados durante 4 re-chamadas	-Não houve efeito do GAP sobre mudanças no <b>SS</b> na pop total por causa de um efeito predominante do fumo. GAP+ que nunca fumaram (n=139) tiveram signif/te elevada chance de um aumento no % de <b>SS</b> durante o período de re-chamada

continua...



#### Quadro 4 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Mark et al, 2000 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-10 pac PAG+ -10 pac PAG-, com PC leve a moderada	-Não houve diferenças significante na <b>PS</b> ou <b>NIC</b> entre pac GAP+ e GAP-. Ademais, não existiram diferenças na produção de IL-1 $\beta$ por monócitos do sangue periférico entre os dois grupos.
McDevitt et al, 2000 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-44 casos (periodontite moderada a severa) -46 controles (sem ou com periodontite leve). Todos $\geq 35$ anos	-Não-fumantes ou ex-fumantes leves (<5 pcts/ano) que eram GAP+ tinham mais probabilidade de ter periodontite moderada a severa comparados com GAP-negativos.
Cattabriga et al, 2001 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-60 pac não- fumantes em manutenção periodontal	-GAP não estava associado com aumento de perda dental após 10 anos em pacientes periodontais não-fumantes, bem mantidos.
Cullinan et al, 2001 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	Amostra de conveniência de 295 sujeitos monitorados por 5 anos	-Foi identificada uma significante relação entre GAP e aumento na <b>PS</b> média em não-fumantes > 50 anos. Fumantes GAP+, e pac GAP+ com <i>P.gingivalis</i> em suas placas tinham um aumentado número de <b>PS</b> $\geq 3,5$ mm.
Papapanou et al, 2001 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-132 pac com periodontite - 73 controles periodont. sadios, idade e gênero-combinados	-GAP foi positivamente correlacionado com severidade de <b>PI</b> em pac c/periodontite. GAP foi identificado em 45,2% dos casos e em 41,7% dos controles (p<0.05). Não houve relação entre genótipo e perfis da microbiota subgingival.
Laine et al, 2001 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-53 pac não- fumantes -52 pac fumantes com periodontite severa	Não houve assoc entre GAP e doença em fumantes ou não-fumantes. GAP estava significativamente assoc com doença em não-fumantes sem <i>P.g.</i> ou <i>A.a.</i>
Thomson et al, 2001 Corte-transversal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	861 sujeitos de 26 anos, com periodontite	Após controle para gênero, status fumo, e níveis de placa, os sujeitos GAP+ tinham 12X mais probabilidade de ter tido pelo menos um dente com uma <b>PS</b> = 5mm.
Cafesse et al, 2002 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	22 pac com recessão gingival prévia, tratados por enxertos de tecido conjuntivo	Não foi identificada associação entre GAP e resposta a cirurgia mucogengival. Não existiram diferenças nos índices médios de infl gengival, <b>PS</b> e <b>NIC</b> entre pac GAP(+) e GAP(-).
Meisel et al, 2002 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	154 pac caucasianos com periodontite crônica	Não foram notadas diferenças signif nas frequências alélicas entre suj com PC leve/moderada versus severa. Entretanto, a extensão da <b>PI</b> (definida como % de sítios >4mm) foi signif/te assoc com GAP em fumantes. Concluíram que GAP apresentou uma interação com fumantes, e os não-fumantes não tinham um risco aumentado mesmo sendo GAP(+).
Rogers et al, 2002 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3953*</sup>	-119 pac caucasianos com diagnósticos: PC, p.agressiva, com implantes falhos ou bem sucedidos -60 controles com saúde periodontal	O genótipo composto (GAP) não apresentou assoc com a incidência de periodontite ou a severidade da doença. O IL1B+3953 sozinho estava assoc com p.crônica. Não houve assoc entre falha de implantes e GAP, ou dos genótipos IL-1A ou IL-1B individualmente.
Sakellari et al, 2003 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-110 pac não- fumantes, gregos, c/desconhecida condição periodontal -45 pac não- fumantes com PC	Com mesma análise estatística do estudo de KORNMAN, 1997, os resultados não demonstraram diferenças significantes da prevalência do polimorfismo entre os dois grupos. Não houve relação entre a presença do polimorfismo e severidade da <b>DP</b> .

#### Quadro 4 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Anusaksathien <i>et al</i> , 2003 Corte-transversal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	- 123 indiv. de Thai avaliados clínica e radiograficamente quanto ao status periodontal	Somente 1,6% dos indiv. eram genótipos GAP+, muita baixa para determinar assoc entre genótipo composto e formas severas de <b>DP</b> . Em conclusão, GAP pode não ser útil para prever a severidade da DP no grupo étnico de Thai.
Feloutzis <i>et al</i> , 2003 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-90 pac caucasianos com 1 ou mais implantes, fumantes e não-fumantes	31,1% eram GAP+ e 59,9%, negativos. Após estratificação para status fumo, sugerem que fumantes pesados portadores de genótipo+ estão assoc com risco aumentado a perda óssea peri-implantar, após reabilitação protética e durante manutenção.
Christgau <i>et al</i> , 2003 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	- 47 pac com 94 defeitos ósseos tratados com RTG, avaliados por 24 meses	19 pac eram GAP+ e 28 GAP-; houve resultados de diminuição de <b>PS</b> , ganho de inserção clínica e aumento de densidade óssea nos defeitos, em ambos os grupos, sem diferenças estatisticamente significantes.
Trevilatto <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	- 113 brasileiros caucasianos (>25 anos), não-fumantes : 31 pac c/PC moderada, 38 c/PC severa, e 44 indiv.sadios	Não encontraram diferenças estatist/significativas na distribuição das freqüências alélicas e genóticas entre os grupos estudados. Concluíram que nem os polimorfismos individualmente avaliados nem os genótipos compostos estavam associados com a severidade da DP crônica na população estudada.
Meisel <i>et al</i> , 2004 Corte-transversal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	1.085 indiv. examinados quanto ao status periodontal e hábito de fumar	Sujeitos GAP(+) tinham aumentado risco, fumo-assoc, à periodontite comparados com genótipo(-). Concluíram existir interação gene-ambiental entre uso do fumo e polimorf genet IL-1. Fumantes GAP+ tinham mais alto risco à periodontite.
Weiss <i>et al</i> , 2004 Longitudinal	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>+4845</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	44 pac com defeitos intraósseos tratados com enxertos ósseos, sob exame antes e após 9 meses	13 pac (29,55%) eram genótipos GAP+. Na database, não havia diferença estat/signif na <b>PS</b> ou <b>PI</b> entre os grupos GAP+ e (-). Pac GAP+ tiveram, não estat/signif, pequena redução na <b>PS</b> (1.86X2.13 mm) e um grande ganho de inserção clínica(1.20X0.65mm). Concluíram não haver evidência que GAP influencia resultados de terapia regenerativa periodontal com enxertos ósseos.
Campos <i>et al</i> , 2005 Longitudinal	Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> Alelo2 IL1B <sup>+3953,-511</sup> IL-1RN (intron 2)	-28 pac não- fumantes, c/ perda ≥1 implantes -34 pac controles, sem perda	Concluem que esses polimorfismos não estavam associados com falha precoce de implantes nessa população brasileira não fumante.
Lopez <i>et al</i> , 2005 Caso-controle	GAP: SNPs Alelo 2 IL1A <sup>-889</sup> IL1B <sup>+3954</sup>	-330 pac periodontais, chilenos (casos) - 101 sadios (controles) Idade: 20-48 anos	Prevalência de GAP+ foi signif/tte mais alta em casos (26,06%) que nos controles (9,9%), estando signif/tte assoc com periodontite. Porém, não houve relação com status fumo e severidade de doença. Resultados demonstraram que indiv GAP+ tinham alto risco para desenvolvimento de periodontite.

**IP** = índice de placa; **SS** = sangramento a sondagem; **PS** = profundidade de sondagem; **NIC** = nível de inserção clínica; **PI** = perda de inserção; **DP** = doença periodontal; **PC** = periodontite crônica; **RTG** = regeneração tecidual guiada. Adaptado de Taylor *et al*. Periodontology 2000 2004; 35:158-182.

A partir do estudo pioneiro de Kornman *et al* (1997), outros trabalhos, conforme discriminados acima, também mostraram uma associação positiva entre esse polimorfismo (GAP) e periodontite crônica (McDEVITT *et al*, 2000; CULLINAN *et al*, 2001;

PAPAPANOU *et al*, 2001; THOMSON *et al*, 2001; LOPEZ *et al*, 2005), com pacientes em manutenção (LANG *et al*, 2000), com presença de *P.gingivalis* (CULLINAN *et al*, 2001). Já outros autores assinalaram esta positividade de associação somente em relação ao alelo 2 da IL-1B<sup>+3953</sup> (GORE *et al*, 1998; GALBRAITH *et al*, 1999; ROGERS *et al*, 2002). Quando o polimorfismo GAP foi avaliado em fumantes, encontraram-se resultados positivos de associação com periodontite crônica (MEISEL *et al*, 2002), perda dental (McGUIRE & NUNN, 1999), e perda de implantes (WILSON & NUNN, 1999; FELOUTZIS *et al*, 2003). Contrariamente, vários estudos não assinalaram uma associação positiva com periodontite crônica (ARMITAGE *et al*, 2000; CUTLER *et al*, 2000; MARK *et al*, 2000; LAINE *et al*, 2001; ROGERS *et al*, 2002; SAKELLARI *et al*, 2003; ANUSAKSATHIEN *et al*, 2003; TREVILATTO *et al*, 2003), sobrevivência dental (EHMKE *et al*, 1999; CATTABRIGA *et al*, 2001), perda de implantes (WILSON & NUNN, 1999; CAMPOS *et al*, 2005), e terapia regenerativa (De SANCTIS & ZUCHELLI, 2000; CAFESSE *et al*, 2002; CHRISTGAU *et al*, 2003; WEISS *et al*, 2004). Ressalte-se a maior prevalência desse polimorfismo (GAP) em caucasianos, com resultados positivos de associação com a doença, cujos achados nem sempre foram similares com outras etnias, tais como, em afro-americanos (DIEHL *et al*, 1999; WALKER *et al*, 2000), chineses (ARMITAGE *et al*, 2000), gregos (SAKELLARI *et al*, 2003), de Thai (ANUSAKSATHIEN *et al*, 2003), chilenos (LOPEZ *et al*, 2005), e brasileiros (TREVILATTO *et al*, 2003; CAMPOS *et al*, 2005).

Estudando outro aspecto, Socransky *et al* (2000) avaliaram parâmetros microbiológicos associados com polimorfismo composto IL-1A<sup>+4845</sup> e IL-1B<sup>+3954</sup> (GAP). Nesse estudo, 108 indivíduos em bom estado de saúde foram examinados para determinação de IP, eritema gengival, SS, supuração, PS e NIC. Amostras de placa subgengival de 28 dentes de cada indivíduo foram coletadas, totalizando 2.736 amostras. Avaliaram-se, ainda, amostras de sangue periférico para determinar a presença ou ausência do polimorfismo. Os resultados mostraram que os indivíduos GAP+ tinham quantidades maiores de bactérias subgengivais específicas fortemente associadas à doença periodontal, quando comparados àqueles que não possuem o polimorfismo. São microrganismos pertencentes aos complexos “vermelho” e “laranja” determinados por Socransky *et al* (1998), entre eles: *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, subespécies de *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *C. rectus*, *C. showae*, entre outros, principalmente em bolsas periodontais com profundidade >6mm. Os

dados sugerem que os sujeitos genótipo-positivos têm, mais freqüentemente, altos níveis de espécies do complexo “vermelho” e “laranja” que são conhecidos estar fortemente associados com medidas de inflamação periodontal.

### 2.6.2.2 - Estudos sobre o polimorfismo de outras citocinas

O Quadro 5 discrimina os principais achados de trabalhos realizados por vários autores, em diversas populações, sobre a observação da freqüência dos polimorfismos de outras citocinas, associados à periodontite crônica.

Quadro 5 – Sumário dos principais achados de trabalhos sobre associação entre genótipos de outras citocinas incluídas neste estudo e periodontite crônica (PC)

Autor/Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
<b>Polimorfismo TNF<math>\alpha</math></b>			
Galbraith <i>et al</i> , 1999 Caso-controle	SNP TNF $\alpha$ <sup>-308</sup>	40 pac caucasianos, 35-65 anos (20 pac c/gengivite;20 pac c/ PC -45 suj referência de pop c/ status periodontal desconhecido	O polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$ , na posição – 308, estava elevado no grupo com periodontite avançada. Este estudo ainda demonstrou que a IL1- $\beta$ produzida por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) com periodontite avançada estava mais elevada do que naqueles com gengivite <sup>14</sup> .
Craandijk <i>et al</i> , 2002 Caso-controle	SNPs TNF $\alpha$ <sup>-376,-308, -238,+489</sup>	-90 pac-periodontais: 34 com periodontite severa e 56 com p.moderada -264 suj grupo controle	Os resultados não conseguiram demonstrar associação entre os polimorfismos do TNF- $\alpha$ e a susceptibilidade ou severidade da DP, mesmo quando pacientes fumantes estavam incluídos na análise.
Soga <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	SNPs TNF $\alpha$ <sup>-1031, -863, -857,-308,-238</sup> IL1- $\beta$ <sup>-511,-31,+3953</sup>	128 indivíduos japoneses: -64 pacientes com PC severa (PCS) -64 sujeitos periodontalmente sadios, controles.	Produção de TNF $\alpha$ nos portadores dos alelos TNF $\alpha$ -1031/-863 (desequilíbrio de ligação) ou -857 tendia a ser elevada, e a freqüência dos suj portadores de pelo menos um alelo variante em SNPs TNF $\alpha$ <sup>-1031,-863 ou -857</sup> entre os pac com PCS era significativamente mais alta do que nos suj sadios. Já os SNPs TNF $\alpha$ <sup>-308 e -238</sup> que são majoritariamente encontrados em caucasianos, foram raramente detectados nos indiv japoneses. Também, o alelo 2 e genótipo homozigoto (TT) da IL1- $\beta$ <sup>+3953</sup> , que são referidos estar em associação com DP em caucasianos, não foram encontrados nesta amostra de japoneses. Devido a maior freqüência nos pac periodontais dos polimorfismos SNPs TNF $\alpha$ <sup>-1031,-863 ou -857</sup> do que nos indiv sadios, estes polimorfismos parecem estar associados com PC severa em populações japonesas.
Donati <i>et al</i> , 2005 Caso-controle	SNP TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>	-60 pac caucasianos suecos com PC generalizada severa -39 indiv.period.sadios	Esse polimorfismo não apresentou associação com periodontite crônica severa

continua...

Quadro 5 – Continuação...

Autor/Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
<b>Polimorfismo IL-6</b>			
Trevilatto <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	SNP IL-6 <sup>-174</sup>	-84 indiv. brasileiros caucasianos, > 25 anos, não-fumantes: 24 c/ PC moderada; 24 com PC severa; 36 controles sem periodontite	Os resultados apontaram diferenças nas frequências alélicas e genótípicas entre os grupos controle e com periodontite, demonstrando uma associação entre a presença do polimorfismo e a severidade da doença.
Holla <i>et al</i> , 2004 Caso-controle	SNPs IL-6 <sup>-174(G/C)</sup> , <sup>-572(G/C)</sup> , <sup>-597(G/A)</sup>	-148 pac caucasianos, checos, com PC (média idade: 42.5±7.2) -107 indiv sem DP (média idade: 44.3±8.9)	Resultados apresentaram dif/signif na distribuição do polimorfismo IL-6 <sup>-572(G/C)</sup> entre pac e pop. controle (6,1% versus 19,6%). Não houve dif/significativa para polimorfismos IL-6 <sup>-174,-597</sup> entre ambos os grupos. Concluem, sugerindo que o polimorfismo IL-6 <sup>-572(G/C)</sup> pode ser um fator de proteção assoc com baixa susceptibilidade à periodontite crônica.
<b>Polimorfismo do TGFβ</b>			
Holla <i>et al</i> , 2002 Caso-controle	TGFβ <sup>-988(C/A)</sup> , <sup>-800(G/A)</sup> , <sup>-509(C-T)</sup> códon 10 (L10P) e 25 (R25P) do exon 1	-90 pac caucasianos com PC	Não reportaram diferenças estat/signif na distribuição das frequências alélicas e genótípicas para nenhum dos polimorfismos estudados, entre os grupos teste e controle.
de Souza <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	TGFβ <sub>1</sub> <sup>(C-509T)</sup>	-87 suj brasileiros não-fumantes, caucasianos -grupos: sadio (n=37), com PC moderada (n=24); e severa (n=26)	Observaram diferença significativa na frequência do alelo T entre o grupo com PC severa (57.7%) e os grupos com PC moderada (35.4%) e com saúde (37.8%), e entre as frequências do genótipo TT nos três grupos, respectivamente, de 38.5%, 12.6% e 8.0%, concluindo que este polimorfismo pode ter um pequeno efeito na modulação do processo inflamatório durante a periodontite.
<b>Polimorfismo IFNγ</b>			
Fraser <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	IFN-γR1	-62 pac periodontais -56 controles, sadios	Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências alélicas entre pacientes e controles, sugerindo que este polimorfismo não contribui para susceptibilidade a periodontite; entretanto, foi positiva a associação quando combinado com fumo, suportando um modelo de doença com interação multigene-ambiental para susceptibilidade a DP
<b>Polimorfismo IL-10</b>			
Gonzales <i>et al</i> , 2002 Caso-controle	IL-10 <sup>-597 e -824</sup> , nos alelos A e T	-23 pac com PC e 18 pac c/ period. agressiva. -21 suj c/ saúde period, como grupo controle	Após análise estatística, resultados demonstraram não haver associação entre a presença do polimorfismo da IL-10 e a manifestação clínica da periodontite crônica e agressiva <sup>15</sup> .
Berglundh <i>et al</i> , 2003 Caso-controle	SNP IL-10 <sup>-1087G/A</sup>	-60 pac, caucasianos suecos, 36-74 anos, com PC generalizada severa. -39 indiv com saúde periodontal, 35-78 anos	Pacientes com periodontite crônica generalizada severa tinham PI >50%, analisando-se todos os dentes. Nos resultados, observou-se que a proporção dos indivíduos com polimorfismo na posição -1087 foi significativamente maior nesses pacientes com PCS

continua...

Autor/Ano Desenho do estudo	Genótipo reportado	Sujeitos	Principais achados
Scarel-Caminaga <i>et al</i> , 2004 Caso-controle	SNPs IL-10 <sup>-1087,-819,-592</sup>	-67 pac brasileiros, não-fumantes, com PC - 43 sujeitos controles, periodontalmente sadios	Freqüências dos SNPs -819 e -592 apresentaram diferenças entre grupos PC e controle. O haplótipo ACC foi mais prevalente nos controles e o ATA no PC. Observou-se que o haplótipo ATA aumentava susceptibilidade para PC em mulheres. O haplótipo heterozigoto GCC/ACC foi predominante no grupo controle. Concluíram que SNPs e haplótipos específicos do gene IL-10 estavam associados com susceptibilidade a PC em pacientes brasileiros.

### 2.6.2.2.1 - Estudos sobre o polimorfismo do TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida principalmente por monócitos e macrófagos e suas funções biológicas são similares às da IL-1, embora com menor potência. São importantes mediadores do processo inflamatório, atuando de forma relevante na resposta inata do hospedeiro, bem como na destruição tecidual, particularmente na reabsorção óssea. Os genes TNF situam-se na região classe III do MHC, no cromossomo 6. No cluster TNF podem ser observados polimorfismos referentes a pelo menos 5 microsátélites e 5 SNPs (polimorfismos nucleotídeo simples), cujos principais descritos têm sido nas posições -308 e -238 da região promotora. Esse *locus* TNF na região classe III do MHC tem sido alvo de atenção para estudos de genes candidatos em doenças autoimunes e inflamatórias. Porém, devido ao alto grau de desequilíbrio de ligação dentro do MHC, fica difícil determinar quais genes em um haplótipo são importantes na etiologia de uma doença. O polimorfismo bi-alelico na posição -308 da região promotora do TNF- $\alpha$  tem sido estudado em doenças autoimunes, tais como doença de Graves, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, dermatite herpetiforme e doença gastrohepática. Altos níveis de produção de TNF- $\alpha$  têm sido associados com particulares haplótipos DR3 e DR4 e o alelo TNF2<sup>-308A</sup> está incluído no haplótipo autoimune. Daí, o alelo 2 do TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> tem sido associado com uma proporção 8 vezes maior de atividade transcricional *in vitro* (KORNMAN & Di GIOVINE, 1998). Engebretson *et al* (1999) observaram que as quantidades totais de TNF- $\alpha$ , no FGC, estavam elevadas e foram significativamente correlacionadas com os pacientes genótipos-positivos na *baseline*, o mesmo não acontecendo para aqueles genótipos-negativos. Nas amostras teciduais, entretanto, TNF- $\alpha$  estava abaixo dos níveis de detecção.

Enquanto Galbraith *et al* (1999) verificaram que polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> estava elevado no grupo com periodontite avançada, outros autores não conseguiram mostrar associação entre os polimorfismos do TNF- $\alpha$  e a susceptibilidade ou severidade da DP (CRAANDIJK *et al*, 2002; FOLWACZNY *et al*, 2004; DONATI *et al*, 2005). Já em japoneses, Soga *et al* (2003) observaram que os polimorfismos TNF $\alpha$ <sup>-308</sup> e <sup>-238</sup> que são majoritariamente encontrados em caucasianos, foram raramente detectados nessa população, salientando que, devido à maior frequência nos pacientes periodontais dos polimorfismos SNPs TNF $\alpha$ <sup>-1031,-863</sup> ou <sup>-857</sup> do que nos indivíduos saudáveis, estes polimorfismos parecem estar associados com periodontite crônica severa em populações japonesas.

#### **2.6.2.2.2 - Estudos sobre o polimorfismo da IL-6**

O gene IL-6 humano é incluído no cromossomo 7p21 e compreende 5 exons e 4 introns. A região 5' contém numerosos polimorfismos que diretamente influenciam a expressão da proteína. Recentes trabalhos identificaram a presença de 4 polimorfismos genéticos na região promotora do gene IL-6: -597 G/A, -572 G/C, e -174 G/C, e um quarto *locus* na posição -373. Dados iniciais sugerem que o polimorfismo -174 G/C, que envolve um sítio DNA-associado para transcrição do fator NF-IL-6, pode ser funcional *in vitro* (TERRY *et al*, 2000). Níveis elevados de IL-6 têm sido encontrados no plasma ou no FGC de pacientes com periodontite (KURTIS *et al*, 1999).

Trevilatto *et al* (2003) apontaram diferenças nas frequências alélicas e genóticas entre os grupos controle e com periodontite de indivíduos brasileiros caucasianos, mostrando uma associação entre a presença do alelo1 IL-6<sup>-174G</sup> e a severidade da doença. Já Holla *et al* (2004) estudaram a associação de polimorfismos do gene IL-6 (em posições -597 G/A, -572 G/C e -174 G/C) e periodontite crônica em indivíduos checos caucasianos, assinalando significativa diferença na distribuição dos alelos e genótipos para o polimorfismo IL-6<sup>-572G/C</sup> entre pacientes e população controle; a heterozigotose representou um fator de proteção contra a doença, com 73% de redução do risco. Não encontraram, entretanto, diferença significativa na frequência alélica ou genotípica entre os grupos caso e controle para os polimorfismos IL-6<sup>-597G/A</sup> e IL-6<sup>-174G/C</sup>. Concluíram, sugerindo que o alelo 2 IL-6<sup>-572C</sup> pode ser um dos fatores de proteção associados com baixa susceptibilidade para periodontite crônica.

### **2.6.2.2.3 - Estudo sobre o polimorfismo da IFN- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  é uma citocina imunomodulatória produzida no sítio da inflamação, sendo secretada principalmente por células de origem imune em resposta a agressão inflamatória. A secreção de IFN- $\gamma$  é um aspecto chave de respostas Th1 servindo para promover uma resposta mediada por células dirigida para atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos. Exerce, assim, um papel pivô na defesa contra a infecção pelo que, algum polimorfismo que tenha influência sobre essa secreção pode conferir susceptibilidade, ou proteção, aos indivíduos portadores. Fraser *et al* (2003) estudaram o polimorfismo do gene do receptor 1 da IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R1) em 62 pacientes periodontais e 56 controles periodontalmente sadios. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências alélicas entre pacientes e controles, sugerindo que este polimorfismo não contribui para susceptibilidade a periodontite; entretanto, foi positiva a associação quando combinado com fumo, suportando um modelo de doença com interação multigene-ambiental para susceptibilidade a DP.

### **2.6.2.2.4 - Estudos sobre o polimorfismo da IL-10**

Vários sítios polimórficos na região promotora do gene IL-10 têm sido identificados nas posições -1082 (G  $\rightarrow$  A), -819 (C  $\rightarrow$  T), -592 (C  $\rightarrow$  A) (BIDWELL *et al*, 1999). Anteriormente, foi demonstrado que o alelo 1 -1082\*G estava associado com alta produção dessa citocina, *in vitro*, enquanto o alelo 2 -1082\*A encontrava-se associado com sua baixa produção (TURNER *et al*, 1997). O alelo -1082\*A tem sido apontado como fator de risco para muitas doenças como infecção por vírus Epstein Barr (HELMINEN *et al*, 1999), doença intestinal inflamatória (TAGORE *et al*, 1999), doença esporádica de Alzheimer (LIO *et al*, 2003) e hepatite crônica (ABBAS *et al*, 2003). Estudo recente mostrou que o alelo -1082\*G, associado com alta produção de IL-10, exerce um papel protetor contra a inflamação; isto concorre para aumentar a longevidade nos homens (LIO *et al*, 2002). Também, aqueles três dimorfismos exibem forte desequilíbrio de ligação e aparecem em três preferenciais haplótipos potenciais: GCC (G em posição -1087, C em posição -819, e C em posição -592), ACC e ATA. O haplótipo GCC estava associado com alta produção de IL-10 (TURNER *et al*, 1999). Dado o importante papel regulatório da IL-10 e visto ser possível que o seu polimorfismo genético pode modular os níveis da proteína, isto pode resultar em associação com periodontite crônica.



Enquanto Gonzales *et al* (2002) mostraram não haver uma associação entre a presença do polimorfismo da IL-10<sup>-597</sup> e <sup>-824</sup> e a manifestação clínica da periodontite crônica e agressiva, Berglundh *et al* (2003) verificaram que no polimorfismo IL-10<sup>-1087G/A</sup> a proporção dos sujeitos com genótipo GG foi significativamente maior nos pacientes com periodontite crônica generalizada severa (PCGS) do que nos controles; os não-fumantes portadores do alelo G eram >90% no grupo PCGS, predominando significativamente sobre os controles, daí sugerirem que esse polimorfismo, em sujeitos caucasianos originados do norte da Europa, está associado com periodontite crônica severa. Já Scarel-Caminaga *et al* (2004) estudaram os polimorfismos SNPs IL-10<sup>-1087, -819 e -592</sup> em amostra da população brasileira, etnia heterogênea, não-fumante, composta por 67 pacientes com periodontite crônica (PC) e 43 sujeitos controles. Resultados: as frequências de SNPs -819 e -592 apresentaram diferenças entre grupos PC e controle. O haplótipo ACC mostrou-se mais prevalente no grupo PC enquanto que foi observado que o ATA aumentava a susceptibilidade nas mulheres do grupo PC. Os haplótipos heterozigotos GCC/ACC foram predominantes no grupo controle. Concluíram que SNPs e haplótipos específicos no gene IL-10 estavam associados com susceptibilidade a PC em pacientes brasileiros.

Estudando a susceptibilidade à gengivite de 260 crianças caucasianas (86 controles, 174 pacientes), Dashash *et al* (2005) observaram, em relação ao polimorfismo IL-10<sup>-1082</sup>, que as crianças positivas para o alelo 2 IL-10<sup>-1082\*A</sup> (G/A, A/A) tinham risco significativamente aumentado à gengivite, bem como em relação à severidade da doença, independentemente dos fatores placa ou idade, sugerindo que o alelo -1082\*A pode ser considerado um fator de risco para gengivite. Verificaram, também, que o alelo 1 -1082\*G representou um fator de proteção para a gengivite, naquelas crianças.

#### **2.5.2.2.4 - Estudos sobre o polimorfismo do TGFβ**

O TGF-β<sub>1</sub> é uma citocina multifuncional que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF-α, reduzindo a síntese e liberação de MMPs (metaloproteinases) pelos fibroblastos, além de estimular a produção de TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) podendo, entretanto, agir também como um fator pró-inflamatório, uma vez que atua como um agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e linfócitos do sangue (STEINSVOLL *et al*, 1999; HOLLA *et al*, 2002; De SOUZA *et al*,

2003). Foi descrito um polimorfismo na região promotora do gene do TGF- $\beta_1$ , caracterizado pela troca de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição -509, criando dois alelos diferentes em uma região associada com a regulação negativa da transcrição desse gene (KIM *et al*, 1989; HOBBS *et al*, 1998). Este polimorfismo cria uma seqüência consensual ativadora YY1, que interfere na transcrição desse gene, estando associado a níveis elevados de TGF- $\beta_1$  no plasma (HOBBS *et al*, 1998; GRAINGER *et al*, 1999). Entretanto, o efeito preciso dos alelos T ou C na atividade transcricional deste gene não está claro. Vários são os estudos que indicam uma associação deste polimorfismo com patologias como asma e alergia, promovendo o aumento dos níveis de IgE, osteoporose, pancreatite crônica e o câncer (HOBBS *et al*, 1998; YAMADA *et al*, 2001; PULLEYN *et al*, 2001; FRANCIS-THICKPENNY *et al*, 2001; BENDICHO *et al*, 2005). Em relação à doença periodontal, apesar do TGF- $\beta_1$  ter sido encontrado em elevada concentração em toda a extensão de tecidos periodontais inflamados (STEINSVOLL, HALSTENSEN & SCHENCK, 1999; CEZÁRIO & FIGUEREDO, 2004), sua variação genética parece ter apenas uma pequena influência na modulação do processo inflamatório periodontal, estando fracamente associada à severidade desta doença (HOLLA *et al*, 2002; de SOUZA *et al*, 2003).

### **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

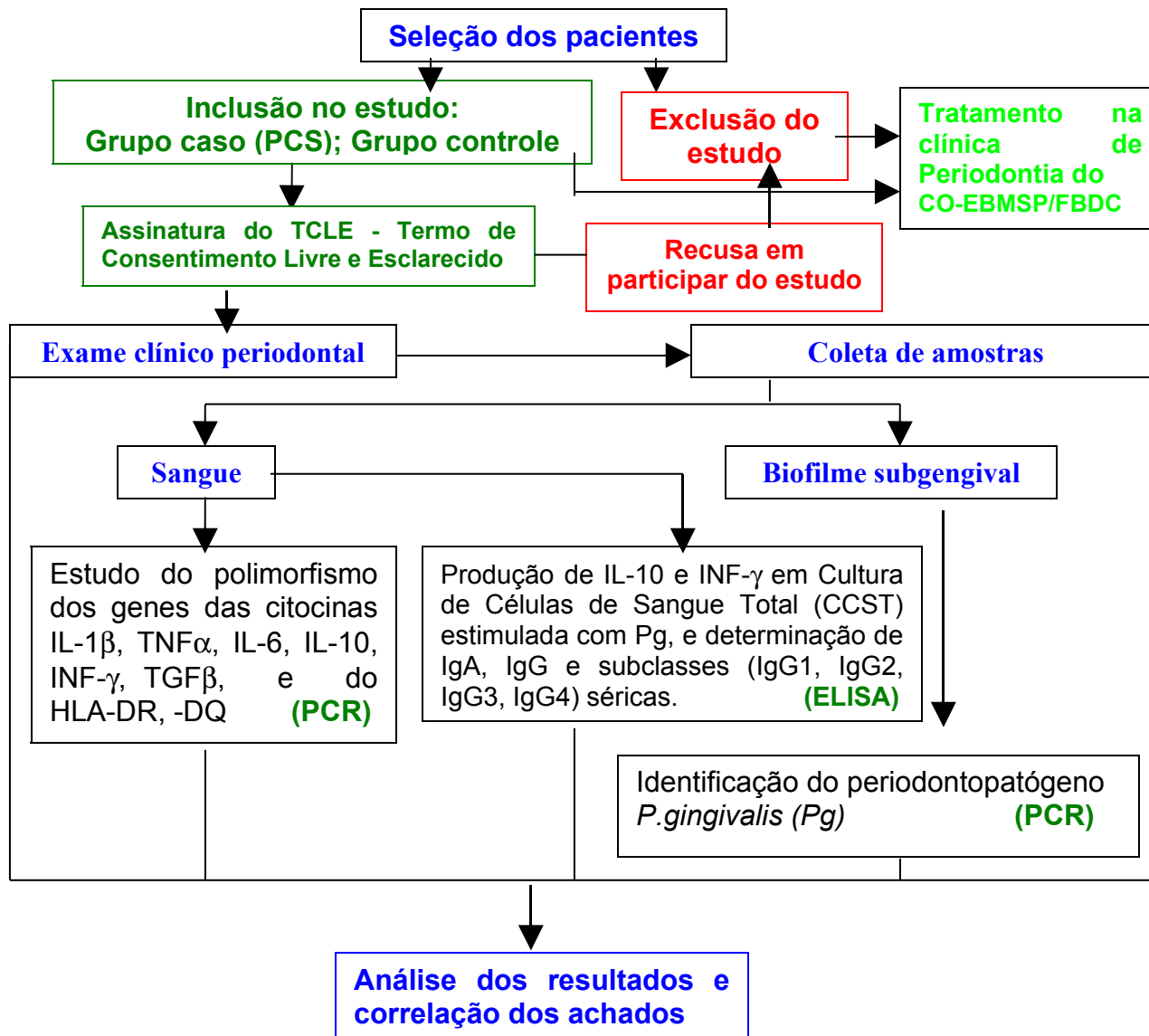
Avaliar a associação entre aspectos clínico, microbiológico, imunológico e genético, de pacientes portadores de doença periodontal crônica severa, residentes em Salvador/BA, visando o delineamento de um perfil individual de risco à doença.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar a presença de *Porphyromonas gingivalis* na amostra estudada.
- Avaliar a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  em Cultura de Células de Sangue Total (CCST) de indivíduos acometidos e não acometidos por periodontite crônica severa, sob estímulo de extrato antigênico bruto de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, e identificar um possível perfil de resposta imune do tipo Th1 ou Th2;
- Avaliar os níveis séricos de IgA, IgG e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-*Porphyromonas gingivalis* desses indivíduos.
- Estudar a associação dos polimorfismos das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TGF $\beta$ , e do HLA de classe II, com a periodontite crônica.
- Avaliar a possível correlação entre as alterações clínicas, a presença de *Porphyromonas gingivalis*, a resposta imune celular e humoral, e os polimorfismos das citocinas e do HLA de classe II, nos indivíduos investigados.

## **4 DESENHO DO ESTUDO**

Este projeto foi desenvolvido em caráter inter-institucional com a colaboração do Curso de Odontologia da EBMSP/FBDC e Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) do ICS/UFBA, tendo obtido a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da FBDC (Parecer Nº 09/2003), e apoio financeiro da FAPESB – Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia (Convênio 230/2003). Para a sua execução, foi observado o seguinte delineamento de estudo.



## 5 PRODUTOS DA TESE

Esta Tese resultou na elaboração de três artigos, escritos de acordo com as normas dos periódicos a que estão sendo submetidos e que são apresentados em seqüência:

Artigo 1 – “Prevalência de *Porphyromonas gingivalis*, e leucometria, em mestiços brasileiros com periodontite crônica”

- Revista PERIODONTIA da Sociedade Brasileira de Periodontologia (SOBRAPE)

Artigo 2 – “Infection and cellular and humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis”

- Journal of Periodontology of the American Academy of Periodontology (AAP)

Artigo 3– “Polymorphism of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup>, IL-6<sup>-174</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>códons 10 e 25</sup>,

IFN- $\gamma$ <sup>+874</sup> and IL-10<sup>-1082, -819, -592</sup>, and of HLA-DR, -DQ, in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis”

- Journal of Clinical Periodontology – Blackwell Munksgaard

# ARTIGO 1

**Prevalência de *Porphyromonas gingivalis*, e leucometria, em mestiços brasileiros com periodontite crônica**

***Porphyromonas gingivalis* prevalence and leukometry in Brazilian  
persons of mixed race with chronic periodontitis**

Urbino da Rocha Tunes<sup>2,3</sup>, Paulo José Lima Juiz<sup>2,3</sup>, Livia Souza Pugliese<sup>2,3</sup>, Cláudio  
Brandão<sup>3</sup>, Roberta Santos Tunes<sup>2,4</sup>, Songeli Menezes Freire<sup>1,2,3</sup>,  
Denise Carneiro Lemaire<sup>1,2,3</sup>.

1. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Universidade Federal da Bahia (UFBA) 2. Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC) / Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) - Curso de Odontologia 3. Programa de Pós-graduação em Imunologia (UFBA) 4. Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

1. Immunology and molecular biology Lab (LABIMUNO) – Federal University of Bahia (FUBA), BA, Brazil; 2. Bahiana Foundation of Cientific Development (BFCD) – Dental School / Bahiana Medicine and Public Healthy School (BMPHS), BA, Brazil; 3. Immunology posgraduation Program – Federal University of Bahia (FUBA), BA, Brazil; 4. Periodontology posgraduation Program, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, SP, Brazil.

**RESUMO**

**Objetivos:** Sendo a periodontite uma doença multifatorial que se inicia e é mantida pela agressão das bactérias periodontopatogênicas, este trabalho objetivou identificar a presença de *P.gingivalis* (*Pg*) no biofilme subgingival em indivíduos com periodontite crônica severa, bem como avaliar o leucograma respectivo. **Material e Métodos:** Oitenta e quatro indivíduos não-fumantes foram selecionados para o estudo: 43 pacientes com periodontite crônica severa (grupo caso - PCS) e 41 pacientes sem periodontite (grupo controle - NP). Parâmetros clínicos periodontais e o leucograma foram avaliados. Amostras do biofilme subgingival foram coletadas para detecção de *Pg* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a análise estatística foram usados os testes t-student e Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). **Resultados:** Foi detectada a presença de *Pg* no biofilme subgingival de 29 pacientes (67,4%) do grupo PCS, não sendo observado este periodontopatógeno em nenhum dos indivíduos do grupo NP. O grupo PCS apresentou significativamente valores mais elevados do que o NP no número de leucócitos totais e no número absoluto de neutrófilos. **Conclusões:** Os resultados mostraram que na maioria dos pacientes do grupo

PCS foi detectada a presença de *Porphyromonas gingivalis* e que esta infecção bacteriana pode refletir-se na leucometria.

**Unitermos:** periodontite crônica; *Porphyromonas gingivalis*; leucograma.

## INTRODUÇÃO

Doenças periodontais (DPs) são infecções das mais comuns em humanos e que representam importante problema bucal, com possíveis repercussões sistêmicas, principalmente para indivíduos adultos. São de natureza multifatorial, incluindo um amplo espectro de respostas inflamatórias e destrutivas a bactérias componentes do biofilme dental, no hospedeiro susceptível. Enquanto a gengivite, usualmente, está associada a um inadequado controle desse biofilme, a sua progressão para periodontite é influenciada por vários fatores modificadores da resposta do hospedeiro, incluindo os ambientais, condições sistêmicas, e genéticos. Deste modo, o risco para DP não é uniforme em todos os indivíduos, embora esta doença esteja presente na maioria das populações (LÖE *et al*, 1986). Encontra-se estabelecido que a agressão microbiana aos tecidos periodontais, determinada principalmente por bactérias gram-negativas específicas, ditas periodontopatogênicas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* (AAP, 1996; SOCRANSKY *et al*, 1998; O'BRIEN-SIMPSON *et al*, 2004), seja essencial para o início e progressão da DP. Desses periodontopatógenos, *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais componentes do complexo “vermelho” de Socransky *et al* (1998), tem sido associada com o início e progressão da DP, principalmente em indivíduos adultos, sendo encontrada na maioria dos sítios com alta atividade de doença na periodontite crônica (CONDORELLI *et al*, 1998).

Embora os métodos de cultura sejam considerados *gold standard* dentre as técnicas microbiológicas para detecção de periodontopatógenos em amostras do biofilme subgengival, e os únicos capazes de permitir a realização do antibiograma, a *reação em cadeia da polimerase* (PCR) oferece a grande vantagem de detectar um microrganismo alvo em baixas concentrações, com alta especificidade (SANZ *et al*, 2004). A Tabela 1 sumariza os principais achados sobre infecção por *Porphyromonas gingivalis* em pacientes com periodontite crônica em diversas regiões geográficas.



Por outro lado, estudos na literatura avaliando aspectos hematimétricos em indivíduos com periodontite são escassos. Portanto, identificar a presença daquela bactéria em uma amostra populacional com característica étnica definida e utilizando uma técnica com alta sensibilidade e especificidade pode contribuir para maior compreensão da etiologia bacteriana na periodontite crônica; a par disto, avaliam-se possíveis alterações quanto a leucometria dos indivíduos em estudo. Este projeto obteve ajuda financeira da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia/FAPESB (Convênio 230/2003).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Seleção da amostra***

Foram selecionados 84 indivíduos para o estudo. O grupo caso (PCS) incluiu 43 pacientes com periodontite crônica severa; o grupo controle (NP), 41 indivíduos sem periodontite. Todos classificados quanto à etnia como mestiços, de ambos os sexos, faixa etária 30-50 anos, demandados ao Curso de Odontologia da EBMSP/FBDC. Foram observados os seguintes critérios de exclusão: menos do que 10 dentes, hábito de fumar, doenças sistêmicas, gravidez, menopausa, reposição hormonal, uso de contraceptivo hormonal e de antibióticos nos seis meses anteriores ao exame e coleta sanguínea. A contagem de leucócitos foi realizada em sistema automatizado Sysmex SF3000. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FBDC (Parecer nº 09/2003) e os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

### ***Parâmetros clínicos***

Um único examinador calibrado (Kappa = 0,81), avaliou: índice de placa visível (IPV); índice de sangramento gengival (ISG); índice de sangramento à sondagem (ISS); profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC), de acordo com o manual de Procedimento Operacional Padrão (POP) do Labimuno. Os critérios para inclusão no grupo caso (PCS) foram estabelecidos de acordo com Lopez *et al* (2002): presença de pelo menos 4 sítios em diferentes dentes com NIC  $\geq 3$ mm, PS  $\geq 4$ mm e com sangramento à sondagem. Neste estudo, somente pacientes com severo estágio da doença (presença de pelo menos um sítio com NIC  $\geq 5$ mm) participaram da investigação. O caráter crônico da doença foi baseado nos critérios da Academia Americana de Periodontologia (AAP, 1999).

Nenhum dos sujeitos tinha recebido tratamento periodontal antes do exame clínico e coleta de sangue. O grupo controle (NP) foi constituído pelos pacientes que, ao exame clínico periodontal, foram classificados como livres de periodontite, com PS  $\leq$ 3mm e NIC  $\leq$ 2mm (LOPEZ *et al*, 2002).

### ***Coleta do material***

O biofilme bacteriano supragengival foi removido por meio de profilaxia com gaze estéril, ao redor dos dentes; sítios amostrais foram isolados e secos. Amostras da microbiota subgengival dos quatro sítios de maior profundidade de cada paciente foram obtidas com a introdução subgengival, por 10seg, de uma ponta de papel endodôntico # 30, esterilizada, sendo imediatamente colocadas em meio de transporte (PBS) e armazenadas a -20°C, até a realização da PCR.

### ***Processamento do material e identificação bacteriana***

Foram realizados segundo Ashimoto *et al* (1996), utilizando os *primers* específicos (5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3' / 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3'), fornecidos pela Life Technologies do Brasil Ltda-SP, para identificação da *Porphyromonas gingivalis*; como controle positivo, foi usada amostra da cepa ATCC 33277. Para a extração do DNA, a amostra foi aquecida (100°C) por 10min, sendo posteriormente colocada em gelo por 10seg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para a detecção de Pg por PCR. Para as reações de amplificação da PCR foi usado um termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) e foram realizadas com 5 $\mu$ l de DNA em um volume de 45 $\mu$ l de mix contendo: tampão Taq 10X, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (2,5 mM), *primers* específicos para Pg e Taq 5000UI/mL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e água *MilliQ*. O processo da PCR incluiu uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 2min, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento dos *primers* a 60°C por 1min e extensão a 72°C por 1min, finalizando com passo de 72°C por 2min. Os produtos amplificados de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, contendo 10 $\mu$ l de brometo de etídio, e a corrida eletroforética foi feita entre 140 e 150 volts com 40mA no início da migração. Posteriormente, o gel foi visualizado por exposição à luz ultravioleta (300nm), sendo fotografado com auxílio de um transluminador TCX-20.M (Vilber Lourmat, França).

### ***Análise estatística***

Foram usados os testes paramétrico t-student e não paramétrico de Mann-Whitney para a análise estatística dos dados com auxílio do software Graphpad Prism 4.0.

### **RESULTADOS**

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 *et al* (1965), conforme a Tabela 2, que mostra também os dados demográficos, clínicos e laboratoriais nos dois grupos. A distribuição por sexo é semelhante em ambos os grupos bem como a média do número de dentes por indivíduo em cada grupo ( $p=1,00$ ), demonstrando adequada composição para o estudo.

A análise estatística dos dados mostra que existiram diferenças significativas quanto à média dos valores do IPV, ISG e ISS entre o grupo PCS e NP, observando-se, assim, que os pacientes do grupo PCS apresentaram pronunciados sinais inflamatórios e maior exposição ao desafio microbiano do que os do grupo NP. Apesar da contagem de leucócitos estar dentro dos limites normais, o grupo PCS apresentou significativamente valores mais elevados do que o NP no número de leucócitos totais e no número absoluto de neutrófilos. Na maioria (67,4%) dos pacientes do grupo PCS foi detectada a presença de *Porphyromonas gingivalis*, não sendo este periodontopatógeno observado nos indivíduos do grupo NP.

### **DISCUSSÃO**

A população brasileira apresenta uma grande diversidade genética. A amostra estudada representa um grupo antropogenético de mestiços, resultante da miscigenação entre três elementos étnicos: caucasóides (brancos), negros e ameríndios. A avaliação estatística dos achados clínicos demonstrou que ambos os grupos em estudo estavam bem padronizados quanto à idade e ao número de dentes presentes na boca. As diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quando da análise do ISG, ISS e IPV, ratificaram a existência de um maior desafio microbiano nos pacientes com PCS e, conseqüentemente, sinais clínico-inflamatórios mais exacerbados, padrão usual dessa forma comum de DP.

Os periodontopatógenos podem ser encontrados no biofilme dental de indivíduos periodontalmente saudáveis e, muito especialmente, de pacientes com DP, embora com diferentes prevalências (GRIFFEN *et al*, 1998; vanWINKELHOFF *et al*, 2002). Ademais, a presença de determinados microrganismos em bolsas profundas pode apresentar, verdadeiramente, um risco maior de perda de inserção (RAMS *et al*, 1996). A patogenicidade da *Porphyromonas gingivalis* é representada por um grande número de fatores de virulência capazes de induzir intensa destruição tecidual (O'BRIEN-SIMPSON *et al*, 2004), podendo funcionar como um fator de ruptura da homeostasia. No presente estudo, foi detectada a presença de *P.gingivalis* em 29 pacientes (67,4%) dos 43 do grupo PCS. Este achado é consistente com muitos outros estudos, cujas prevalências são aproximadas, em diversas regiões geográficas (TAKAMATSU *et al*, 1999; SANZ *et al*, 2004; LOPEZ *et al*, 2004; CORTELLI *et al*, 2005) e conforme visto na Tabela 1. Nos estudos de Ximénez-Fyvie *et al* (2000) e de Rudney *et al* (2003), a presença de *P.gingivalis* não foi observada em nenhum dos indivíduos controles. Isto corrobora com o presente trabalho em que esse periodontopatógeno não foi, também, detectado no grupo controle NP. Esta ausência de *P.gingivalis* em indivíduos periodontalmente saudáveis também constatada por Mayanagi *et al* (2004), pode evidenciar uma estreita associação dessa espécie com a periodontite, como previamente reportado (TAKEUCHI *et al*, 2001; COLOMBO *et al*, 2002; KUMAR *et al*, 2003).

Nos indivíduos incluídos na pesquisa, observou-se que o número total de leucócitos e o número absoluto de neutrófilos foram estatisticamente superiores nos indivíduos com periodontite crônica severa em comparação ao grupo de voluntários não acometidos pela doença. Ogawa *et al* (1999) realizaram estudo epidemiológico, em japoneses, associando DP e contagem de leucócitos, reportando que pacientes com DP severa tenderiam, significativamente, a ter elevados números totais de leucócitos, fato também verificado por Takami *et al* (2003). Enquanto Christian *et al* (2002) observaram redução do número absoluto de leucócitos, número absoluto de neutrófilos e número de plaquetas após terapia periodontal não cirúrgica em indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada, Fokkema *et al* (2003), em indivíduos com periodontite crônica, observaram redução do número total de leucócitos, números absolutos de linfócitos e eosinófilos e uma tendência à redução do número de neutrófilos e basófilos após tratamento da doença. No entanto, em

um estudo anterior Fokkema *et al* (2002) não observaram diferenças entre os valores de leucograma de indivíduos com e sem periodontite crônica.

Os resultados observados no presente trabalho estão de acordo com a hipótese sugerida por Bainbridge & Darveau (2001) de que um periodonto clinicamente sadio é mantido por uma resposta imune inata altamente orquestrada que protege o hospedeiro contra a infecção. Esses autores propuseram que *P. gingivalis* possui um papel na ruptura desse equilíbrio dinâmico entre o hospedeiro e a microbiota e que isto interfere com a habilidade do hospedeiro em recrutar neutrófilos para os sítios infectados por inibir a expressão de IL-8 de células epiteliais expostas ao seu LPS. Nos achados deste trabalho, a ausência de *P. gingivalis* nos indivíduos do grupo controle NP corrobora com a assertiva dessa hipótese. Já as diferenças na leucometria dos pacientes do grupo PCS em relação ao NP podem evidenciar as peculiaridades da resposta inflamatória associada à infecção bacteriana.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostram que na maioria dos pacientes do grupo PCS foi detectada a presença de *Porphyromonas gingivalis* e que esta infecção bacteriana pode refletir-se na leucometria.

## ABSTRACT

**Objectives:** The role of specific bacterial species, especially *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), in the initiation and/or progression of destructive forms of human periodontal diseases has been extensively reviewed. Then, the purpose of this study was to detect the presence of *Pg* from patients with advanced periodontitis, besides the valuation of their leucograms.

**Material and Methods:** Subgingival plaque samples were collected from 43 patients with advanced periodontitis (test group – TG) and 41 periodontal healthy individuals (control group – CG), and were analyzed for the presence of *Pg* by polymerase chain reaction (PCR). Periodontal clinical parameters were collected, while the leucograms were obtained from whole blood samples. Statistical analysis was assessed by the T-student and Mann-Whitney tests, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. **Results:** *Pg* was detected in the subgingival biofilm of 29 patients (67,4%) from the TG, whereas it wasn't observed in any of the periodontal healthy patients (CG). The TG presented greater absolute numbers of total leukocytes and neutrophils compared to the CT. These results suggest that *Pg* was

present in the majority of the periodontal patients, and that this bacterial infection could influence the leukocyte count.

**Uniterms:** Chronic periodontitis; *Porphyromonas gingivalis* ; leucogram.

## **Tabelas**

Tabela 1–Sumário de achados sobre prevalência de *P.gingivalis* em diversas regiões geográficas.

---

Origem dos Autores grupos	Prevalência de Pg
------------------------------	-------------------

estudados		
Japão	Takamatsu <i>et al</i> , 1999	65,4%
	Amano <i>et al</i> , 2000	87,1%
	Nozaki <i>et al</i> , 2001	80%
	Takeuchi <i>et al</i> , 2001	95,3%
	Mayanagi <i>et al</i> , 2004	70%
Coréia	Choi <i>et al</i> , 2000	96%
Taiwan	Yang <i>et al</i> , 2004	85,7%
Reino Unido	Darby <i>et al</i> , 2000	54,5%
União	Doungudomdacha <i>et al</i> , 2001	93,9%
Espanha	Sanz <i>et al</i> , 2000	64,5%
Holanda	Sanz <i>et al</i> , 2000	36,7%
Chile	Lopez <i>et al</i> , 2004	75%
USA	Ashimoto <i>et al</i> , 1996	70%
	Umeda <i>et al</i> , 1998	
	• Caucasianos	15,4%
	• Afro-americanos	0%
	• Asiáticos	41,2%
	• Hispânicos	42,9%
	Griffen <i>et al</i> , 1999	79%
	Ximénez-Fyvie <i>et al</i> , 2000	50%
	Rudney <i>et al</i> , 2003	52%
	Lotufo <i>et al</i> , 1994	53%
Brasil	Colombo <i>et al</i> , 2002	60%
	Avila-Campos & Velásquez-Meléndez, 2002	78%
	Cortelli <i>et al</i> , 2005	68%

Tabela 2: Gênero, etnia, idade, dados clínicos e laboratoriais dos grupos caso (PCS) e controle (NP)

Dados	PCS		NP	
	(n = 43)		(n = 41)	
Gênero	n	%	n	%
Feminino	25	58,14	24	58,54
Masculino	18	41,86	17	41,46
Grupo Étnico				



Mulato claro (38,10%)	16	37,20	16	39,02
Mulato médio (51,19%)	21	48,84	22	53,66
Mulato escuro (10,71%)	6	13,96	3	7,32
Detecção de Pg	29	67,40	00	0,00
	Média ± DP			
Idade (anos)	38.72±5.91		36.53 ± 5.35	
Nº dentes presentes	23 ± 6		25 ±5	
IPV (%)	79,85 ±21,73		60,63 ±17,76†*	
ISG (%)	13,73 ±7,98		5,99 ±3,36‡*	
ISS (%)	35.91±20.50		3.93± 2.91‡**	
PS (mm)	7 ±1		2 ±1	
NIC (mm)	8 ±2		1±1	
	<i>Nº (x10<sup>3</sup>/µL) de células (Média ± DP)</i>			
Leucócitos totais	7,03 ± 1,89		5,62 ± 1,26 †*	
Monócitos	0,49 ± 0,20		0,38 ± 0,14	
Linfócitos	2,12 ± 0,50		1,93 ± 0,46	
Neutrófilos	4,22 ± 1,38		3,12 ± 1,03 †*	
Eosinófilos	0,18 ± 0,11		0,18 ± 0,10	
Basófilos	0,03 ± 0,02		0,03 ± 0,01	

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; † t-student; ‡ Mann-Whitney. Valores dos RANKs do teste Mann-Whitney para indivíduos PCS e NP, respectivamente: 19,94 e 15,94 para ISG; 25,79 e 9,76 para ISS. IPV (índice de placa visível); ISG (índice de sangramento gengival); ISS (índice de sangramento à sondagem); PS (profundidade de sondagem); NIC (nível de inserção clínica).

# Referências

## bibliográficas

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of Porphyromonas gingivalis fimA and periodontal healthy status. J Dental Res 2000; 79:1664-1668.
2. American Academy of Periodontology. Consensus Report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996; 1: 926-32.
3. American Academy of Periodontology. Consensus Report: Chronic Periodontitis. Ann Periodontol 1999; 4:38-39.
4. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996; 11:266-273.
5. Avila-Campos MI & Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and health subjects in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2002; 44:1-5.
6. Bainbridge BW, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor for the innate host defense system. Acta Odontol Scand 2001; 59:131-38.

7. Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-base approach. *J Periodontol* 2000; 71:1387-1394.
8. Christian C, Dietrich T, Hagewald S, Bernimoulin J-P. White blood cell count in generalized aggressive periodontitis after non-surgical therapy. *J Clin Periodontol* 2002; 29:201-206.
9. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Sarto R, Rosalen WJ, Mendes MC et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73:360-369.
10. Condorelli F, Scalia G, Cali G, Rosseti B, Nicoletti G, Bue AM. Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2322-2325.
11. Cortelli Jr, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32:860-866.
12. Darby IB, Hodge PI, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol* 2000; 27:427-424.
13. Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CWI. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol* 2001; 28:437-445.
14. Fokkema SJ, Loss BG, Slegte C, Burger W, Piscaer M, Ijzerman Y, van der Velden U. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1091-96.
15. Fokkema SJ, Loss BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 2002; 127:374-379.
16. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger MI, Leyes EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiology* 1998; 36:3239-3242.
17. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger MI, Leyes EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82(5):338-344.
18. Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. 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* 1986; 13:431-440.
19. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res* 2002; 81:58-63.
20. Lopez NJ, Socransky SS, da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75:717-725.
21. Lotufo R, Flynn J, Chen C, Slots J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9(3):154-160.
22. Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:379-385.

23. Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamura M, Hirano H, Kohyama A, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y, Murakami S, Okada H. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application. *J Periodontol* 2001; 72:1228-1235.
24. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigen of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol* 2000 2004; 35:101-134.
25. Ogawa Y, Imaki M, Yosida Y, Tanada S. Epidemiological study on association of periodontal disease and total and differential leukocyte counts. *Jpn J Hyg* 1999; 53:596-600.
26. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol* 1996; 23(4):346-354.
27. Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 2003; 38:465-470.
28. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1034-1047.
29. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dilemijn-Kippuw N, Simón R, Winkel EG. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Euro J Oral Sci* 2000; 108:383-392.
30. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RI Jr. Microbial Complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
31. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999; 70:574-580.
32. Takami Y, Nakagaki H, Morita I, Tsuboi S, Takami S, Suzuki N, Niwa H, Ogura Y. Blood test values and Community Periodontal Index Scores in medical checkup recipients. *J Periodontol* 2003; 74:1778-1784.
33. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema Socranskii*, *Treponema Denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001; 72:1354-1363.
34. Umeda M, Chen C, Bakkeer I, Contreras A, Morrison JI, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 1998; 69:1111-1118.
35. vanWinkelhoff AJ, Loss BG, van der Reijen WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.
36. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648-657.
37. Yang H-W, Huang Y-F, Chou M-Y. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75:1077-1083.



## ARTIGO 2

### **Infection and cellular and humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis**

TUNES UR,<sup>2,3</sup> PUGLIESE LS,<sup>2,3</sup> JUIZ PJL,<sup>3</sup> BENDICHO MT,<sup>1,2,3</sup> MEYER R,<sup>1,3</sup>

LEMAIRE DC,<sup>1,2,3</sup> FREIRE SM,<sup>1,2,3</sup>.

1. Immunology and Molecular Biology Laboratory (LABIMUNO) – Federal University of Bahia (Universidade Federal da Bahia - UFBA) 2. Bahian Scientific Development Foundation (Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências - FBDC) / Bahian School of Medicine and Public Health (Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMS) – Dentistry Course 3. Post-Graduation Immunology Program (UFBA).

Periodontitis is a multifactorial disease that begins and is maintained by the aggression of periodontopathogenic bacteria in the subgingival dental biofilm, whose form of clinical

manifestation is dependent on the type of immune-inflammatory response caused by the complex pathogen-host interaction.

**Aims:** In individuals with severe chronic periodontitis, assess the presence of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) as well as the production of reactive seric antibodies IgA and IgG (total and sub-classes) and of IL-10 and IFN- $\gamma$  in whole blood cell cultures (WBCC) stimulated with an extract of this bacterium.

**Methods:** Eighty-four non-smoker volunteers were selected for the study: 43 patients with severe chronic periodontitis (SCP) comprised the case group and 41 individuals without periodontitis (NP), the control group. Periodontal clinical parameters were assessed and subgingival biofilm samples were collected to detect *P.gingivalis*, using the polymerase chain reaction technique (PCR). Of these volunteers, taking into account the respective leukograms, WBCC was performed with blood samples of 35 subjects, 18 from the SCP group and 17 from the NP group, stimulated with *P.gingivalis* bacterial extract. The cytokine concentrations in the supernatants and of the seric immunoglobulins were determined using the ELISA test. The t-student, Man-Whitney and Spearman Correlation tests were applied for statistical analysis of the data ( $p \leq 0.05$ ).

**Results:** The presence of *P.gingivalis* was detected in the subgingival biofilm of 29 patients (67.4%) of the SCP group, and this periodontopathogen was not observed in any individuals of the NP Group. In the sample for WBCC, *P.gingivalis* was detected in 66.7% (12/18) of the patients in the SCP group. The tested antigens induced high IL-10 concentrations, especially *P.gingivalis*, and low INF- $\gamma$  concentrations. WBCC stimulated with *E.coli* LPS and *P.gingivalis* extract from the SCP group induced greater IL-10 production than that of the NP group NP ( $p \leq 0.05$ ). Furthermore, the seric levels of IgG, IgG1 and IgG4 ( $p \leq 0.001$ ) and IgG2 ( $p \leq 0.05$ ) reactive to *P.gingivalis* were significantly higher in the SCP group in comparison with the NP Group.

**Conclusions:** the results showed that the presence of *Porphyromonas gingivalis* was detected in the majority of patients in the SCP group. There was high production of IL-10 and low production of IFN- $\gamma$  in the WBCC of these patients, under stimulation with raw *P.gingivalis* extract, and high production of total *anti-P.gingivalis* IgG was observed, with predominance of the sub-type IgG4, in the SCP patients than in the NP individuals,

suggesting that this periodontopathogen may deviate the immune response to a Th2 profile.

**Key Words:** chronic periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; interleukine-10; interferon-gama; immunoglobulin; IgG.

Periodontal diseases (PDs) are the commonest infections in humans and those that represent an important oral problem, with possible systemic repercussions, particularly in adult individuals. They are of a multifactorial nature, including a broad spectrum of inflammatory and destructive responses to dental biofilm bacterial components in the susceptible host. While gingivitis is usually associated with inadequate control of this biofilm, its progression to periodontitis is influenced by several of the host's response modifier factors, including environmental, systemic and genetic conditions. Therefore, the risk for PD is not uniform in all individuals, although this disease is present in the majority of populations.<sup>1</sup> Microbial aggression to the periodontal tissues, mainly determined by specific gram-negative bacteria, said to be periodontopathogenic, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythensis* and *Treponema denticola*, is essential for the onset and progression of PD.<sup>2-4</sup> This microbial challenge in itself, however, is not sufficient to determine the development of the disease in a destructive manner, and the deleterious effects of the immune response are also pointed out as determinants of periodontal injury.<sup>5</sup> Of these periodontopathogens, *Porphyromonas gingivalis*, one of the main components of the "red" complex of Socransky *et al* (1998),<sup>3</sup> has been associated with the onset and progression of PD, mainly in adult individuals, and is found in the majority of sites with high disease activity in chronic periodontitis.<sup>6</sup> In spite of intensive studies over the past few years, the role played by the cytokines in periodontitis has not yet been completely explained. Auxiliary T cells (Th) can be classified in two different groups, Th1 or Th2, in accordance with the profile of the cytokines produced by them, the Th2 group characteristically being the producer of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10 and the Th1 group, characteristically being the producer of IFN- $\gamma$ .<sup>7-9</sup> Among these cytokines, IFN- $\gamma$  and IL-10 play an important role in the immunoregulation of the infectious process.<sup>10,11</sup> Thus, the study of the production of these cytokines in an *in vitro* model in



which Whole Blood Cell Culture (WBCC) of patients with chronic periodontitis was stimulated with *P.gingivalis* extract, constitutes a contribution to knowledge of the immunoregulation mechanism of this disease. With regard to the humoral immune response in humans, high levels of seric anti-*P. gingivalis* IgG have been found in individuals with periodontitis<sup>12,13</sup> and there would appear to be a direct relationship between the seric levels of anti-*P.gingivalis* IgG and subgingival colonization by this bacterium.<sup>14</sup> This project obtained financial assistance from the Bahia State Research Support Foundation / FAPESB) (Agreement 230/2003).

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Sample Selection***

Eighty-four volunteers of both genders were selected for the study. The case group (SCP) included 43 patients with severe chronic periodontitis; the control group (NP) comprised 41 individuals without periodontitis. All were ethnically classified as being of mixed race, according to Krieger *et al* (1965)<sup>15</sup>, age range 30-50 years, referred to the EBMSP/FBDC Dentistry Course. The following exclusion criteria were observed: having fewer than 10 teeth, smoking habit, systemic diseases, pregnancy, menopause, hormone replacement, use of hormone contraceptive, antibiotics in the last six months or antinflammatory medication in the ten days before blood collection, and abnormal leukocyte counts. Leukocyte counts were performed in an automated Sysmex SF3000 system. In view of these exclusion criteria, the material collected from 18 patients in Group SCP and 17 from the NP group was analyzed for WBCC. The project was approved by the Research Ethics Committee of FBDC (Report n° 09/2003) and the volunteers signed a term of free informed consent to participate in the research.

### ***Clinical Parameters***

A single calibrated examiner (Kappa = 0.81) assessed the following: visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing index (BPI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), in accordance with the Procedure Operational Model of Labimuno. The criteria for inclusion in the case Group (SCP) were established in accordance with Lopez *et al* (2002)<sup>16</sup>: presence of at least 4 sites in different teeth with CAL  $\geq$ 3mm, PD  $\geq$ 4mm and with bleeding on probing. In this study, only

patients with a severe stage of disease (presence of at least one site with CAL  $\geq$ 5mm) participated in the investigation. The chronic nature of the disease was based on the American Periodontology Academy criteria.<sup>17</sup> None of the subjects had received periodontal treatment before the clinical exam and blood collection. The control group (NP) was comprised of individuals who, on clinical periodontal exam, were classified as free of periodontitis, with PD $\leq$ 3mm and CAL $\leq$ 2mm.<sup>16</sup>

### ***Bacterial collection and identification***

The supragingival bacterial biofilm was removed from around the teeth by prophylaxis with sterile gauze. Subgingival microbiota samples were obtained by subgingival introduction of a sterilized endontic paper tip #30 for 10sec, in the 4 deepest probing depth sites of each patient, and they were immediately placed in the transport medium (PBS) and stored at -20°C, until the polymerase chain reaction was performed (PCR). To identify *Porphyromonas gingivalis* (593 pb) specific primers were used (5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' / 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'),<sup>18</sup> supplied by Life Technologies do Brasil Ltda-SP.

### ***Bacterial Extract***

For later cultivation, activation of the *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 was done, stored at -70°C, in Brucella broth (BBS) supplemented with yeast extract, 0.5% hemin, 0.1% menadione and L-cysteine. Incubation was done in an anaerobiosis jar at 37°C for 5 days in an anaerobic environment (Anaerobac, PROBAC). Seeding was done on agar blood plates supplemented with hemin and menadione (Anaerinsol-S, PROBAC). A sample of the colony incubated for 48h was re-incubated for a further 48h in 50mL of BBS and then transferred to 500mL of BBS for 96h. Confirmation of culture purity was done by Gram staining and anaerobiosis tests. Three centrifugation (10.000xg, 30min, 10°C) and washing cycles were done with sterile PBS (0.15M, pH 7.4) and the bacterial sediment was re-suspended in 4mL of PBS with 5mL/g of protease inhibitor (P8465, SIGMA). For antigenic extract production, the bacterial disruption was processed in an ultrasound ice bath (Ultrasonic Processor - 60Hz) in 10 cycles of 1min with 1-min intervals between them, and another centrifugation (13.000xg, 30min, 10°C) was done. After filtration

(PVDF 0.22 $\mu$ m, MILLIPORE), aliquots of the supernatants were stored at -20°C. Protein dosing of the bacterial extract was done by the modified Lowry method (BIO-RAD).

### ***Whole Blood Cell Culture (WBCC)***

Specific stimulations were done with soluble Pg extract at a concentration of 4,0 $\mu$ g per milliliter of heparinized blood, while *E. coli* LPS (5.0 $\mu$ g /mL) and PWM (2.5 $\mu$ g/mL) were used as non-specific stimuli. Optimum concentrations were determined in previous experiments. To control basal cytokine concentrations, a blood sample was incubated under the same conditions, but without stimulus (SE). The cell culture plates were incubated at 37°C for 48h in a 5% CO<sub>2</sub> environment. The supernatants were obtained by centrifugation (4min, 500xg) and aliquots were stored at -20°C until ELISA was performed.

### ***Cytokine and immunoglobulin determinations***

Concentrations of IFN- $\gamma$  and IL-10 in the TBCC supernatants were determined in accordance with the manufacturers' instructions with commercially available ELISA kits (DuoSet, R&D SYSTEMS) with the respective sensitivities of 62pg/mL and 16pg/mL. Cytokine concentration data were transformed in IL-10:IFN- $\gamma$  proportion for each subject. To determine the total IgA and IgG levels and sub-classes reactive to Pg, 10 $\mu$ g/mL of soluble *P.gingivalis* extract were adsorbed to a polystyrene microtitration plate (Costar, Corning, NY, USA) at 4°C overnight. After blockage, the serum was diluted in PBS containing 0.05% BSA and then incubated at 37°C for 1h. The conjugates used in the reaction were incubated with goat immunoglobulin human anti-IgA conjugated with peroxidase (Bethyl A-80-102P) or rabbit immunoglobulin human anti-IgG conjugated to peroxidase (Sigma A-8792). For the IgG sub-classes the reactions were done with monoclonal rat antibodies anti-IgG1, -IgG2, -IgG3 or -IgG4, followed by incubation of the plates with goat immunoglobulin rat anti-IgG conjugated with biotin and afterwards, with streptavidin peroxidase. The reactions were revealed with orthophenylene diamine (OPD) for IgG and IgA or tetramethylbenzidine (TMB) for the sub-classes of IgG, and interrupted with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. The optic density reading (OD) was done at 450-630nm (ELISA Diasorin reader, USA). The cut-off points were established based on ROC (Receiver Operating Characteristic) curves made with respect to Ig and in accordance with the Tape (2005) description.<sup>19</sup>

### ***Statistical Analysis***

For statistical data analysis, the non-parametric Mann-Whitney, paired t-Student and the Spearman Correlation tests were performed with the help of Graphpad Prism 4.0 software.

## **RESULTS**

### ***1. Sample Characterization***

As seen in Table 1, all the patients that participated in the research were of mixed race<sup>15</sup> and were classified as light mulatto (38.10%), medium mulatto (51.19%) or dark mulatto (10.71%). The uniformity of the sample as regards gender, age and number of teeth present, reflects an adequate composition for the study. Analysis of the clinical parameters showed that the patients in the SCP group presented with pronounced inflammatory signs and greater exposure to microbial challenge than those in the NP group, as verified by the high visible plaque indexes (VPI), gingival bleeding (GBI) and bleeding on probing (BPI). In spite of the leukocyte counts being within the normal limits, the SCP group presented significantly higher values than the NP group in the number of total leukocytes and the absolute number of neutrophils. In the majority of patients in the SCP group PCS (67.4%) the presence of *Porphyromonas gingivalis* was detected, this periodontopathogen not being observed in the NP group individuals. In 66.7% (12/18) of the patients includes in the WBCC experiment, the presence of *P.gingivalis* was observed.

### ***2. Values of IL-10 and IFN- $\gamma$ in the WBCC supernatant***

Both specific and non-specific stimuli were capable of inducing the production of IL-10 and IFN- $\gamma$  *in vitro*. An increased production of IL-10 and low production of IFN- $\gamma$  was observed under stimulus with the tested antigens, and Pg induced high concentrations of IL-10 and the maximum value detected (40,219.11 pg/mL) was in a sample from the SCP group. The data in Table 2 are represented in Figures 1 and 2. Significantly higher values ( $p \leq 0.05$ ) of IL-10 were observed in the supernatants of WBCC stimulated with *P.gingivalis* of individuals with SCP in comparison with those of NP individuals (medians: 11.739,79 pg/mL X 7.450,76 pg/mL, respectively); inversely, the production of higher levels of IFN- $\gamma$  was observed in the WBCC stimulated with *P.gingivalis* from individuals in the NP group

than those of patients in the SCP group (medians: 47,60 pg/mL X 34,36 pg/mL, respectively), this difference not being statistically significant.

When the data of the two groups were analyzed with regard to the production of IL-10 and IFN- $\gamma$ , taking into account whether or not *P.gingivalis* was present in the SCP group, no statistically significant differences were found.

### ***2.1 IL-10:IFN $\gamma$ Proportion***

The high IL-10 production on stimulation with Pg became more evident when the data were transformed into IL-10:IFN- $\gamma$  proportion, being higher in the SCP group than in the NP group (medians of 259.24 pg/mL X 171.00 pg/mL, respectively) (Figure 2).

### ***2.2 Correlation between the IL-10 and IFN- $\gamma$ concentrations in WBCC stimulated with Porphyromonas gingivalis***

No significant correlations were observed between the production of IFN- $\gamma$  and IL-10 on stimulation with *P.gingivalis* (Table 3). The production of IFN- $\gamma$  on stimulation with *P.gingivalis*, however, presented negative correlation ( $-1.0 \leq r_s < 0.0$ ) with basal concentration (without stimulus - SE) of IL-10, in the studied individuals (n=35), and was statistically significant with regard to the correlation with the concentration ratio IL-10:IFN- $\gamma$  without stimulus. This correlation was also observed in the data analysis in groups SCP (n=18) and NP (n=17) in isolation, but was not statistically significant. Whereas the basal concentration of IFN- $\gamma$  presented positive correlation ( $0.0 < r_s \leq +1.0$ ) with the production of IL-10 under stimulation of *P.gingivalis*, without statistical significance.

### **3. Comparison between the seric levels of IgA, IgG and anti-*Porphyromonas gingivalis* sub-classes (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) of the PCS and NP groups.**

Analyzing the ELISA anti-*P.gingivalis*, reactivity and quality control data from the elaboration and analysis of a ROC curve, a cut-off point of 0.305 was determined, and a sensitivity of 88.9% and specificity of 82.4% was defined, with a positive predictive value (PV+) of 84% and negative predictive value (PV-) of 87%. In the results presented in Table 4, it is observed that the levels of IgG, IgG1 and IgG4 ( $p \leq 0.001$ ) and IgG2 ( $p \leq 0.05$ ) specific for *P.gingivalis* were significantly higher in the SCP group in comparison with the

NP Group. The description of the values observed in the study groups is represented in figures 3 (a; b).

### **3.1 Correlation between the seric levels of anti-*Porphyromonas gingivalis* IgG and the concentration of cytokines produced *in vitro*, and with clinical periodontal parameters.**

A positive correlation was observed between the seric levels of anti-*P.gingivalis* IgG and the IL-10 concentration in WBCC stimulated with this bacterium ( $p \leq 0.05$ ). In the SCP group, a negative correlation was noted between anti-*P.gingivalis* IgG and the basal IFN- $\gamma$  concentration ( $p \leq 0.05$ ). Whereas with regard to the clinical periodontitis parameters a statistically significant positive correlation was found between the seric levels of anti-*P.gingivalis* IgG and VPI ( $p \leq 0.01$ ), GBI ( $p \leq 0.01$ ) and BPI ( $p \leq 0.001$ ).

## **DISCUSSION**

Periodontopathogens may be found in the dental biofilm of periodontally healthy individuals and very specially in patients with PD, although with different prevalence between the two groups.<sup>20,21</sup> Furthermore, the presence of certain microorganisms in deep pockets may truly present a greater risk of loss of insertion.<sup>22</sup> The pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* is represented by a large number of virulence factors capable of inducing intense tissue destruction,<sup>4</sup> and may function as a homeostasis rupture factor. In the present study, the presence of *P.gingivalis* was detected in 67.4% (29/43) of the patients in the SCP group. This finding is consistent with many other studies, whose prevalence values in various geographical regions are approximated.<sup>23-27</sup> In some studies, however, the presence of *P.gingivalis* was not reported in any of the control individuals.<sup>28-30</sup> This is corroborated by the present study, in which this periodontopathogen was also not detected in the control group (NP). This absence of *P.gingivalis* in periodontally healthy individuals may evidence a close association of this bacterium with periodontitis, as previously reported.<sup>31-33</sup>

In the present experiments the production of IL-10 and IFN- $\gamma$  was assessed in whole blood cell cultures (WBCC) stimulated with bacterial antigens. IL-10 was primarily described as a cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) secreted by murine Th2 cells, capable of inhibiting the production of Th1 cell cytokines, particularly IFN- $\gamma$ .<sup>9</sup> At present,

there is great interest in the regulatory properties of IL-10 in the immune response. In this study an accentuated production of IL-10 and low production of IFN- $\gamma$  was observed on stimulation by the tested bacteria, that is, *E.coli* and *Porphyromonas gingivalis* (Pg). These results suggest a strong regulation of the cellular immune response, especially to *P. gingivalis*. The high proportion of IL-10:IFN- $\gamma$  found may be due to signaling through the different Toll Like Receptors (TLR). The majority of the gram-negative bacteria LPS signal through TLR-4. Pg, however, has an uncommon TLR-2 signal. Some authors suggest that there is no signalization of the Pg LPS through TLR-4<sup>34</sup> while others observed an antagonist role of Pg LPS for this receptor.<sup>35-37</sup> Contradictorily, Pg signalization by means of both TLR-2 and TLR-4 receptors was reported.<sup>38,39</sup> Ogawa *et al* (2002)<sup>38</sup> suggested that if correctly purified, Pg LPS performs signalization by TLR-4, while molecules associated with PG LPS, probably lipoproteins, signal by means of TLR-2. This is supported by recent studies indicating that Pg components, different from LPS or fimbria, use TLR-2 signalization and induce high cytokine secretions.<sup>40,41</sup> The existence of Pg signalization through TLR-2 has been observed with the use of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway with a consequently high production of IL-10 and low production of IFN- $\gamma$ .<sup>42</sup> This is in agreement with the findings observed in the WBCC methodology of periodontal patients used in the present study and is a possible molecular explanation for these results.

A significantly high IL-10 production was found in the supernatants of the WBCC of volunteers with SCP when the cells were stimulated with *P. gingivalis* extract and *E. coli* LPS, in comparison with that of individuals not affected by the disease. In an immunohistochemical study with granulation tissue from periodontal lesions it was observed that IL-10 was the most abundant and strongly expressed cytokine, followed by IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  and IL-2.<sup>43</sup> According to Gemmell *et al* (2002),<sup>44</sup> however, Th cell clones specific for Pg induced a mixed profile of high production of the cytokines IL-4 and IFN- $\gamma$  and low production of IL-10. This leads to the presumption that in the present study, the main IL-10 producer cells may not have been Th cells. Monocytes and B cells are probable sources.<sup>45</sup> *E.coli* LPS is widely used to assess cell responsiveness in various diseases and inflammatory conditions. The present results indicate that individuals with SCP may respond strongly to unspecific stimulus. An experiment with WBCC conducted by Nakamura *et al* (2004)<sup>46</sup> showed that even low concentrations of LPS, as low as those

observed in the peripheral blood of periodontal patients, may prime monocytes and affect the immune response of diseased subjects. Fokkema *et al* (2002)<sup>47</sup> observed high PGE<sub>2</sub> production and low IL-12p40 production in WBCC stimulated with *E. coli* LPS and suggested that this LPS induces Th2 immune response. They did not, however, observe differences between the subjects with and without chronic periodontitis in the production of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$  and IL-10. Divergences between the results of the present study in relation to those obtained by Fokkema *et al* (2002)<sup>47</sup> may be due to the different methodologies with regard to the diagnostic criteria of the disease, variations in the WBCC technique or even in the genetic variability of the subjects that comprised the samples of these two studies.

Malefyt *et al* (1991)<sup>48</sup> induced blockage of endogenous IL-10 with the use of anti-IL-10 antibodies in a culture of monocytes, and observed that endogenous IL-10 contributed to reduced secretion of cytokines by stimulated monocytes. These results coincide with the negative association found in the present study between the basal concentration of IL-10 (SE) and IFN- $\gamma$  produced under stimulation of bacterial extracts. IL-10 and IFN- $\gamma$  receptors have a JAK/STAT signalization pathway. IL-10 promotes signalization by means of STAT3 and IFN- $\gamma$  via STAT1.<sup>49</sup> SOCS-1 is a protein that negatively regulates STAT-1 transduction and IL-10 is an inducer of SOCS-1 production. This partially explains the mechanism by which IL-10 is able to inhibit IFN- $\gamma$  production.<sup>11,49</sup>

In the present study, individual variations in the production of cytokines was found, and a great amplitude of values was detected, which has also been observed by other authors.<sup>50</sup> A low IFN- $\gamma$  production with the tested stimuli was found in this experiment. Osteoimmunologic studies have provided evidences of complex cytokine regulation networks associated with osteoclastogenesis. The exact contribution of IFN- $\gamma$  to alveolar bone loss *in vivo* has, however, not been perfectly explained. Some studies have suggested an inhibitory effect of IFN- $\gamma$  on osteoclastogenesis<sup>51-53</sup> while others report that IFN- $\gamma$  may play a role in increasing osteoclastogenesis.<sup>54-56</sup>

With regard to the humoral immune response, higher levels of seric anti-*P.gingivalis* IgG were observed in the SCP group in comparison with the NP group, results for which agreement is found in the literature.<sup>12,13</sup> Statistical analysis by the Spearmen correlation



coefficient detected a positive correlation between the seric levels of anti-*P.gingivalis* IgG and the concentration of IL-10 produced *in vitro* under stimulation of the extract of this bacterium. Furthermore, there was also a positive correlation between seric anti-*P.gingivalis* IgG and the clinical parameters VPI, GBI and BPI, and this did not occur with regard to PD and CAL. This was seen by Schenck *et al* (1985)<sup>57</sup> who observed a negative correlation between the seric anti-LPS IgG of *P. gingivalis* and the number of periodontal pockets with PD $\geq$ 5mm. With regard to the IgG sub-groups, some studies in the literature observed a predominance of the sub-class IgG2, whose production is dependent on IFN- $\gamma$ , in the humoral immune response to *P. gingivalis*.<sup>13,58,59</sup> In previous laboratory studies, however, in which this work was done, Trindade (2005)<sup>60</sup> detected an accentuated production of anti-*P.gingivalis* IgG4, this sub-class being the one that best distinguished the groups with periodontitis and the clinically healthy groups. IgG4 is a sub-class whose production depends on IL-4. Wilton *et al* (1993)<sup>61</sup> found evidences that suggest a local IgG4 production in the periodontal tissues in contrast with the other IgG sub-classes that appear to come from plasma. This indicates that IgG4 may have an importance that is not yet completely understood, in the immune response to plaque microorganisms. These same authors observed a negative correlation between the gingival fluid IgG4 and the severity of the disease. Whereas Gemmell *et al* (2004b),<sup>62</sup> in an immunohistochemical study with gingival biopsies, observed an increase in the number of B IgG4+ cells in comparison with IgG2+ cells in individuals with periodontitis, as opposed to the findings in individuals with clinically healthy periodontia or gingivitis, and also found a direct proportion between the number of B IgG4+ cells and the severity of the disease.

As seen, in the present study, a high IL-10 production and low IFN- $\gamma$  production was detected in the supernatants of WBCC stimulated with *P.gingivalis*. A negative correlation was found between seric anti-*P.gingivalis* IgG and the basal concentration of IFN- $\gamma$ , as well as a positive correlation between seric anti-*P.gingivalis* IgG and the basal concentration of IL-10. These results converge on the findings of Trindade (2005),<sup>60</sup> in spite of having been conducted with different groups of volunteers, and suggest that *P. gingivalis* deviates the immune response to a Th2 profile, with the production of IgG4 antibodies incapable of promoting protective effector mechanisms such as the activation of the efficient complement or opsonization system.

Together, the results observed in the present study are in agreement with the hypothesis suggested by Bainbridge & Darveau (2001)<sup>35</sup>, that a clinically healthy periodontium is maintained by a innate, highly orchestrated immune response that protects the host against infection. These authors proposed that *P. gingivalis* plays a role in rupturing this dynamic balance between the host and the microbiota, and that this interferes in the host's ability to recruit neutrophils to the infected sites, by inhibiting the IL-8 expression of epithelial cells exposed to its LPS. In the findings in this study, the absence of *P. gingivalis* in the individuals of the control group NP corroborates the assertion of this hypothesis. Whereas the high IL-10:IFN- $\gamma$  proportion observed in this study in response to the raw *P. gingivalis* extract, and the predominant production of IgG4, may show the peculiarities of the immune response to this bacterium, associated with the chronic nature of the disease, in agreement with the model of stable periodontal lesion transition to progressive lesion being effected under the profile of a Th2 type immune response.<sup>63</sup>

# Tabelas e Figuras

Table 1: Gender, ethnicity, age, clinical and laboratory data of the study groups.

Data	<i>SCP</i>		<i>NP</i>	
	<i>(n = 43)</i>		<i>(n = 41)</i>	
	n	%	n	%
Gender				
Women	25	58.14	24	58.54
Men	18	41.86	17	41.46
Ethnic Group				
Light Mulatto (38.10%)	16	37.20	16	39.02
Medium Mulatto(51.19%)	21	48.84	22	53.66
Dark Mulatto (10.71%)	6	13.96	3	7.32
Pg Detection	29	67.40	00	0.00
	Mean $\pm$ SD			
Age (years)	38.72 $\pm$ 5.91		36.53 $\pm$ 5.35	
No. of teeth present	23 $\pm$ 6		25 $\pm$ 5	
VPI (%)	79.85 $\pm$ 21.73		60.63 $\pm$ 17.76 $\dagger$ *	

GBI (%)	13.73 ± 7.98	5.99 ± 3.36 ‡*
BPI (%)	35.91 ± 20.50	3.93 ± 2.91 ‡**
PD (mm)	7 ± 1	2 ± 1
CAL (mm)	8 ± 2	1 ± 1
	<i>N° (x103/μL) of cells (Mean ± SD)</i>	
Total Leukocytes	7.03 ± 1.89	5.62 ± 1.26 †*
Monocytes	0.49 ± 0.20	0.38 ± 0.14
Lymphocytes	2.12 ± 0.50	1.93 ± 0.46
Neutrophils	4.22 ± 1.38	3.12 ± 1.03 †*
Eosinophils	0.18 ± 0.11	0.18 ± 0.10
Basophils	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; † t-student; ‡ Mann-Whitney. Mann-Whitney RANK values for SCP individuals (case group) and NP (control group), respectively. 19.94 and 15.94 for GBI; 25.79 and 9.76 for BPI. Visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing index (BPI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL).

Table 2: IL-10 and IFN- $\gamma$  Values, and IL-10:IFN- $\gamma$  ratio without stimulation and with *P.gingivalis* stimulation, of the groups with chronic periodontitis (SCP) and without periodontitis (NP).

	Without Stimulation (basal concentration)		Porphyromonas gingivalis	
	SCP	NP	SCP	NP
	<i>IL-10 pg/mL</i>			
Median	91.18	75.07	11739.79	7450.76
[IIQ]	[0.00 – 265.25]	[0.00- 410.13]	[7336.67 -17984.37]	[6241.42- 9507.00]
Minimum	0.00	0.00	5396.78	1538.68
Maximum	1700.147	3812.05	40219.11	18143.76
	<i>IFN-gama pg/mL</i>			
Median	19.70	11.02	34.36	47.60
[IIQ]	[5.83 - 24.26]	[1.13 – 24.08]	[17.15 - 86.50]	[17.84 – 70.17]
Minimum	0.00	0.00	0.00	9.79
Maximum	930.49	342.15	1467.45	684.12
	<i>IL-10:IFN-gama pg/mL</i>			
Median	1.79	3.59	259.24	171.00
[IIQ]	[-10.93 – 32.58]	[-3.85 – 84.20]	[111.80 – 975.32]	[105.91 – 433.38]

Minimum	-28.47	-342.15	11.76	2.25
Maximum	296.76	273.42	13893.390	798.28

IIQ: Interquartile Interval

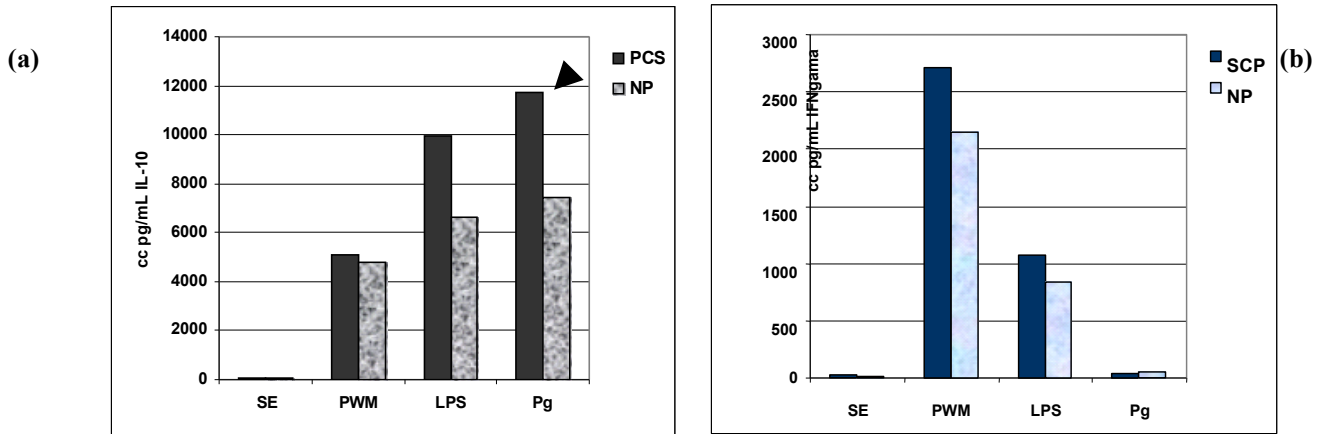


Figure 1: Production of IL-10 (a) and IFN- $\gamma$  (b) *in vitro* in WBCC of individuals with (SCP, n=18), or without (NP, n=17) severe chronic periodontitis. The columns represent the medians of the data. \*  $p \leq 0.05$  (Mann-Whitney).

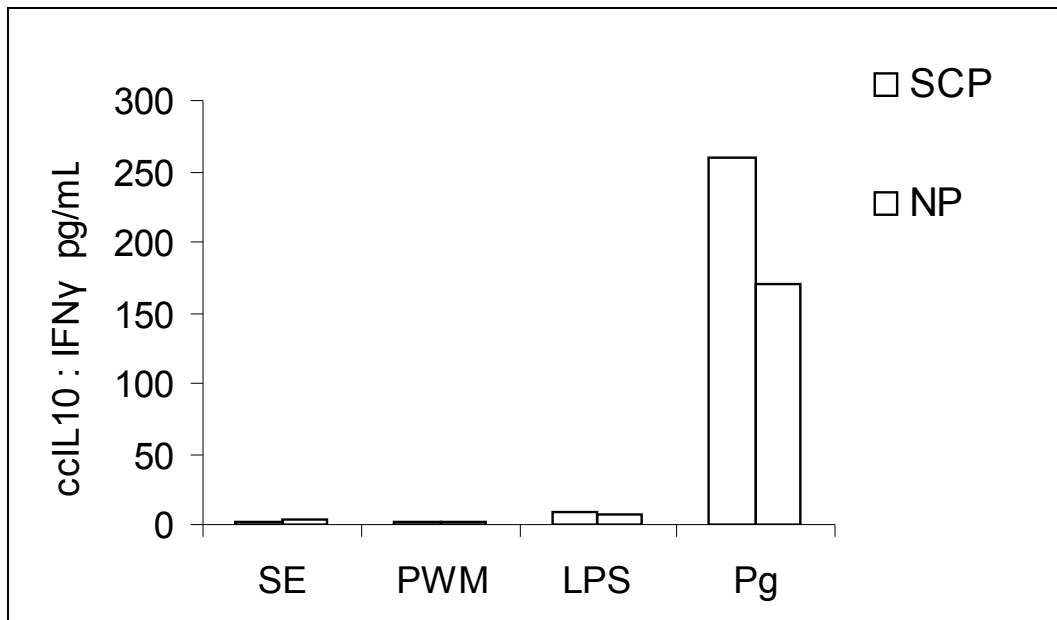


Figure 2: Comparison of the ratio of IL-10:IFN- $\gamma$  concentration observed in WBCC among individuals in the case (SCP) and control (NP) groups, under the tested stimuli. The columns represent the medians of the data.

Table 3: Correlations between IL-10 and IFN- $\gamma$ : basal concentration (SE) and with *P.gingivalis* (Pg) stimulation

Groups	n	Correlations	Spearman Correlation Coefficient ( $r_s$ )	<i>p</i>
	35	IL-10 SE x IFN- $\gamma$ Pg	- 0.36	<b>0.07</b>
SCP	18		-0.36	0.14
NP	17		-0.26	0.32
	35	IL-10: IFN- $\gamma$ SE x IFN- $\gamma$ Pg	<b>- 0.33</b>	<b>0.05*</b>
SCP	18		-0.41	<b>0.09</b>
NP	17		-0.31	0.22
	35	IFN- $\gamma$ SE x IL-10 Pg	0.30	<b>0.08</b>
SCP	18		0.23	0.36
NP	17		0.23	0.37
	35	IL-10 SE x IL-10 Pg	0.18	0.31
SCP	18		0.23	0.36
NP	17		0.17	0.51
	35	IFN- $\gamma$ SE x IFN- $\gamma$ Pg	-0.03	0.87
SCP	18		-0.04	0.86
NP	17		-0.03	0.91

\*Statistically significant negative correlation  $p \leq 0.05$ .

Table 4: Optic densities (OD) of the anti-*Pg* seric levels of IgA, IgG and sub-classes, of the case (SCP) and control (NP) groups. Description of the percentiles and medians. OD 450-630 nm

Groups	IgG	IgG1	IgG2 Percentile 25	IgG3	IgG4	IgA
SCP	0.331	0.104	0.124	0.000	0.287	0.021
NP	0.112	0.027	0.048	0.000	0.025	0.011
			Median			
SCP	0.168	0.162	0.154	0.020	0.752	0.042

NP	0.266	0.035	0.079	0.000	0.046	0.019
			Percentile 75			
SCP	0.643	0.667	0.235	0.036	1.123	0.074
NP	0.251	0.050	0.154	0.012	0.225	0.049
	anti- <i>Porphyromonas gingivalis</i> Ig: Mann Whitney-U Test					
SCP	p = 0.001	p = 0.000	p = 0.012	p = 0.155	p = 0.001	p = 0.133
X						
NP	<b>p ≤ 0.001</b>	<b>p ≤ 0.001</b>	<b>p ≤ 0.05</b>	p ≥ 0.05	<b>p ≤ 0.001</b>	p ≥ 0.05

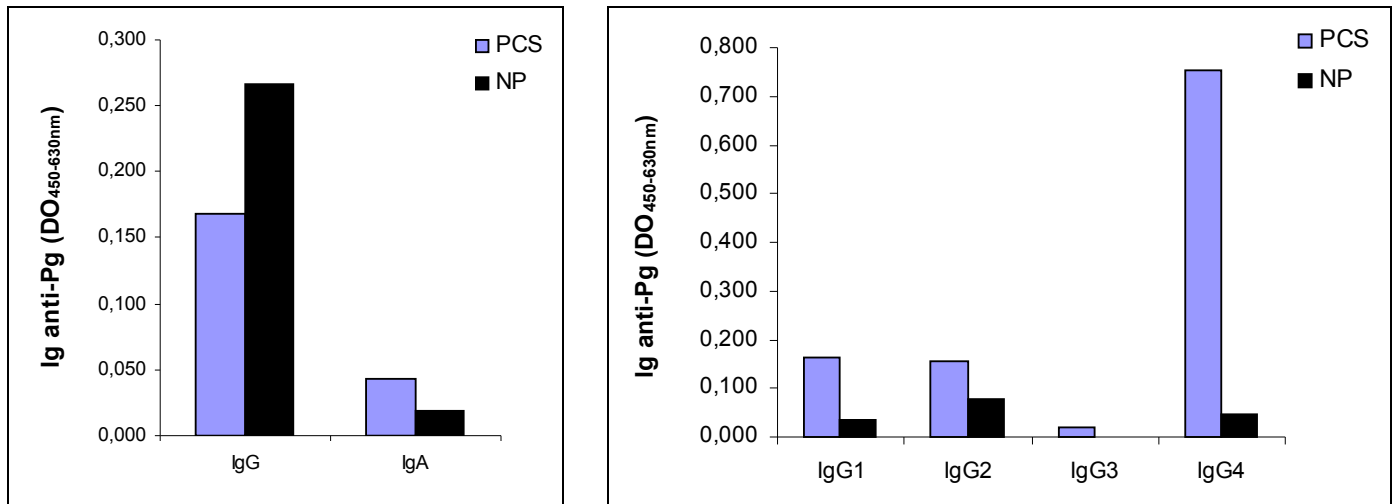


Figure 3 - The columns represent the medians of the optic densities (OD) of the seric levels of anti-*P.gingivalis* immunoglobulins in the group with severe chronic periodontitis (SCP) and without periodontitis (NP): a) IgG ( $p \leq 0.001$ ) and IgA; b) IgG1 ( $p \leq 0.001$ ), IgG2 ( $p \leq 0.05$ ), IgG3 and IgG4 ( $p \leq 0.001$ ).

## **Referências**



# **bibliográficas**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. 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* 1986; 13:431-440.
2. American Academy of Periodontology. Consensus Report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1:926-932.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RI Jr. Microbial Complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
4. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigen of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol 2000* 2004; 35:101-134.
5. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997; 14:9-11.
6. Condorelli F, Scalia G, Cali G, Rosseti B, Nicoletti G, Bue AM. Isolation of *Porphyromonas gingivalis* and detection of immunoglobulin A specific to fimbrial antigen in gingival crevicular fluid. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2322-2325.
7. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-2357.
8. Cher DJ, Mosmann TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J immunol* 1987; 138:3688-3694.
9. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170:2081-2094.
10. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10:801-805.
11. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:929-979.
12. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Frey DE. Human immune responses to oral microorganisms: patterns of systemic antibody levels to *Bacterioides* species. *Infect Immun* 1986; 51:507-513.

13. Lopatin DE, Blackburn E. Avidity and titer of immunoglobulin G subclasses to *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 6:332-337.
14. Kojima T, Yano K, Ishikawa I. Relationship between serum antibody levels and subgingival colonization of *Porphyromonas gingivalis* in patients with various types of periodontitis. *J Periodontol* 1997; 68: 618-625.
15. Krieger H, Morton NE, Azevedo MPMI. Racial admixture in north – eastern Brazil. *Ann Hum Genet Lond* 1965; 29:113-125.
16. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res* 2002; 81:58-63.
17. American Academy of Periodontology. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4:38-39.
18. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11:266-273.
19. Tape TG. Interpreting diagnostic tests. disponível em: <http://gim.unmc.edu/dxtests/Default.htm>.
20. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger MI, Leyes EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiology* 1998; 36:3239-3242.
21. vanWinkelhoff AJ, Loss BG, van der Reijen WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.
22. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol* 1996; 23(4):346-354.
23. Lotufo R, Flynn J, Chen C, Slots J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9(3):154-160.
24. Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobaccillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999; 70:574-580.
25. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dilemijn-Kippuw N, Simón R, Winkel EG. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Euro J Oral Sci* 2000; 108:383-392.
26. Lopez NJ, Socransky SS, da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75:717-725.
27. Cortelli Jr, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32:860-866.
28. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648-657.
29. Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobaccillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 2003; 38:465-470.

30. Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:379-385.
31. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema Socranskii*, *Treponema Denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001; 72:1354-1363.
32. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Sarto R, Rosalen WJ, Mendes MC et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73:360-369.
33. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger MI, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82(5):338-344.
34. Hirschfield M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001; 69:1477-1482.
35. Bainbridge BW, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand* 2001; 59:131-138.
36. Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. Lipopolysaccharide from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human Toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002; 70:218-225.
37. Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham T-T T, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at Toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infection and Immunity* 2003; 71(12):6799-6807.
38. Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, et al. Cell signaling by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Inter Immunol* 2002; 14:1325-1332.
39. Darveau RP, Pham T-T T, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interacts with both toll-like receptor 2 and 4. *Infect Immun* 2004; 72:5041-5051.
40. Kasumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takadachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol* 2004; 3: 370-379.
41. Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T. Lipopolysaccharide preparation extracted from *Porphyromonas gingivalis* lipoprotein-deficient mutant shows a marked decrease in toll-like receptor 2- mediated signaling. *Infect Immun* 2005; 73:2157-2163.
42. Martin M Robert ES, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM. Role of phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; 171:717-725.
43. Lappin DF, Macleod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulaton tissue. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:294-300.
44. Gemmell E, Carter CL, Grieco DA, Sugerman PB, Seymour GJ. *P. gingivalis*-specific T-cell lines produced Th1 and Th2 cytokines. *J Dent Res* 2002; 81:303-307.

45. Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodont Res* 1993; 28:478-486.
46. Nakamura T, Nitta H, Ishikawa I. Effect of low dose *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide pretreatment on cytokine production by human whole blood. *J Periodontal Res* 2004; 39:129-135.
47. Fokkema SJ, Loss BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 2002; 127:374-379.
48. Malefyt RW, Abrans J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-1220.
49. Yoshimura A, Mori H, Ohishi M, Aki D, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling influences of inflammation. *Curr Opin Immunol* 2003;15:704-708.
50. Kobayashi H, Nagasawa T, Aramaki M, Mahanonda R, Ishikawa I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. *J Periodont Res* 2000; 35:319-328.
51. Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, Kukita T, Iwamoto Y, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005; 174:3024-3031.
52. Pang M, Martinez AF, Jacobs J, Balkan W, Troen BR. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:756-763.
53. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res* 2005; 40:287-293.
54. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 1999; 67:2804-2809.
55. Kotake S, Nanke Y, Mogi M, Kawamoto M, Furuya T, Yago T, Kobashigawa T, Togari A, Kamatani N. INF-gamma producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. *Eur J Immunol* 2005;35:3353-3363.
56. Moriyama H, Ukai T, Hara Y. Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: an immunohistometrical study. *Calcif Tissue Int* 2002; 71:53-58.
57. Schenck K. IgG, IgA and IgM serum antibodies against lipopolysaccharide from bacteroides gingivalis in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 1985; 20:368-377.
58. Whitney C, Ant J, Moncla B, Bradley J, Page R, Engel D. Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. *Infect Immun* 1992; 60: 2194-21200.
59. Polak B, Vance JB, Dyer JK, Bird PS, Gemmell E, Reinhardt RA, Seymour GJ. IgG antibody subclass response to *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigens in gingivitis and adult periodontitis. *J Periodontol* 1995; 363-368.
60. Trindade SC. Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 reativos a *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos com periodontites crônica e agressiva. [Mestrado] Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2005. 73p.

61. Wilton JM, Bampton JL, Hurst TJ, Caves J, Powell JR. Interleukin-1 beta and IgG subclass concentration in gingival crevicular fluid from patients with adult periodontitis. *Arch Oral Biol* 1993; 38:55-60.
62. Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Mast cells in human periodontal disease. *J Dent Res* 2004(b); 83:384-387.
63. Gemmell E, Seymour G. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2004; 35:21-41.

**Polymorphism of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup>, IL-6<sup>-174</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10 and 25</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874</sup> and IL-10<sup>-1082, -819, -592</sup>, and of HLA-DR, -DQ, in Brazilians of mixed race with chronic periodontitis**

TUNES UR<sup>2,3</sup>, BENDICHO MT<sup>1,2,3</sup>, JUIZ P JL<sup>2</sup>, PUGLIESE LS<sup>2,3</sup>, FREIRE SM<sup>1,2,3</sup>, MEYER R<sup>1,2</sup>, LEMAIRE DC<sup>1,2,3</sup>.

1. Immunology and Molecular Biology Laboratory (LABIMUNO) – Federal University of Bahia (Universidade Federal da Bahia - UFBA) 2. Post-Graduation Immunology Program (UFBA). 3. Bahian Scientific Development Foundation (Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências - FBDC) / Bahian School of Medicine and Public Health (Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP) – Dentistry Course .

**Basis:** Studies have suggested that there is a genetic component for susceptibility to chronic periodontitis, which may be represented by polymorphisms in immunologically relevant genes.

**Aims:** Assess the association between the polymorphisms of the genes of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> and IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup>, and of class II HLA, and severe chronic periodontitis.

**Methods:** Eighty-four non-smoker volunteers were selected for the study: 43 patients with severe chronic periodontitis (SCP) comprised the case group and 41 individuals without periodontitis (NP), the control group. Clinical periodontal parameters were assessed and

peripheral blood samples were collected to extract genomic DNA. Genotyping was done by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Statistical analysis was done by applying the Fisher Exact Test.

**Results:** Statistically significant differences were observed in the allelic, genotypical and phenotypical frequencies among the individuals in the SCP and NP groups as regards the IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C/T)</sup> gene; the homozygote genotype for the allele 1 (CC), phenotype foreseen as low producer, was the most prevalent in the studied sample, with significantly higher frequency ( $p=0.03$ ) in the NP group (81.48%) than in SCP (65%); inversely, and with a tendency towards statistical significance ( $p=0.08$ ), the frequency of allele 2, associated with the foreseen high producer phenotype, was higher in the SCP group (21.25%) than in NP (10.53%). The observed frequency of allele HLA-*DQB1*\*05 was significantly higher in the NP group in comparison with the SCP group ( $p<0.05$ ).

**Conclusions:** the results suggest that the homozygote genotype for the allele 1 (CC) of IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C)</sup> may be a protection factor and that the allele 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> may be a risk factor for the development of severe chronic periodontitis in Brazilians of mixed race. They also suggest that the allele HLA-*DQB1*\*05 may be a genetic protection marker for SCP in this population.

**Key Words:** Chronic periodontitis; polymorphism; cytokines; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-6; TGF- $\beta$ 1; IFN- $\gamma$ ; IL-10; HLA-DR,-DQ.

Periodontal Diseases (PDs) clinically originate from a pathway that is similar to many common diseases, involving microbiological, genetic and behavioral factors which, together, determine the characteristics of the disease. Immune-inflammatory response is a key element for understanding its pathogenesis and cytokines play an important role in the development of the disease. Although periodontal pathogens are clearly its indicators and perpetuators, there is increasing evidence that host factors, including genetic factors, are important contributors to the clinical manifestation of periodontitis (Michalowicz 1994, Hart & Kornman 1997, Baker 2005). Therefore, although PD is present in the majority of populations, the risk for PD is not uniform in all individuals. In effect, the nature of the

response mediated by cytokines is considered critical in determining the progression of periodontal disease; the profile of an appropriate cytokine response would lead to a protective immune response and would stabilize the disease, while an inappropriate response would lead to its progression (Taylor et al. 2004). To reinforce this concept, during the last few years it has been shown that some individuals have alleles that may be associated with the high production of cytokines, making them more susceptible to, or protected against the disease (Hart & Kornman 1997, Armitage et al. 2000, Craandijk et al. 2002). Therefore, cytokine polymorphisms may contribute to the susceptibility and severity, or to the protection of individuals in the development of severe chronic periodontitis. Thus, the description of allelic, genotypical and phenotypical frequencies will enable the following associations to be assessed: □ patients that have alleles and genotypes, whose foreseen phenotypes have high production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> (allele 2, genotypes TT+CT), TNF- $\alpha$ <sup>-308(A)</sup> (allele 2, genotypes AA+GA) and IL-6<sup>-174(G)</sup> (allele 1, genotypes GG+GC) would be more susceptible to severe chronic periodontitis; □ patients that have allele 1 TGF- $\beta$ <sub>1</sub><sup>codons 10(T), 25(G)</sup> (genotypes TT+GG, TC+GG), with phenotypes foreseen to have high production, would develop less severe disease, since TGF- $\beta$ <sub>1</sub> may inhibit the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- $\alpha$ , to reduce the synthesis and release of MMPs (metalloproteinases) by the fibroblasts, in addition to stimulating the production of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases); otherwise, in more severe PD, the high production phenotype may influence the exacerbation of the inflammatory process due to its role in stimulating the recruitment and activation of leukocytes; □ patients that have allele 1 of IFN- $\gamma$ <sup>+874(T)</sup> (genotypes TT+TA), whose foreseen phenotypes have high production, would develop less severe disease due to the predominantly more protective response of type Th1, with more efficient immunity mediated by cell and protective antibody production; □ patients that have the polymorphism of IL-10<sup>-1082(G),-819(C),-592(C)</sup> (genotypes GCC/GCC + GCC/ACC + GCC/ATA) – phenotypes foreseen to have high production, may develop more severe disease, due to the immune response profile of type Th2 capable of inhibiting the cytokine profiles of Th1 cells, particularly IFN- $\gamma$ ; or even, to the contrary, would have a more protective profile, probably diminishing the production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Kornman et al. 1997, Galbraith et al. 1999, Pravica et al. 1999, Steinsvoll et al. 1999, Holla et al.



2002, Graves & Cochran 2003, Holla et al. 2004, Berglundh et al. 2003, Taylor et al. 2004). In turn, the HLA system is responsible for presenting antigenic peptides to lymphocyte T, therefore, being molecules involved in regulating the immune response; the antigenic peptides of exogenous origin are generally associated with Class II molecules (HLA-DR, -DQ) that are mainly present in the mononuclear phagocytes, dendritic cells, B cells and activated T lymphocytes. The HLA system is highly informative in genetic studies of populations, due to its high polymorphism and strong linkage disequilibrium among alleles of close *loci*. Thus, the role of the polymorphism of these molecules in determining the susceptibility or resistance to disease has deserved attention, using HLA typification as a research instrument, taking into account that the inherited haplotypes are characteristics of each ethnic group (Monte 2004).

In view of the important pro-inflammatory and modulating actions performed by cytokines in the host's immune-inflammatory response to microbial aggression, under possible genetic influence, the association of the polymorphisms of the cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>códons 10T/C e 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> and IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup>, as well as HLA-DR,-DQ, was jointly assessed in adult Brazilian patients of mixed race, non-smokers, with severe chronic periodontitis, in a case-control type study. This project obtained financial aid from the Bahia State Research Support Foundation / FAPESB (Agreement 230/2003).

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Sample Selection*

Eighty-four subjects were selected for the study. The case group (SCP) included 43 patients with severe chronic periodontitis; the control group (NP) comprised 41 individuals without periodontitis. As regards ethnic group, all were classified as being of mixed race (Krieger et al. 1965), of both genders, age range 30-50 years, non-smokers and having no systemic disturbances, immunosuppression, or pregnancies, referred to the Dentistry Course at EBMSP/FBDC. The project was approved by the Research Ethics Committee of FBDC (Report n° 09/2003) and the volunteers signed a term of free informed consent to participate in the research.

### *Clinical Parameters*

A single calibrated examiner ( $Kappa = 0.81$ ) assessed the following: visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing index (BPI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), in accordance with the Procedure Operational Model of Labimuno. The criteria for inclusion in the case Group (SCP) were established in accordance with Lopez *et al* (2002): presence of at least 4 sites in different teeth with  $CAL \geq 3mm$ ,  $PD \geq 4mm$  and with bleeding on probing. In this study, only patients with a severe stage of disease (presence of at least one site with  $CAL \geq 5mm$ ) participated in the investigation. The chronic nature of the disease was based on the American Academy of Periodontology (AAP 1999) criteria. The control group (NP) was comprised of individuals who, on clinical periodontal exam, were classified as free of periodontitis, with  $PD \leq 3mm$  and  $CAL \leq 2mm$  (Lopez et al.2002). None of the subjects had received periodontal treatment and information about oral hygiene before the clinical exam and blood collection.

#### *Material Collection*

- **Peripheral blood sample**

For genomic DNA extraction, 5.0 mL of blood was collected in tubes with EDTA, using the “GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech), in accordance with the manufacturer’s guidelines. DNA concentration and purity was assessed by reading the optic density at 260 and 280nm, and the samples were afterwards kept at  $-20^{\circ}C$  until they were used.

#### *Material Processing*

- **Polymerase Chain Reaction (PCR)** – a Perkin-Elmer GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) thermocycler was used for the amplification reactions, and these were done with 1,9  $\mu g$  of DNA test with a volume of 180 $\mu l$  in a mix containing 10 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM of KCl, deoxyribonucleotides (200  $\mu M$  each) and 5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The amplified DNA products were separated by electrophoresis in 2.5% agarose gel, containing 0.05  $\mu g/mL$  of ethidium bromide, and the electrophoretic run was done between 140 and 150 volts at 40mA at the beginning of migration. Afterwards, the gel was visualized by exposure to ultraviolet light

(300-nm), and photographed with the aid of a TCX-20.M transilluminator (Vilber Lourmat, France).

- **Genotyping HLA-DR, -DQ, and the cytokines TNF- $\alpha$ <sup>308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874 T/A</sup> and IL-10<sup>-1082G/A, -819C/T, -592C/A</sup>** – genotyping of the cytokines and the HLA-DR,-DQ was done by the PCR-SSP method with “Cytokine Genotyping Tray” and “Micro SSP™DNA Typing SSP2L” (One Lambda Inc., Canoga Park/CA/USA) kits, respectively, in accordance with the manufacturer’s instructions.
- **Genotyping of IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>** – was done by the PCR-RFLP technique, using the following initiators: 5’ - CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A - 3’ / 5’ - GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG - 3’ (Pociot et al. 1992). PCR product digestion was done with the restriction enzyme Taq I, generating fragments with 12, 85 and 97 bp (allele 1 [C]) or fragments with 12 and 182 bp (allele 2 [T]).

#### *Statistical Analysis*

For statistical analysis of the allelic, genotypical and phenotypical frequencies observed, the Exact Fisher Test was used, in accordance with the Woolf method; for the clinical data the t-Student and Man-Whitney tests were applied with the aid of Graphpad Prism 4.0 software. The value  $p \leq 0.05$  was accepted as statistically significant.

## **RESULTS**

Table 1 shows the demographic and clinical data of the studied groups. All the patients that participated in this research were of mixed race (Krieger et al. 1965) and were classified as light mulatto (38.10%), medium mulatto (51.19%) or dark mulatto (10,71%). Distribution by gender and mean age are similar in both groups as well as the mean number of teeth per individual in each group ( $p=1,00$ ), reflecting adequate composition for the study.

The distributions of the allelic, genotypical and phenotypical frequencies foreseen of the cytokines are shown in Table 2 (IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>) and in Table 3 (TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874 T/A</sup> and IL-10<sup>-1082G/A, -819C/T, -592C/A</sup>). The results of HLA-DR,-DQ are to be found in Table 4. Genotyping of IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> was done with the material from 40 SCP patients and from 38 NP controls.

As seen in the IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> tabulated data (Table 1) and the individual being diploid, the allelic frequency is observed doubly, in comparison with the genotypical frequency, for each individual; of a total of 156 observations, 80 (N = 40 X 2) refer to the SCP case group, and 76 (N = 38 X 2), to the NP control group. The frequency of allele 1 (C), in the case group was 63/80 (26 homozygotes and 11 heterozygotes [2 X 26 + 11 = 63]); similarly, the frequency of the allele 2 (T) was 17/80 (3 homozygotes and 11 heterozygotes [2 X 3 + 11 = 17]). For the control group, the frequency was 68 (31 X 2 + 6 = 68) for the allele 1, and 8 (2 X 1 + 6 = 8) for the allele 2. It was therefore found that allele 1 (C), whose foreseen phenotype has low production, was the one most frequently observed among the cases (78.75%) and controls (89.47%), while allele 2 (T), associated with the phenotype foreseen to have high production, was twice as frequent in the cases (21.25%) than in the controls (10.53%), with a trend towards statistical significance for this difference (p=0.08). The homozygote genotype for allele 1 (CC), phenotype foreseen as low producer, was the most frequent in both groups, with statistically significant difference between the case and control groups (p=0.03). Whereas, the heterozygote (CT) and homozygote genotypes for allele 2 (TT), phenotype foreseen as high producer, were observed with almost two times greater frequency in the case group (35%) than in the control group (18.42%), although this difference was not statistically significant.

## DISCUSSION

Understanding of PD pathogenesis has not yet been completely elucidated. Individuals that present polymorphisms in genetic regions that codify for the expression of hyper responsive phenotypes of some cytokines appear to be susceptible, or protected against the greater severity of PD. In recent reports, the association of PD with the polymorphisms of the genes of cytokines IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> (Gore et al. 1998, Galbraith et al. 1999, Rogers et al. 2002, Lopez et al. 2005), TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> (Galbraith et al. 1999), IL-6<sup>-174G/C</sup> (Trevilatto et al. 2003, Holla et al. 2004), TGF- $\beta$ 1<sup>codons 10T/C e 25G/C</sup> (Holla et al. 2002), IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> (Pravica et al. 1999) and IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> (Berglundh et al. 2003, Dashash et al. 2005), as well as of Class 2 HLA (Michalowicz et al. 1991), were assessed with results that are not yet conclusive.

The Brazilian population presents great genetic diversity. The studied sample represents an anthropogenetic group of mixed races resulting from miscegenation among three ethnic elements: Caucasians (whites), Blacks and Amerindians. The identification of genetic factors, such as HLA, associated with a certain disease, is particularly important when there are intervention and prevention protocols in groups with a predisposition for a pathology, as is the case with periodontitis. In view of this, various studies have suggested an association between HLA and aggressive periodontitis, but few have assessed the association between Class II HLA antigens and severe chronic periodontitis. In the results of the present study, a significantly increased frequency ( $p < 0.05$ ) of the allele HLA-*DQB1\*05* was observed in the individuals of the NP control group, compared with the patients in the SCP group, and may suggest that this allele is a genetic marker of protection against the development of severe chronic periodontitis in this population. Nevertheless, Ohyama et al. (1996) showed that this allele would be a genetic predisposition factor for the aggressive periodontitis in Japanese individuals, and it may suggest different genetic profiles for the two forms of periodontitis.

The biological mechanisms that support the association between the positive genotype and PD rest on the hypothesis that genetic polymorphisms may modulate the secretion of cytokines, supporting the hypothesis that a hyper-inflammatory phenotype, in certain individuals, counts in the susceptibility to certain chronic inflammatory conditions, such as periodontitis (Kornman et al. 1997). High levels of IL-1 $\beta$  in the periodontal tissue and crevicular gingival fluid (CGF) have repeatedly been associated with sites with severe disease, as well as with patients that have specific polymorphic genotypes for this cytokine (Stashenko et al. 1991, Pociot et al. 1992, Engebretson et al. 1999, Galbraith et al. 1997, Galbraith et al. 1999, Figueredo et al. 1999). These increased levels have also been related for other cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 (Yamazaki et al. 1994, Boström et al. 1999, Gorska et al. 2003, Holla et al. 2004) and TGF- $\beta$  (Steinsvoll et al. 1999, Cezário & Figueredo 2004). This relation has, however, not been completely demonstrated. In the present study (Table 2), the most frequent genotype of IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> was the homozygote for allele 1 (CC), whose foreseen phenotype has low production, which was presented with significantly higher frequency ( $p = 0.03$ ) in the NP control group (81.48%) than in the SCP case group PCS (65%), as has been found in other studies (Gore et al. 1998, Galbraith et al.

1999, Armitage et al. 2000, Walker et al. 2000, Cullinan et al. 2001, Papapanou et al. 2001, Rogers et al. 2002, Meisel et al. 2002, Sakellari et al. 2003, Lopez et al. 2005). From this one infers that the homozygosis of the allele 1 (C) appears to be a protection factor for the development of chronic periodontitis. To the contrary, some authors found a positive association of this allele 1 of IL-1B with aggressive periodontitis in Caucasians (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000) and in Afro-Americans (Walker et al. 2000). There may be a relation between the findings of these studies and the results of the present work: the positive association between allele 1 of IL-1B and aggressive periodontitis found in both Caucasian and Afro-American populations and the negative association of this allele with chronic periodontitis found in this study, may suggest different genetic profiles for the two forms of periodontitis, a hypothesis previously put forward by Lopez et al. (2005). On the other hand, observation of a greater frequency of allele 2 of IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> in the SCP patients (21.25%) than in the NP controls (10.53%), with a trend towards statistical significance (p=0,08), is in agreement with other authors that reported high prevalence of allele 2 in advanced chronic periodontitis (Kornman et al. 1997, Galbraith et al. 1999, Mcdevitt et al. 2000, Cullinan et al. 2001, Papapanou et al. 2001, Thomson et al. 2001, Rogers et al. 2002, Lopez et al. 2005), corroborating the studies that estimated this allele 2 of IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup>, to be the one less commonly observed in populations, a risk factor for chronic periodontitis.

Table 3 lists the results of observations of the frequency of polymorphisms of the genes of cytokines TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup>, IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub><sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, with no statistically significant differences being observed between the SCP case and NP control groups. The results concerning TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, however, showed that the homozygote of allele 1 (GG), phenotype foreseen as low producer, in percentages, had a higher frequency among the controls (82.93%) than in the cases (76.74%); inversely, the percentage observed with regard to the set of genotypes whose foreseen phenotypes have high production (GA+AA) was higher among the cases (23.26%) than in the controls (17.07%). These findings, together with those that were observed for IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>, suggest that the higher production of these cytokines may be more associated with patients that composed the SCP case group than with those subjects in the NP control group. While Galbraith et al. (1999) indicated that the polymorphism of the gene TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> was high in the group with advanced periodontitis, other authors were unable to show association

between the polymorphisms of this gene and susceptibility to or severity of periodontal disease (Craandijk et al. 2002, Folwaczny et al. 2004, Donati et al. 2005, Soga et al. 2003). Whereas for IFN- $\gamma$ , cytokine that represents a key aspect of Th1 responses, the phenotype foreseen as low producer (homozygote genotype of allele 2 [AA]) presented with greater frequency in the SCP group of patients (51.16%) than in the NP control group (36.59%); coherently the phenotype foreseen as high producer – homozygote genotype of allele 1 (TT) – was observed with lower frequency in the case group (4.65%) than in the control group (12.9%), and may suggest a profile of less protection against the severity of the disease in patients in the SCP group. Allele 2 of IL-10<sup>-1082\*A</sup> has been pointed out as a risk factor for many human diseases (Helminen et al. 1999, Tagore et al. 1999, Lio et al. 2003, Abbas et al. 2003). Dashash et al. (2005) found equal correlation in their findings, studying the susceptibility of children to gingivitis, and also observed an association of allele 1 IL-10<sup>-1082\*G</sup> as a protection factor. According to Turner *et al.* (1999) allele 1 of IL-10<sup>-1082\*G</sup> is associated with the increased production of IL-10 and allele 2 IL-10<sup>-1082\*A</sup> is associated with a decreased level of this cytokine. In this study, the frequency of these alleles was similar between the case and control groups. In the cytokine production analysis made in the context of this study, high levels of IL-10 production were, however, found in patients in the SCP group, and low levels of IFN- $\gamma$ , when their total blood cell culture (CCST) was stimulated with *P.gingivalis*, probably indicating a response of the Th2 type. This may agree with the findings of Dashash *et al.* (2005) who found an association of allele 1 IL-10<sup>-1082\*G</sup> (phenotype foreseen as having high production) as a factor of protection against gingivitis, a lesion of a stable nature in children, differently to the results of the present study, which found a high production of IL-10 in the patients with severe chronic periodontitis, a lesion of a progressive nature in adults, approximating the model proposed by Gemmell & Seymour (2004). This hypothesis is corroborated by the findings of Berglundh et al (2003) who observed significantly higher proportion in the presence of this allele 1 IL-10<sup>-1082\*G</sup>, and genotype GG, phenotype foreseen as having high production, in the patients (Swedes, Caucasians, 36-74 years of age, N=60) with severe, generalized chronic periodontitis than in the controls (periodontally healthy individuals, 35-78 years of age, N=39).

Chronic periodontitis is probably a complex genetic disease. In one of their studies in twins, Michalowicz et al. (2000) estimated that around 50% of chronic periodontitis is due to genetic factors. In contrast to simple genetic diseases that may be caused by a single genetic mutation, it is plausible that the additive effect of multiple genes may be a determinant of susceptibility in complex diseases such as chronic periodontitis. Interactions among the polymorphic forms of critical genes may act in conjunction with environmental factors, complicating the disease model even further. In a similar model, one single allele of the gene may contribute to susceptibility, but may not make an ample and sufficient contribution to the result of the disease. Genetic polymorphisms have, however, been used historically as genetic markers for identifying genes that cause diseases in association studies (Research, Science and Therapy Committee of AAP 2005). In the present study, although there was only a statistically significant result for the study of the polymorphisms of IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> and HLA-*DQB1\*05*, some of the other findings, as previously seen, signaled the possibility of competition from other polymorphisms for the profile of protection and/or risk for severe chronic periodontitis in the studied individuals, meeting with the supposition that this form of PD is a disease subject to polygenic influence.





# Tabelas

Table 1: Gender, ethnicity, age and clinical data of the study groups.

Data	SCP (n = 43)		NP (n = 41)	
	n	%	n	%
Gender				
Women	25	58.14	24	58.54
Men	18	41.86	17	41.46
Ethnic Group				
Light Mulatto (38.10%)	16	37.20	16	39.02
Medium Mulatto(51.19%)	21	48.84	22	53.66
Dark Mulatto (10.71%)	6	13.96	3	7.32
	Mean ± SD			
Age (years)	38.72±5.91		36.53 ± 5.35	
No. of teeth present	23 ± 6		25 ±5	
VPI (%)	79.85 ±21.73		60.63 ±17.76†*	
GBI (%)	13.73 ±7.98		5.99 ±3.36‡*	
BPI (%)	35.91±20.50		3.93± 2.91‡**	
PD (mm)	7 ±1		2 ±1	
CAL (mm)	8 ±2		1±1	

\* p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01; † t-student; ‡ Mann-Whitney. Mann-Whitney RANK values for SCP individuals (case group) and NP (control group), respectively. 19.94 and 15.94 for GBI; 25.79 and 9.76 for BPI. Visible plaque index (VPI), gingival bleeding index (GBI), bleeding on probing index (BPI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL).

Table 2: Distribution of the allelic, genotypical and phenotypical frequencies foreseen in the polymorphism of the IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> gene in the case (SCP) and control (NP) groups.

IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup>	SCP n=40		NP n=38		P
	n	%	n	%	
Allelic Frequency					
Allele 1 (C)	63	78.75	68	89.47	0.08
Allele 2 (T)	17	21.25	08	10.53	
Genotypical Frequency					
1-1 (CC)	26	65.00	31	81.48	0.03
1-2 (CT)	11	27.50	06	15.79	1.00
2-2 (TT)	03	7.50	01	2.63	0.33
Phenotypical Frequency <sup>(a)</sup>					
Low producer (CC)	26	65.00	31	81.48	0.03
High producer (CT+TT)	14	35.00	07	18.42	0.12

Exact Fisher Test -Alleles:OR=0.43; CI=0.17 to 1.08; Genotypes:OR=0.22;CI 95%= 0.05 to 0.90. <sup>a</sup>Foreseen cytokine production Phenotype in accordance with Stashenko et al. 1991, Pociot et al. 1992, Gore et al. 1998, Engebretson et al. 1999, Galbraith et al. 1999.

Table 3: Genotypical and phenotypical frequency of polymorphism of the genes TNF- $\alpha$ <sup>308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup>, IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub><sup>codons 10T/C and 25G/C</sup>, in the individuals in the case (SCP) and control (NP) groups. Exact Fisher Test.

Genotype (Phenotype <sup>a</sup> )	SCP n = 43		NP n = 41		p
	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ <sup>308G/A</sup>					
G/G (low producer)	33	76.74	34	82.93	0.59
GA+AA (high producer)	10	23.26	07	17.07	
IL-6 <sup>-174G/C</sup>					
GG+GC (high producer)	41	95.35	40	97.56	
CC (low producer)	02	4.65	01	2.44	1.00
TGF- $\beta$ <sub>1</sub> <sup>codons 10T/C e 25G/C</sup>					
T/T G/G; T/C G/G (high producer)	28	65.12	28	68.29	0.81
T/C G/C; C/C G/G; T/T G/C (intermediate)	13	30.23	09	21.95	0.46
C/C G/C; C/C C/C; T/T C/C; T/C C/C (low)	02	4.65	04	9.76	0.43
IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup>					
TT (high producer)	02	4.65	05	12.19	0.25
TA (intermediate)	19	44.19	21	51.22	0.66
AA (low producer)	22	51.16	15	36.59	0.19
IL-10 <sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup>					

GCC/GCC (high producer)	03	6.98	03	7.32	1.00
GCC/ACC; GCC/ATA (intermediate)	22	51.16	23	56.10	
ACC/ACC; ACC/ATA; ATA/ATA (low)	18	41.86	15	36.58	

<sup>a</sup>Foreseen cytokine production phenotype in accordance with Wilson et al. (1993), Pravica et al. (1997), Turner et al. (1997), Fishman et al. (1998), Kurtis et al. (1999), Awad et al. (1998), Pravica et al. (2000), Turner et al. (1999).

Table 4. Frequency of alleles HLA-DRB1\*,-B3\*,-B4\*,-B5\*,-DQB1\* in the group of patients with severe chronic periodontitis (SCP) and in the control group (NP).

<i>HLA Allelic Group</i>	<i>Serological Correspondent</i>	<i>SCP (%)</i>	<i>NP (%)</i>	<i>RR</i>	<i>p</i>
<i>DRB1*01</i>	DR1	11.63	21.95		ns
<i>DRB1*15</i>	DR15(2)	30.23	29.27		ns
<i>DRB1*16</i>	DR16(2)	4.65	2.44		ns
<i>DRB1*03(17)</i>	DR17(3)	13.95	7.32		ns
<i>DRB1*03(18)</i>	DR18(3)	0.0	7.32		ns
<i>DRB1*04</i>	DR4	13.95	19.51		ns
<i>DRB1*07</i>	DR7	25.58	26.83		ns
<i>DRB1*08</i>	DR8	6.28	24.39		ns
<i>DRB1*09</i>	DR9	6.98	4.88		ns
<i>DRB1*10</i>	DR10	6.98	12.20		ns
<i>DRB1*11</i>	DR11(5)	20.93	9.76		ns
<i>DRB1*12</i>	DR12(5)	0.0	2.44		ns
<i>DRB1*13</i>	DR13(6)	34.88	17.07		ns
<i>DRB1*14</i>	DR14(6)	0.0	9.76		ns
<i>DRB3*</i>	DR52	67.44	53.66		ns
<i>DRB4*</i>	DR53	48.84	51.22		ns
<i>DRB5*</i>	DR51	34.88	31.71		ns
	<i>DR blank</i>	11.63	4.88		ns
<i>DQB1*02</i>	DQ2	9.53	36.59		ns
<i>DQB1*03</i>	DQ7(3)	34.88	21.95		ns
<i>DQB1*03</i>	DQ8(3)	13.95	17.07		ns
<i>DQB1*03</i>	DQ9(3)	9.30	2.44		ns
<i>DQB1*04</i>	DQ4	9.30	19.51		ns
<i>DQB1*05</i>	DQ5(1)	27.91	51.22	0.5449	0.0438
<i>DQB1*06</i>	DQ6(1)	39.53	39.02		ns
	<i>DQ blank</i>	25.58	12.20		ns

ns – not significant; RR = Relative Risk

## **Referências bibliográficas**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, Z., Moatter T. (2003) Interleukin (IL)-1 beta and IL-10 gene polymorphism in chronic hepatitis C patients with normal or elevated alanine aminotransferase levels. *Journal Pak Medical Association* **53**, 59-62.
2. American Academy of Periodontology. (1999) Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals Periodontology* **4**, 38-39.
3. Armitage, G.C., Wu, Y., Wang, H-Y., Sorrell, J., Di Giovine, F.S., Duff, G.W. (2000) Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of chinese heritage. *Journal of Periodontology* **71**,164-171.
4. Awad, M.R., El-Gamel, A., Simm, E., Hasleton, P., Yonan, N., Deiraniya, A.K., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1998) Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene: association with TGF- $\beta$  production, fibrotic lung disease and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* **66**, 1014-1020.
5. Baker, P.J. (2005) Genetic control of the immune response in pathogenesis. *Journal of Periodontology* **76**, 2047-2051.
6. Berglundh, T., Donati, M., Mahn-Zorii, M., Hanson, L-A., Padyukov, L. (2003) Association of the -1087 IL-10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 249-254.
7. Boström, L., Linder, L.E., Bergström, J. (1999) Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 352-357.
8. Cezário, E.M., Figueredo, C.M.S. (2004) Quantidade elevada do TGF- $\beta$  em sítios com destruição tecidual, em pacientes com periodontite crônica. *Revista Ciências Médicas e Biológicas* **3**, 176-180.
9. Craandijk, J., Van Krugten, M.V., Verweij, C.L., Van Der Velden, U., Loos, B.G. (2002) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 28-34.
10. Cullinan, M.P., Westerman, B., Hamlet, S.M., Palmer, J.E., Faddy, M.J., Lang, N.P., Seymour, G.J. (2001) A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 1137-1144.
11. Dashash, M., Blinkhorn, A.S., Hutchinson, I.V., Pravica, V., Drucker, D.B. (2005) The relation between Interleukin-10 gene polymorphism at position -1082 and susceptibility to gingivitis in children. *Journal of Periodontology* **76**, 1455-1462.
12. Diehl, S.R., Wang, Y-F., Brooks, C.N., Burmeister, J.A., Califano, J.V., Wang, S., Schenkein, H.A. (1999) Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis *Journal of Periodontology* **70**, 418-430.

13. Donati, M., Berglundh, T., Hytönen, A-M., Hahn-Zoric, M., Hanson, L-A., Padyukov, L. (2005) Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 474-479.
14. Engebretson, S.P., Lamster, I.B., Herrera-Abreu, M., Celenti, R.S., Timms, J.M., Chaudhary, A.G.A., Di Giovine, F.S., Kornman, K.S. (1999) The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in periodontal tissue gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontology* **70**, 567-573.
15. Figueredo, C.M.S., Ribeiro, M.S.M., Fischer, R.G., Gustafsson, A. (1999) Increased interleukin-1 $\beta$  concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *Journal of Periodontology* **70**, 1457-1463.
16. Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Humphries, S., Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with System-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **102**, 1369-1376.
17. Folwaczny, M., Glas, J., Török, H-P., Mende, M., Folwaczny, C. (2004) Lack of association between the TNF $\alpha$ G-308A promoter polymorphism and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 449-453.
18. Galbraith, G.M.P., Britt Steed, R., Sanders, J.J., Pandey, J.P. (1998) Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of TNF genotype. *Journal of Periodontology* **69**, 428-433.
19. Galbraith, G.M.P., Hagan, C., Steed, R.B., Sanders, J.J., Javed, T. (1997) Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **68**, 832-838.
20. Galbraith, G.M.P., Hendley, T.M., Sanders, J.J., Palesch, Y., Pandey, J.P. (1999) Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 705-709.
21. Gemmell, E., Seymour, G. (2004) Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000* **35**, 21-41.
22. Gore, E.A., Sanders, J.J., Pandey, J.P., Palesch, Y., Galbraith, G.M.P. (1998) Interleukin-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 781-785.
23. Gorska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M., Madalinski, K. (2003) Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 1046-1052.
24. Graves, D.T. & Cochran, D. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* **74**, 392-401.
25. Hart, T.C., Kornman, K.S. (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* **14**, 202-215.
26. Helminen, M., Lahdenpohja, N., Hurme, M. (1999) Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *Journal of Infectology Disease* **180**, 496-499.

27. Holla, L.I., Fassmann, A., Benes, P., Halabala, T., Znojil, V. (2002) 5 polymorphisms in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene (TGF- $\beta$ 1) in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 336-341.
28. Holla, L.I., Fassmann, A., Stejskalová, A., Znojil, V., Vanek, J., Vacha, J. (2004) Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **75**, 30-36.
29. Kornman, K.S., Crane, A., Wang, H-Y., Di Giovine, F.S., Newman, E., Pirk, F.W., Wilson, T.G. Jr., Higginbottom, F.L., Duff, G.W. (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 72-77.
30. Kurtis, B., Develioglu, H., Taner, I.L., Balos, K., Tekin, I.O. (1999) IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *Journal of Oral Science* **41**, 163-167.
31. Lio, D., Licastro, F., Scola, L., et al. (2003) Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. *Genes Immunology* **4**, 234-238.
32. Lio, D., Scola, L., Crivello, A., et al. (2002) Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immunology* **3**, 30-33.
33. Lopez, N.J., Smith, P.C., Gutierrez, J. (2002) Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *Journal of Dental Research* **81**, 58-63.
34. Lopez, N.J., Jara, L., Valenzuela, C.Y. (2005) Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology* **76**, 234-243.
35. McDevitt, M.J., Wang, H-Y., Knobelman, C., Newman, M.G., Di Giovine, F.S., Timms, J., Duff, G.W., Kornman, K.S. (2000) Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *Journal of Periodontology* **71**, 156-163.
36. Meisel, P., Siegemund, A., Dombrowa, S., Sawaf, H., Fanghaenel, J., Kocher, T. (2002) Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *Journal of Periodontology* **73**, 27-32.
37. Meisel, P., Schwahn, C., Gesch, D., Bernhardt, O., John, U., Kocher, T. (2004) Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **75**, 236-242.
38. Michalowicz, B.S., Aeppli, D., Virag, J.G., Klump, D.G., Hinrichs, E., Segal, N.L., Bouchard, T.J.Jr., Philstrom, B.L. (1991) Periodontal findings in adult twins. *Journal of Periodontology* **62**, 293-299.
39. Michalowicz, B.S. (1994) Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **65**, 479-488 [Supplement].
40. Michalowicz, B.S., Diehl, S.R., Gunsolley, J.C., Sparks, B.S., Brooks, C.N., Koertge, T.E., Califano, J.V., Burmeister, J.A., Schenkein, H.A. (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 1699-1707.
41. Monte, S.J.H., Moita Neto, J.M., Rampim, G.F., et al. (2004) Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. *Revista da Associação Médica Brasileira* **50**, 422-426.
42. Ohyama, H., Takashiba, S., Oyaizu, K., Nagai, A., Naruse, T., Inoko, H., Kurihara, H., Murayama, Y. (1996) HLA class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *Journal of Periodontology* **67**, 888-894.



43. Papapanou, P.N., Neiderud, A-M., Sandros, J., Dahlén, G. (2001) Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 389-396.
44. Parkhill, J.M., Hennig, B.J.W., Chapple, I.L.C., Heasman, P.A., Taylor, J.J. (2000) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 682-689.
45. Pociot, F., MØlvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., Nerup, J. (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gene correlates with IL-1 $\beta$  secretion *in vitro*. *European Journal of Clinical Investigation* **22**, 396-402.
46. Pravica, V., Perrey, C., Plevris, J., Bathgate, A., Hayes, P.C., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1997) Elevated frequency of TNF $\alpha$  -308 A allele in patients requiring liver transplantation. *Immunology* **92**, Suppl 1, 13.3.
47. Pravica, V., Asderakis, A., Perrey, C., Hajeer, A., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1999) *In vitro* production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. *European Journal of Immunogenetics* **26**, 1-3.
48. Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H., Hutchinson, I.V. (2000) A Single Nucleotide Polymorphism in the First Intron of the Human IFN- $\gamma$  Gene: Absolute Correlation  $\gamma$  Production with a Polymorphic CA Microsatellite Marker of High IFN-*Humoral Immunology* **61**, 863-866.
49. Research, Science and Therapy Committee of The AAP. (2005) Implications of genetic technology for the management of periodontal diseases. *Journal of Periodontology* **76**, 850-857.
50. Rogers, M.A., Figliomeni, L., Baluchova, K., Tan, A.E., Davies, G., Henry, P.J., Price, P. (2002) Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *Journal of Periodontology Research* **37**, 37-41.
51. Sakellari, D., Koukoudetsos, S., Arsenakis, M., Konstantinidis, A. (2003) Prevalence of IL-1A and IL-1B polymorphisms in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 35-41.
52. Soga, Y., Nishimura, F., Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba, S., Murayama, Y. (2003) Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF $\alpha$ ) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 524-531.
53. Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Prostack, L., Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (1991) Levels of interleukin 1 $\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 548-554.
54. Steinsvoll, S., Halstensen, T.S., Schenck, K. (1999) Extensive expression of TGF- $\beta$ <sub>1</sub> in chronically-inflamed periodontal tissue. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 366-373.
55. Tagore, A., Gonsalkorale, W.M., Pravica, V., et al. (1999) Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissues Antigens* **54**, 386-390.
56. Taylor, J.J., Preshaw, P.M., Donaldson, P.T. (2004) Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000* **35**, 158-182.
57. Thomson, W., Edwards, S., Dobson-Le, D., et al. (2001) IL-1 genotype and adult periodontitis among young New Zealanders. *Journal of Dental Research* **80**, 1700-1703.
58. Trevilatto, P.C., Scarel-Caminaga, R.M., De Brito, R.B.Jr., De Souza, A.P., Line, S.R.P. (2003) Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with

- susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 438-442.
59. Turner, D.M., Sankaran, D., Grant, S.C.D., Yonan, N., Sinnott, P.J., Dyer, P.A., Hutchinson, I.V. (1997) The effect of polymorphism in the TNF- $\alpha$  e IL-10 genes on heart transplant rejection. *International Journal of Heart Lung Transplant* **16**, 108-115.
  60. Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1999) An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European Journal of Immunogenetics* **24**, 1-8.
  61. Walker, S.J., Van Dyke, T.E., Rich, S., Kornman, K.S., Di Giovine, F.S., Hart, T.C. (2000) Genetic polymorphisms of the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  genes in African- American LJP patients and an African-American control population. *Journal of Periodontology* **71**, 723-728.
  62. Wilson, A.G., Vries, N., Pociot, F., Di Giovine, F.S., Duff, G.W. (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$ - promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles. *Journal of Experimental Medicine* **177**, 557-560.
  63. Yamazaki, K., Nakajima, T., Aoyagi, T., Hara, K. (1994) Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *Journal of Periodontology Research* **28**, 324-334.

## 6 DISCUSSÃO

Doenças Periodontais originam-se clinicamente de uma via que é similar a muitas doenças comuns envolvendo fatores microbiológicos, genéticos e comportamentais que, juntos, determinam as características da doença em um indivíduo específico. A resposta imuno-inflamatória é elemento chave para a compreensão de sua patogênia e as citocinas desempenham papel importante no desenvolvimento da doença. Embora patógenos periodontais sejam claramente os seus iniciadores e perpetuadores, existe aumentada evidência de que fatores do hospedeiro, incluindo os genéticos, são contribuintes importantes para a manifestação clínica da periodontite (MICHALOWICZ, 1994; HART & KORNMAN, 1997; BAKER, 2005).

Os resultados do presente estudo mostram que os pacientes com periodontite crônica severa, grupo PCS, estavam infectados, em sua maioria, por *Porphyromonas gingivalis*. Foi observada uma acentuada produção de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$  na cultura de células de sangue total (CCST) desses pacientes quando estimulada com extrato bruto de *P.gingivalis*. Quanto à resposta imune humoral, detectou-se significativamente elevada produção de IgG sérica anti-*P.gingivalis* no grupo PCS, em contraste com baixa produção no grupo NP, com predominância para a subclasse IgG4. Nos polimorfismos estudados, encontraram-se diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos do grupo PCS e NP em relação ao polimorfismo da IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> e ao alelo HLA-*DQB1*\*05.

Na realização de estudos que visam propor testes diagnósticos, geralmente faz-se necessária inclusão de indivíduos nas mais variadas classificações de gravidade de uma

enfermidade. Entretanto, neste trabalho, um dos objetivos foi conhecer melhor a resposta imune do indivíduo considerando-se a interação patógeno-hospedeiro na periodontite crônica. Assim, procedeu-se a dicotomização dos voluntários participantes da pesquisa em dois grupos extremos, comparando os indivíduos portadores de doença em estágio severo (grupo PCS) com indivíduos clinicamente saudáveis ou com periodontite leve de acordo com a classificação de 1999 da AAP (grupo NP). A avaliação estatística dos achados clínicos demonstrou que ambos os grupos em estudo estavam bem padronizados quanto à idade e ao número de dentes presentes na boca. A detecção de diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quando da análise do Índice de Sangramento Gengival (ISG), Índice de Sangramento à Sondagem (ISS) e Índice de Placa Visível (IPV) ratificou a existência de um maior desafio microbiano nos indivíduos com PCS e, conseqüentemente, sinais clínico-inflamatórios mais exacerbados, padrão usual de manifestação dessa forma comum de DP.

Os periodontopatógenos podem ser encontrados no biofilme dental de indivíduos periodontalmente saudáveis e, muito especialmente, de pacientes com DP, embora em diferentes prevalências entre os grupos (GRIFFEN *et al*, 1998; vanWINKELHOFF *et al*, 2002). Ademais, a presença de determinados microrganismos em bolsas profundas pode apresentar, verdadeiramente, um risco maior de perda de inserção (RAMS *et al*, 1996). *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais componentes do complexo “vermelho” de Socransky *et al* (1998), tem sido associada com o início e progressão da DP, principalmente em indivíduos adultos, sendo encontrada na maioria dos sítios com alta atividade de doença na periodontite crônica (CONDORELLI *et al*, 1998). Sua patogenicidade é representada por um grande número de fatores de virulência capazes de induzir intensa destruição tecidual. No presente estudo, 29 pacientes (67,4%) dos 43 do grupo PCS estavam infectados com *P.gingivalis*. Este achado é consistente com muitos outros estudos, cujas variações de prevalência em diversas regiões geográficas são sumarizadas no Quadro 1. Nos estudos de Ximénez-Fyvie *et al* (2000) e de Rudney *et al* (2003), a presença de *P.gingivalis* não foi observada em nenhum dos indivíduos controles. Isto corrobora com o presente trabalho em que esse periodontopatógeno não foi, também, detectado no grupo controle NP. Esta ausência de *P.gingivalis* em indivíduos periodontalmente saudáveis também constatada por Mayanagi *et al* (2004), pode evidenciar uma estreita associação dessa

espécie com a periodontite, como previamente reportado (TAKEUCHI *et al*, 2001; COLOMBO *et al*, 2002; KUMAR *et al*, 2003; YANG *et al*, 2004).

O entendimento da patogênese da DP ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que a resposta imuno-inflamatória é elemento chave para a sua compreensão e que as citocinas desempenham papel importante no desenvolvimento da doença. Muitas pesquisas têm sido direcionadas para os subtipos de linfócitos-T, que são distinguidos de acordo com a função da citocina secretada. Tanto células Th1 quanto Th2 podem ser encontradas na inflamação gengival. Alguns estudos relacionam a resposta Th1 à presença de doença periodontal estável, enquanto que as respostas Th2 parecem estar relacionadas à doença progressiva (GEMMELL & SEYMOUR, 2004). Ademais, considerável número de estudos mostra variação intersujeitos na produção de citocinas que pode ser influenciada por vários fatores inclusive genéticos. Esses estudos enfatizam a natureza multifatorial da regulação de citocinas. Indícios de que susceptibilidade a DP pode relacionar-se com diferenças individuais nas secreções de citocinas têm vindo de dados demonstrando que células mononucleares do sangue periférico de pacientes periodontais secretam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em resposta a estímulo padrão (McFARLANE *et al*, 1990; SHAPIRA *et al*, 1994).

Dentre os objetivos do presente trabalho foram realizados experimentos para avaliar a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue total (CCST) sob estímulo com antígenos bacterianos. Neste estudo, a contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada com o intuito de haver um maior controle sobre a quantidade e qualidade celular utilizada na CCST por indivíduo. Dessa forma, foram excluídos indivíduos que apresentaram valores absolutos dos leucócitos inferiores ou superiores aos valores de referência populacionais (NASCIMENTO, 2003). Nos indivíduos incluídos na pesquisa, observou-se que o número total de leucócitos e o número absoluto de neutrófilos foram estatisticamente superiores nos indivíduos com periodontite crônica severa em comparação ao grupo de voluntários não acometidos pela doença. Os estudos na literatura avaliando aspectos hematimétricos em indivíduos com periodontite são escassos. Christian *et al* (2002) observaram redução do número absoluto de leucócitos, número absoluto de neutrófilos e número de plaquetas após terapia periodontal não cirúrgica em indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada. Já Fokkema *et al* (2003), em indivíduos

com periodontite crônica, observaram redução do número total de leucócitos, números absolutos de linfócitos e eosinófilos e uma tendência à redução do número de neutrófilos e basófilos após tratamento da doença. No entanto, em um estudo anterior Fokkema *et al.* (2002) não observaram diferenças entre os valores de leucograma de indivíduos com e sem periodontite crônica.

IL-10 foi descrita primariamente como um fator inibidor de síntese de citocina (CSIF) secretada por células murinas Th2 e capaz de inibir o perfil de citocinas de células Th1, particularmente IFN- $\gamma$  (FIORENTINO *et al.*, 1989). Correntemente, existe um grande interesse nas propriedades regulatórias da IL-10 na resposta imune. No presente estudo foi observada uma acentuada produção de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$  sob os estímulos bacterianos testados, ou seja, *E.coli* e *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Esses resultados sugerem uma forte regulação da resposta imune celular especialmente a *P. gingivalis*. A alta proporção IL-10:IFN $\gamma$  encontrada pode ser devido à sinalização através de diferentes Toll Like Receptors (TLR). A maioria dos LPS das bactérias gram-negativas sinaliza através de TLR-4. Entretanto, Pg tem uma incomum sinalização TLR-2. Alguns autores sugerem não haver sinalização do LPS da Pg através TLR-4 (HIRSCHFIELD *et al.*, 2001) enquanto outros observaram um papel antagonista do LPS da Pg para este receptor (BAINBRIDGE & DARVEAU, 2001; YOSHIMURA *et al.*, 2002; COATS *et al.*, 2003). Contraditoriamente, foi reportada sinalização de Pg por meio de ambos receptores TLR-2 e TLR-4 (OGAWA *et al.*, 2002; DARVEAU *et al.*, 2004). Ogawa *et al.* (2002) sugeriram que, se corretamente purificada, LPS de Pg exerce sinalização por TLR-4 enquanto que moléculas associadas ao LPS de Pg, provavelmente lipoproteínas, sinalizam por meio de TLR-2. Isto é suportado por recentes estudos indicando que componentes de Pg, diferentes de LPS ou fimbria, usam sinalização TLR-2 e induzem alta secreção de citocinas (KASUMOTO *et al.*, 2004; ASAI *et al.*, 2005). Os experimentos de Martin *et al.* (2003) indicam sinalização de Pg através TLR-2 com o uso da via do fosfatidilinositol 3-cinase-Akt com uma conseqüente alta produção de IL-10 e baixa de IFN- $\gamma$ . Isto concorda com os achados observados na metodologia *ex-vivo* de CCST de pacientes periodontais usada no presente trabalho e é uma possível explicação molecular para esses resultados.

Uma significativa alta produção de IL-10 foi verificada nos sobrenadantes da CCST dos voluntários com PCS quando as células foram estimuladas com extrato de *P. gingivalis* e

LPS de *E. coli*, em comparação à dos indivíduos não acometidos pela doença. Lappin *et al* (2001), realizando um estudo imunohistoquímico em tecido de granulação de lesões periodontais, observaram que IL-10 foi a citocina mais abundante e fortemente expressa, seguida de IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-2. Entretanto, de acordo com Gemmell *et al* (2002), clones de células Th específicos para Pg induzem um perfil misto de elevada produção das citocinas IL-4 e IFN $\gamma$  e de baixa produção de IL-10. Isto leva à presunção de que, no presente estudo, as principais células produtoras de IL-10 podem não ter sido células Th. Monócitos, células B e células regulatórias são fontes prováveis (SEYMOUR *et al*, 1993).

LPS de *E.coli* é amplamente usada para avaliação de responsividade celular em diversas doenças e condições inflamatórias. Os resultados presentes indicam que sujeitos com PCS podem responder fortemente a estímulo inespecífico. Um experimento com CCST realizado por Nakamura *et al* (2004) demonstrou que mesmo baixas concentrações de LPS, tão baixas quanto aquelas observadas no sangue periférico de pacientes periodontais, podem primar monócitos e afetar a resposta imune dos sujeitos doentes. Fokkema *et al* (2002) observaram alta produção de PGE<sub>2</sub> e baixa produção de IL-12p40 em CCST estimulada com LPS de *E. coli* e sugeriram que este LPS induz resposta imune Th2. Entretanto, não observaram diferenças entre os sujeitos com e sem periodontite crônica nas produções de PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IL-10. Divergências nos resultados do presente estudo com aqueles obtidos por Fokkema e colaboradores podem ser devido às diferentes metodologias em relação aos critérios de diagnóstico da doença, variações na técnica CCST ou mesmo à variabilidade genética dos indivíduos que compuseram as amostras destes dois estudos.

Malefyt *et al* (1991) induziram bloqueio de IL-10 endógena com o uso de anticorpos anti-IL-10 em cultura de monócitos e observaram que IL-10 endógena contribui para redução de secreção de citocinas por monócitos estimulados. Esses resultados coincidem com a associação negativa encontrada no presente estudo entre a concentração basal de IL-10 (SE), e de IFN- $\gamma$  produzida sob estímulo de extratos bacterianos. Receptores de IL-10 e IFN- $\gamma$  possuem via de sinalização JAK/STAT. IL-10 promove sinalização por meio de STAT3 e IFN- $\gamma$  via STAT1 (YOSHIMURA *et al*, 2003). SOCS1 é uma proteína que regula negativamente a transdução de STAT-1 e IL-10 é um indutor da produção de SOCS-1. Isto

explica parcialmente o mecanismo pelo qual a IL-10 pode inibir a produção de IFN- $\gamma$  (YOSHIMURA *et al*, 2003; PESTKA *et al*, 2004).

No presente estudo, variações individuais na produção de citocinas foram verificadas bem como detectada grande amplitude de valores, fato também observado por Kobayashi *et al*. (2000). Observou-se uma maior produção de IFN- $\gamma$  entre os indivíduos do grupo NP em relação aos pacientes do grupo PCS. Estudos de osteoimunologia têm provido evidências de complexas redes de regulação de citocinas associadas com a osteoclastogênese. Entretanto, a exata contribuição do IFN- $\gamma$  para a perda óssea alveolar *in vivo* não está perfeitamente esclarecida. Alguns estudos têm sugerido um efeito inibitório do IFN- $\gamma$  sobre a osteoclastogênese (OHISHI *et al*, 2005; PANG *et al*, 2005). Takayanagi (2005) enfatiza que a perda óssea pode ser atribuída a um inadequado controle do metabolismo ósseo pelo sistema imune e que níveis menores de IFN- $\gamma$  facilitaria a ação de RANKL sobre a diferenciação de osteoclastos, o que justificaria os achados deste experimento. Por outro lado, existe evidência que IFN- $\gamma$  pode exercer um papel no aumento da osteoclastogênese (KOTAKE *et al*, 2005). Em camundongos, a produção de IFN- $\gamma$  aumenta, em paralelo com LPS, a indução de reabsorção óssea (MORIYAMA *et al*, 2002). No estudo de Baker *et al* (1999) camundongos IFN- $\gamma$  nocaute manifestaram significativamente perda óssea alveolar reduzida após desafio com *P. gingivalis*.

Foram observados níveis mais elevados de IgG sérica anti-*P.gingivalis* no grupo PCS em relação ao grupo NP, resultados que encontram consonância na literatura (EBERSOLE *et al*, 1986; LOPATIN & BLACKBURN, 1992). Embora isto tenha sido verificado, algumas exceções foram observadas, destacando-se dois indivíduos no grupo NP que apresentaram níveis extremamente elevados daquela IgG, sendo classificados como altos respondedores (NP<sup>ar</sup>). Já no grupo com periodontite crônica severa, os pacientes PCS1 e PCS14 foram classificados como baixos respondedores. No entanto, as concentrações de IL-10 e IFN- $\gamma$  desses indivíduos não destoavam da média do grupo PCS. Esses fatos ressaltam as grandes variações individuais na resposta imune ao periodontopatógeno. A análise estatística pelo coeficiente de correlação de Spearman detectou uma correlação positiva entre os níveis séricos de IgG anti-*P.gingivalis* e a concentração de IL-10 produzida *in vitro* sob estímulo de extrato dessa bactéria. Ademais, houve também uma correlação positiva entre IgG sérica anti-*P.gingivalis* e os parâmetros clínicos IP, ISG e



ISS, o mesmo não acontecendo em relação a PS e NIC. Schenck *et al* (1985) também observaram uma correlação negativa entre IgG sérica anti-LPS de *P. gingivalis* e o número de bolsas periodontais com PS  $\geq$  5 mm.

Quanto aos subgrupos de IgG, alguns estudos na literatura observaram a predominância da subclasse IgG2, cuja produção é dependente de IFN- $\gamma$ , na resposta imune humoral a *P. gingivalis* (LOPATIN & BLACKBURN, 1992; WHITNEY *et al*, 1992; POLAK *et al*, 1995). No entanto, em estudos prévios do laboratório onde foi realizado este trabalho, Trindade (2005) detectou uma acentuada produção de IgG4 anti-*P.gingivalis*, sendo que esta subclasse foi a que melhor distinguiu os grupos com periodontite e clinicamente sadio. A IgG4 é uma subclasse cuja produção depende de IL-4. Wilton *et al* (1993) encontraram evidências que sugerem uma produção local de IgG4 nos tecidos periodontais em contraste com as outras subclasses de IgG que aparentam ser oriundas do plasma. Isto indica que a IgG4 pode ter uma importância ainda não totalmente compreendida na resposta imune aos microrganismos do biofilme dental. Esses mesmos autores observaram uma correlação negativa entre a IgG4 do fluído gengival e a gravidade da doença. Já Gemmell *et al* (2004b), em um estudo imunohistoquímico em biópsias gengivais, observaram um aumento no número de células B IgG4+ em comparação a células IgG2+ em indivíduos com periodontite em contraponto aos achados dos indivíduos com periodonto clinicamente sadio ou gengivite, também verificando uma proporção direta entre o número de células B IgG4+ e a gravidade da doença.

Como visto, no presente trabalho, foi detectada nos sobrenadantes de cultura uma alta produção de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$  sob estímulo de *P. gingivalis*. Encontrou-se uma correlação negativa entre a IgG sérica anti-*P.gingivalis* e a concentração basal de IFN- $\gamma$ , bem como uma correlação positiva entre a IgG sérica anti-*P.gingivalis* e a concentração basal de IL-10. Esses resultados convergem aos achados de Trindade (2005), apesar de ter sido realizado com grupos de voluntários distintos, e sugerem que a *P. gingivalis* desvia a resposta imune para um perfil Th2, com produção de anticorpos IgG4 incapazes de promover mecanismos efetores protetores como a ativação do sistema complemento ou opsonização eficaz. Este perfil de baixa produção de IFN- $\gamma$  verificado nos pacientes do grupo PCS concorda com o fato de que na análise do polimorfismo IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup>, o fenótipo

previsto baixo produtor (genótipo homocigoto do alelo 2 [AA]) apresentou-se com maior frequência neste grupo.

Juntos, os resultados observados no presente trabalho estão de acordo com a hipótese sugerida por Bainbridge & Darveau (2001) de que um periodonto clinicamente sadio é mantido por uma resposta imune inata altamente orquestrada que protege o hospedeiro contra a infecção. Esses autores propuseram que *P. gingivalis* possui um papel na ruptura desse equilíbrio dinâmico entre o hospedeiro e a microbiota e que isto interfere com a habilidade do hospedeiro em recrutar neutrófilos para os sítios infectados por inibir a expressão de IL-8 de células epiteliais expostas ao seu LPS. Nos achados deste trabalho, a ausência de *P. gingivalis* nos indivíduos do grupo controle NP corrobora com a assertiva dessa hipótese. Já a alta proporção IL-10:IFN- $\gamma$  observada neste estudo em resposta ao extrato bruto de *P. gingivalis*, bem como a predominância de produção da IgG4, podem evidenciar as peculiaridades da resposta imune a esta bactéria, associada ao caráter crônico da doença, concordando com o modelo de transição de lesão periodontal estável para lesão progressiva efetuar-se sob o perfil de uma resposta imune do tipo Th2 (GEMMELL & SEYMOUR, 2004).

Embora evidências de que variações na resposta imune do hospedeiro frente à agressão bacteriana estão em parte sob controle genético, tornando estes fatores hereditários determinantes importantes da susceptibilidade e expressão da DP (MICHALOWICZ *et al*, 1991; MICHALOWICZ, 1994; HART & KORNMAN, 1997; KORNMAN & GIOVINE, 1998; SCHENKEIN, 1998; WILSON, 1999; MICHALOWICZ *et al*, 2000; BAKER, 2005), esta associação não se encontra perfeitamente estabelecida.

Estudos sobre a variação intersujeitos na produção de citocinas, em associação com a periodontite crônica, foram sumarizados no Quadro 2, verificando-se que a hipersecreção de vários mediadores encontra-se relacionada com a DP. Os mecanismos biológicos que dão suporte à associação entre genótipo positivo e DP repousam na hipótese de que polimorfismos genéticos podem modular a secreção de citocinas. Estes achados advêm desde o estudo clássico de Kornman *et al* (1997), suportando a hipótese de que um fenótipo hiper-inflamatório, em certos indivíduos, conta para a susceptibilidade para determinadas condições inflamatórias crônicas como a periodontite. Desta forma, indivíduos que

possuem certos alelos que codificam para a expressão de fenótipos hiper-responsivos de algumas citocinas parecem ser susceptíveis, ou protegidos, à maior severidade da DP. Níveis elevados de IL-1 $\beta$  no tecido periodontal e no fluido gengival crevicular (FGC) foram repetidamente associados a sítios com doença severa, bem como a pacientes portadores de genótipos polimórficos específicos para esta citocina (STASHENKO *et al*, 1991; POCIOT *et al*, 1992; ENGBRETSON *et al*, 1999; GALBRAITH *et al*, 1997; GALBRAITH *et al*, 1999; FIGUEREDO *et al* 1999). Esses níveis aumentados também têm sido relatados para outras citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 (YAMAZKI *et al*, 1994; BOSTRÖM *et al*, 1999; GORSKA *et al*, 2003; HOLLA, 2004) e TGF- $\beta$  (STEINSVOLL *et al*, 1999; CEZÁRIO & FIGUEREDO, 2004).

Em relatos recentes, a associação da DP com os polimorfismos dos genes das citocinas IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> (GORE *et al*, 1998; GALBRAITH *et al*, 1999; ROGERS *et al*, 2002; LOPEZ *et al*, 2005), TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> (GALBRAITH *et al*, 1999), IL-6<sup>-174G/C</sup> (TREVILATTO *et al*, 2003; HOLLA *et al*, 2004), TGF- $\beta$ 1<sup>códons 10T/C e 25G/C</sup> (HOLLA *et al*, 2002), IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup> (PRAVICA *et al*, 1999) e IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> (BERGLUNDH *et al*, 2003; DASHASH *et al*, 2005) tem sido avaliada com resultados ainda não conclusivos. Um dos propósitos deste trabalho foi estudar esses polimorfismos de forma conjunta, considerando o importante papel que essas citocinas desempenham na regulação da resposta imune dos indivíduos à agressão das bactérias do biofilme dental. Este trabalho é o primeiro, a partir da literatura consultada que aborda o estudo desses polimorfismos, conjuntamente, em relação a periodontite crônica.

Enquanto Kornman *et al* (1997) reportaram uma associação entre os polimorfismos da IL-1 e periodontite do adulto, vários outros estudos (Quadro 4) provieram evidências variáveis que têm confirmado (GORE *et al*, 1998; McGUIRE & NUNN, 1999; GALBRAITH *et al*, 1999; McDEVITT *et al*, 2000; CULLINAN *et al*, 2001; PAPAPANOU *et al*, 2001; LOPEZ *et al*, 2005) ou rejeitado (LAINE *et al*, 2001; ROGERS *et al*, 2002; SAKELLARI *et al*, 2003; TREVILATTO *et al*, 2003) essa relação. Diferenças nos resultados entre os estudos podem ser devidas a vários fatores. Heterogeneidade na frequência dos polimorfismos IL-1 nas populações estudadas devido a variações étnicas podem explicar algumas diferenças. Por exemplo, Armitage *et al* (2000) encontraram que somente 2,3% de indivíduos de hereditariedade chinesa portavam o genótipo composto IL-

1 positivo (alelo 2 da IL-1 $\alpha$ <sup>+4845</sup> e da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup>), associado ao risco. Da mesma forma, Anusaksathien *et al* (2003) verificaram que somente 1,6% dos indivíduos de um grupo étnico de Thai portava esse genótipo composto. Já Walker *et al* (2000), estudando uma população afro-americana, reportaram que a prevalência desse genótipo positivo era 14% no grupo controle e 8% na forma localizada de periodontite agressiva. Devido à alta frequência do alelo 1 da IL-1 $\beta$ <sup>+3954(C)</sup> (99% de controles e 100% de pacientes), com a maioria dos sujeitos sendo homocigotos para este alelo, este polimorfismo forneceu pequena informação para a periodontite agressiva em afro-americanos. Já no presente estudo, o alelo 2 da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup>, relacionado ao risco, foi observado, com tendência de significância estatística ( $p=0,08$ ), em 21,25% dos pacientes com periodontite crônica, grupo PCS, e em 10,53% dos indivíduos sem periodontite (NP), grupo controle.

Segundo Kinane *et al* (2003) a manifestação dos sinais clínicos significativos na periodontite crônica não acontece até a terceira década de vida enquanto que, para a periodontite agressiva, pode ocorrer na primeira, segunda, terceira e quarta décadas. Esta variabilidade dificulta o diagnóstico da DP e pode ser considerado um fator de confusão em estudos sobre esta doença. Por outro lado, resultados contraditórios encontrados em vários estudos podem também ser explicados pelas diferenças nos critérios diagnósticos usados para definir DP, pela inclusão de outros fatores de risco, por baixo número de sujeitos estudados e as características dos controles. Também, existe evidência de que fatores ambientais, culturais, e sócio-econômicos, podem incrementar a iniciação da periodontite e que esta iniciação da doença pode ser evitada ou minimizada por medidas preventivas pessoais ou profissionais. Porquanto existam muitos fatores que influenciam a iniciação, progressão, e severidade das DPs, é importante que os sujeitos usados para estudar a associação entre DPs e fatores genéticos devam ser indivíduos que não estão sob tratamento periodontal, profilaxia dental, ou instruções de higiene oral (KINANE *et al*, 2003).

Uma importante característica deste estudo é que os sujeitos foram selecionados de uma população homogênea com similar status étnico, sócio-econômico, nível de educação, e outros dados demográficos, conforme apresentados na Tabela 1. Adicionalmente, nenhum tinha recebido terapia periodontal ou instruções individual ou pessoal de como prevenir DP. Por outro lado, os critérios de exclusão foram bastante rígidos sobre condições que,

reconhecidamente, interferem no desenvolvimento da DP, como o fumo. Foi estabelecida uma faixa etária mais condizente com o tipo de doença estudada, entre 30 e 50 anos, e adotados os critérios diagnósticos da Academia Americana de Periodontologia, pela sua abrangência mundial, cujos exames foram executados por investigador calibrado ( $\kappa$  0,81). O tamanho da amostra, similar a vários estudos, foi o possível obtido a partir da rigorosa seleção feita entre os indivíduos oriundos do Distrito-Sanitário Cabula-Beirú e demandados à atenção do Curso de Odontologia da EBMSP/FBDC, durante os dois semestres letivos de 2004, e que atendessem aos critérios de inclusão/exclusão estabelecidos para esta investigação. Assim, buscou-se observar condições as mais apropriadas possíveis na população amostral visando à sua adaptabilidade ao estudo da associação entre DP e fatores genéticos.

A população brasileira apresenta uma grande diversidade genética. A amostra estudada representa um grupo antropogenético resultante da miscigenação entre três elementos étnicos: caucasóides (brancos), negros e ameríndios. Todos os pacientes que participaram da pesquisa eram mestiços (KRIEGER *et al*, 1965) e foram classificados como mulato claro (38,10%), mulato médio (51,19%) ou mulato escuro (10,71%). A identificação de fatores genéticos, como o HLA, associados a 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. Em vista disto, 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 trabalho, foi estudada a possível associação da Periodontite Crônica Severa e alelos do HLA de classe II na amostra de mestiços investigada. Foi observada uma frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do alelo HLA-*DQB1*\*05 nos indivíduos do grupo controle NP, comparada aos pacientes do grupo PCS, podendo sugerir ser este alelo um marcador genético de proteção para o desenvolvimento da periodontite crônica severa, nessa população. Contrariamente, Ohyama *et al* (1996) assinalaram que este alelo seria um fator de predisposição genética para a periodontite agressiva, em japoneses, estabelecendo uma sugestão de que essas duas formas de periodontite podem tratar-se de doenças com diferentes perfis genéticos.

No presente estudo, o genótipo mais freqüente de IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> foi o homozigoto para o alelo 1 (CC), que se apresentava significativamente (p=0,03) com maior freqüência no grupo controle NP (81,48%) do que no grupo caso PCS (65%), como tem sido encontrado em outros estudos (GORE *et al*, 1998; GALBRAITH *et al*, 1999; ARMITAGE *et al*, 2000; WALKER *et al*, 2000; CULLINAN *et al*, 2001; PAPAPANOU *et al*, 2001; ROGERS *et al*, 2002; MEISEL *et al*, 2002; SAKELLARI *et al*, 2003; LOPEZ *et al*, 2005). Depreende-se disto que a homozigose do alelo 1 (C) aparenta ser um fator de proteção para o desenvolvimento da periodontite crônica. De outra forma, Parkhill *et al* (2000) estudaram uma amostra de 142 indivíduos caucasianos e encontraram que esse genótipo homozigoto era o mais freqüente em pacientes com periodontite agressiva (N=70), enquanto que o genótipo heterozigoto era o mais freqüente em indivíduos controles sadios (N=72). Diehl *et al* (1999) também encontraram que o alelo 1 da IL-1B era provavelmente mais importante para o risco de periodontite agressiva em uma população heterogênea de afro-americanos e caucasianos. Os achados desses dois estudos podem guardar uma relação com o presente trabalho na medida em que foi verificado que o genótipo homozigoto (CC) para o alelo 1 da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C)</sup>, fenótipo previsto de baixa produção, pode ser um fator protetor para o desenvolvimento da periodontite crônica severa e, inversamente, o genótipo heterozigoto deste alelo mostrou-se mais elevado nos pacientes com a doença (27,5%) do que nos controles (15,79%). A associação positiva entre o alelo 1 da IL-1B e periodontite agressiva encontrada em ambas populações de caucasianos (DIEHL *et al*, 1999; PARKHILL *et al*, 2000) e de afro-americanos (WALKER *et al*, 2000) e a associação negativa deste alelo com periodontite crônica encontrada no presente estudo, pode sugerir diferentes perfis genéticos para as duas formas de periodontite.

A observação de uma maior freqüência do alelo 2 da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> nos pacientes PCS (21,25%) do que nos controles NP (10,53%), com tendência de significância estatística para esta diferença (p=0,08), concorda com outros autores que reportaram alta prevalência do alelo 2 em periodontite crônica avançada (KORNMAN *et al*, 1997; GALBRAITH *et al*, 1999; McDEVITT *et al*, 2000; CULLINAN *et al*, 2001; PAPAPANOU *et al*, 2001; THOMSON *et al*, 2001; ROGERS *et al*, 2002; e LOPEZ *et al*, 2005). Ademais, os fenótipos previstos de alta produção (genótipos TT+CT) tiveram, neste trabalho, uma representação mais elevada nos pacientes PCS (35%) do que nos controles NP (18,42%),

corroborando os estudos que estimam ser esse alelo 2 da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> – o menos comum observado nas populações - e genótipos respectivos, um fator de risco para a periodontite crônica.

O Quadro 5 relaciona os principais achados de trabalhos realizados por vários autores, com diversas amostras populacionais, sobre a observação da frequência dos polimorfismos dos genes das citocinas TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup>, IL-6<sup>-174G/C</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+874T/A</sup>, IL-10<sup>-1082G/A,-819C/T,-592C/A</sup> e TGF- $\beta$ <sub>1</sub><sup>códons 10T/C e 25G/C</sup>. Nos resultados do presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto à frequência desses polimorfismos entre os grupos caso PCS e controle NP.

Devido ao seu importante papel como citocina pró-inflamatória que atua, juntamente com a IL-1, principalmente na ativação da resposta inata, o locus TNF na região classe III do MHC tem sido alvo de atenção para estudos de genes candidatos em doenças auto-imunes e inflamatórias. Porém, devido ao alto grau de desequilíbrio de ligação dentro do MHC, fica difícil determinar quais genes em um haplótipo são importantes na etiologia de uma doença. O polimorfismo TNF- $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> foi associado com uma proporção 8 vezes maior de atividade transcricional *in vitro* (KORNMAN & Di GIOVINE, 1998) enquanto Engebretson *et al* (1999) verificaram que as quantidades totais de TNF- $\alpha$ , no FGC, estavam elevadas e significativamente correlacionadas para os pacientes genótipos-positivos com DP. Os resultados sobre o TNF $\alpha$ <sup>-308G/A</sup> mostraram que o homocigoto do alelo 1 (GG), fenótipo previsto baixo produtor, teve, percentualmente, uma frequência mais elevada entre os indivíduos do grupo controle (82,93%) do que nos do grupo caso (76,74%); inversamente, o percentual observado quanto ao conjunto de genótipos cujos fenótipos previstos são de alta produção (GA+AA) foi maior entre os casos (23,26%) do que nos controles (17,07%). Estes achados sugerem, juntamente com aqueles que foram observados para a IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>, que a maior produção dessas citocinas estaria mais associada aos pacientes que compunham o grupo caso PCS do que àqueles sujeitos do grupo controle NP. Enquanto Galbraith *et al* (1999) indicaram que polimorfismo do gene do TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> estava elevado no grupo com periodontite avançada, outros autores não conseguiram mostrar associação entre os polimorfismos desse gene e a susceptibilidade ou severidade da doença periodontal (CRAANDIJK *et al*, 2002; FOLWACZNY *et al*, 2004; DONATI *et al*, 2005).

Já em japoneses, Soga *et al* (2003) observaram que os polimorfismos TNF $\alpha$ <sup>-308 e -238</sup> que são majoritariamente encontrados em caucasianos, foram raramente detectados nessa população, salientando que, devido à maior frequência nos pacientes periodontais dos polimorfismos SNPs TNF $\alpha$ <sup>-1031,-863 ou -857</sup> do que nos indivíduos saudáveis, estes polimorfismos parecem estar associados com periodontite crônica severa em populações japonesas.

Mecanismos de destruição tecidual na doença periodontal inflamatória crônica não têm sido bem claramente definidos, embora vários mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias possam estar envolvidas (GEMMELL *et al*, 1997). Entre as várias citocinas candidatas para estudar-se essa relação, o gene IL-6 representa um bom elemento para estudo devido ao papel central que esta citocina tem na regulação da inflamação e processos de reabsorção óssea. Níveis elevados de IL-6 têm sido encontrados no plasma ou no FGC de pacientes com periodontite. Ademais, foi observado que o alelo 2 da IL-6<sup>-174(C)</sup> e genótipo homocigoto CC estão associados com baixos níveis de IL-6 (FISHMAN *et al*, 1998). Os resultados deste estudo indicaram que este genótipo homocigoto do alelo 2 (CC), fenótipo previsto como baixo produtor, teve frequência muito reduzida na amostra estudada, enquanto que os genótipos homocigoto para o alelo 1 (GG) e heterocigoto (GC), cujo fenótipo previsto é de alta produção, foram predominantes e praticamente equivalentes entre casos (95,35%) e controles (97,56%). Estes achados são concordes com o trabalho de Holla *et al* (2004) que não encontrou diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas da IL-6<sup>-174G/C</sup> entre ambos os grupos. Entretanto, os autores sugeriram que o polimorfismo IL-6<sup>-572G/C</sup> pode ser um dos fatores de proteção associados com baixa susceptibilidade a periodontite crônica. Já Trevilatto *et al* (2003) estudaram o polimorfismo IL-6<sup>-174</sup> em 84 indivíduos brasileiros caucasianos, não fumantes, maiores de 25 anos. Os resultados apresentados sugeriram uma associação entre a presença do polimorfismo e a severidade da doença. Embora os vários aspectos desse estudo sejam similares aos da presente investigação, inclusive o tamanho da amostra, o elemento étnico pode ter sido o fator preponderante de diferença no resultado da positividade apontada para o polimorfismo da IL-6<sup>-174</sup>, em contraposição com a ausência de associação que o presente trabalho verificou, conforme visto em outros estudos abordando fatores genéticos.

Muitos estudos têm examinado a associação dos polimorfismos do TGF- $\beta$ <sub>1</sub> com várias doenças, refletindo a importância desta citocina nas doenças inflamatórias, uma vez ser este



fator de crescimento uma citocina multifuncional, por apresentar propriedades ao mesmo tempo inflamatórias e imunossupressoras, possuindo um importante papel na remodelação tecidual e no metabolismo ósseo, sobretudo das doenças periodontais (HOLLA *et al*, 2002). Na avaliação dos polimorfismos do TGF- $\beta_1$  (códons 10T/C e 25G/C) (Tabela 5), os fenótipos previstos para alta produção foram predominantes entre os grupos caso e controle, e poucos fenótipos previstos para baixa produção foram observados, ambos sem diferenças significativas. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Holla *et al* (2002) que não reportaram diferenças estatisticamente significantes na distribuição das frequências alélicas e genotípicas para nenhum dos polimorfismos estudados (TGF- $\beta_1$  <sup>-988 (C/A), -800 (G/A), -509 (C/T), códons 10 (L10P) e 25 (R25P)</sup>) entre os grupos teste e controle, mesmo quando o fator fumo foi incluído na análise. Por outro lado, os achados deste estudo divergiram daqueles mostrados por Souza *et al* (2003) que verificaram uma diferença significativa na frequência do alelo T, em brasileiros, entre o grupo com periodontite severa (57.7%) e os grupos com periodontite moderada (35.4%) e com saúde (37.8%), e entre as frequências do genótipo TT nos três grupos, respectivamente, 38.5%, 12.6%, e 8.0%. Entretanto, o polimorfismo estudado foi na posição -509 (C/T). A inconsistência dos achados desses estudos pode ser explicada, sobretudo, pela dualidade de funções que o TGF- $\beta_1$  apresenta em relação à resposta imuno-inflamatória de defesa do hospedeiro. Como um regulador bifuncional dos eventos inflamatórios, esta citocina pleiotrópica pode, ao mesmo tempo, promover ou suprimir a inflamação, dependendo do contexto biomolecular em que é sintetizada ou secretada. Assim, tanto uma maior como uma menor expressão do TGF- $\beta_1$  pode influenciar na progressão da periodontite crônica, em suas várias gradações de atividade da doença (TONETTI & MOMBELLI, 1999).

Um paradigma central de imunorregulação está baseado no reconhecimento de que durante a resposta imune à infecção subpopulações distintas de células T se desenvolvem e que essas subséries podem ser classificadas por seu perfil de secreção de citocinas. Citocinas tipo 1, como IFN- $\gamma$ , mediam respostas Th1 e estão primariamente envolvidas na imunidade mediada por células. A secreção de IFN- $\gamma$  é um aspecto chave de respostas Th1, servindo para promover uma resposta dirigida para a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos. Teoricamente, a secreção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T, e a presença de IL-12, determinando um perfil para Th1, poderiam ser aspectos chave de uma lesão periodontal

estável (SEYMOUR & GEMMELL, 2001). Nos resultados deste trabalho, embora sem significância estatística, o fenótipo previsto baixo produtor (genótipo homocigoto do alelo 2 [AA]) apresentou-se com maior frequência no grupo de pacientes PCS (51,16%) do que no grupo controle NP (36,59%). Por outro lado, coerentemente, o fenótipo previsto alto produtor – genótipo homocigoto do alelo 1 (TT) – foi observado em menor frequência no grupo caso (4,65%) do que no controle (12,9%), sugerindo um perfil de menor proteção à severidade da doença nos pacientes do grupo PCS. Estes achados corroboram com o fato de que foi observada uma baixa produção de IFN- $\gamma$  na CCST dos pacientes do grupo PCS, tanto basal quanto sob estímulo com *P.gingivalis*.

O alelo 2 da IL-10<sup>-1082\*A</sup> tem sido apontado como fator de risco para muitas doenças humanas (HELMINEN *et al*, 1999; TAGORE *et al*, 1999; LIO *et al*, 2003; ABBAS *et al*, 2003). Dashash *et al* (2005) encontraram igual correlação nos seus achados, estudando susceptibilidade de crianças à gengivite. Por outro lado, também observaram, nesse estudo, uma associação do alelo 1 IL-10<sup>-1082\*G</sup>, como fator de proteção contra a gengivite naquelas crianças; isto está de acordo com o estudo de Lio *et al* (2002) que mostraram ter este alelo um papel protetor contra a inflamação e que isto pode aumentar a longevidade dos homens. O alelo 1 da IL-10<sup>-1082\*G</sup> está associado com a produção aumentada de IL-10 e, o alelo 2 da IL-10<sup>-1082\*A</sup> associa-se com a diminuição no nível desta citocina (TURNER *et al*, 1997). Nesta investigação, as frequências alélicas observadas para os polimorfismos IL-10<sup>-819</sup> e IL-10<sup>-592</sup> foram absolutamente idênticas para os grupos caso PCS e controle NP, inversamente às observadas para o polimorfismo IL-10<sup>-1082</sup>. As frequências dos alelos 1 e 2 da IL-10<sup>-1082</sup> foram semelhantes entre casos e controles, predominando o alelo 2 IL-10<sup>-1082\*A</sup> na amostra estudada. Na análise da produção de citocinas realizada no presente trabalho, verificou-se que os pacientes com periodontite crônica severa (PCS) tiveram uma alta produção de IL-10 quando a sua CCST foi estimulada com *P.gingivalis* indicando, provavelmente, uma resposta do tipo Th2. Isto pode concordar com os achados de Dashash *et al* (2005) que encontraram uma associação do alelo 1 IL-10<sup>-1082\*G</sup> (fenótipo previsto como de alta produção) como fator de proteção contra gengivite, uma lesão de caráter estável, em crianças, diferentemente dos presentes resultados que encontraram uma elevada produção de IL-10 nos pacientes com periodontite crônica severa, uma lesão de caráter progressivo, em adultos. Corroboram com esta hipótese os achados de Berglundh *et al* (2003) que

observaram uma proporção significativamente maior na presença daquele alelo 1 IL-10<sup>1082\*G</sup>, e genótipo GG, nos pacientes (suecos, caucasianos, 36-74 anos, N=60) com periodontite crônica generalizada severa do que nos controles (indivíduos com saúde periodontal, 35-78 anos, N=39). Diferentemente desses achados, Yamazaki *et al* (2001) verificaram a ausência do alelo 1082\*<sup>G</sup> na população japonesa mas, igualmente aos resultados aqui apresentados, também não observaram associação entre o polimorfismo no gene IL-10 e periodontite. Da mesma forma, Gonzales *et al* (2002) não observaram associação entre a presença do polimorfismo IL-10<sup>-597 e -824</sup>, nos alelos A e T, e a manifestação clínica de periodontite crônica e agressiva. Atualmente, o papel pivô da IL-10 em regular o balanço entre citocinas pró-inflamatórias *versus* anti-inflamatórias tem sido usado em medicina no tratamento de diferentes doenças como sepse, psoríase, hepatite, pancreatite, anemia hemolítica, tuberculose, e doença gastro-intestinal (BEEBE *et al*, 2002, ASADULLAH *et al*, 2002). Se o papel protetor da IL-10 contra a inflamação gengival, conforme indicou Dashash *et al* (2005), for bem estabelecido, a aplicação terapêutica desta citocina poderá ser considerada, no futuro, para o manuseio das doenças gengivais.

Periodontite crônica é provavelmente uma doença genética complexa. Em um dos seus estudos em gêmeos, Michalowicz *et al* (2000) estimaram que cerca de 50% da periodontite crônica é devido à variância genética. Em contraste com doenças genéticas simples que podem ser causadas por uma única mutação genética, é plausível que o efeito aditivo de múltiplos genes seja um determinante de susceptibilidade em doenças complexas como a periodontite crônica. Desta forma, os polimorfismos genéticos que contribuem para susceptibilidade a uma doença não são, individualmente, determinísticos da doença. Interações entre formas polimórficas de genes críticos podem atuar em conjunto com fatores ambientais, complicando mais o modelo da doença. Em semelhante modelo, um só alelo de gene pode contribuir para a susceptibilidade, mas pode não fazer uma ampla e suficiente contribuição ao resultado da doença. Entretanto, polimorfismos genéticos têm sido usados historicamente como marcadores genéticos para identificar genes causadores de doenças em estudos de associação (RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE of AAP, 2005).

Neste trabalho, embora só houvesse resultados de significância estatística para o estudo dos polimorfismos da IL-1 $\beta$ <sup>+3953C/T</sup> e do HLA-DQB1\*05, alguns dos demais achados,

conforme visto anteriormente, assinalaram para a possibilidade da concorrência de outros polimorfismos para o perfil de proteção e/ou de risco para a periodontite crônica severa nos indivíduos estudados, atendendo ao pressuposto de ser esta forma de DP uma doença sob influência poligênica. O esforço em identificar um perfil microbiano, de resposta imune, e imunogenético que possa interferir no desenvolvimento da periodontite crônica, a mais comum das várias formas de DP, na população desta região do país, agrega conhecimentos sobre os fatores que concorrem para a progressão da doença, podendo colaborar para melhorar o manuseio dos pacientes periodontais, em sua prevenção e tratamento, e na manutenção da saúde periodontal da nossa comunidade.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos deste estudo, realizados em conformidade com a metodologia e padronização explicitadas, sugerem que:

1. Indivíduos com periodontite crônica severa podem apresentar números mais elevados de leucócitos totais devido a um aumento no número absoluto de neutrófilos, sendo necessários estudos futuros que confirmem estes achados;
2. Os extratos antigênicos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 estimulam elevada produção de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$  em cultura de células de sangue total de pacientes com periodontite crônica severa;
3. Parece haver uma forte regulação da resposta imune celular a *Porphyromonas gingivalis*, sendo que esta bactéria estimulou uma elevada proporção da concentração das citocinas IL-10:IFN- $\gamma$ , podendo sugerir um desvio da resposta imune para um perfil Th2;
4. Os indivíduos com periodontite crônica severa produzem concentrações mais elevadas de IL-10 do que os não acometidos pela doença, quando suas células são estimuladas com LPS de *E. coli* e extrato bruto de *Porphyromonas gingivalis*;
5. A concentração basal de IL-10 parece exercer influência na produção de IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo de *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que se observa uma correlação negativa na produção dessas citocinas;
6. Pacientes com periodontite crônica severa apresentam níveis séricos mais elevados de IgG anti-*Porphyromonas gingivalis* do que indivíduos não acometidos pela doença, com predominância da subclasse IgG4;

7. A resposta imune humoral a *Porphyromonas gingivalis* é negativamente correlacionada com a concentração basal de IFN- $\gamma$  e positivamente correlacionada com a concentração de IL-10, produzidas em CCST dos indivíduos estimulada com essa bactéria.
8. O genótipo homozigoto do alelo 1 (CC) da IL-1 $\beta$ <sup>+3953(C)</sup> pode ser um fator de proteção e o alelo 2 IL-1 $\beta$ <sup>+3953(T)</sup> pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite crônica severa;
9. O alelo HLA-DQB1\*05 pode ser um marcador genético de proteção para o desenvolvimento da periodontite crônica severa na população de mestiços de Salvador/BA/BR.