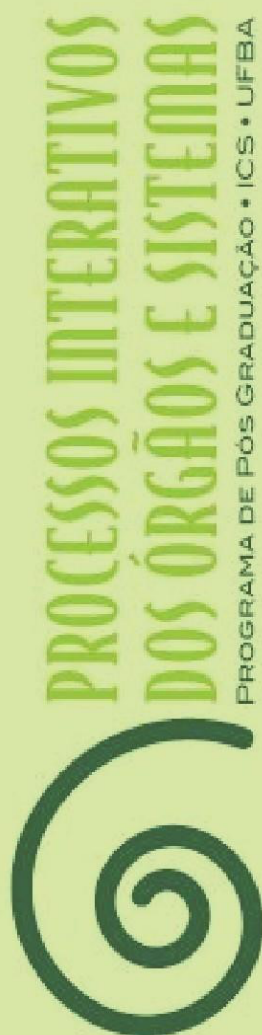


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

JAIZA KÊNSULY MOURA PINHEIRO CARNEIRO

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO
GENE *NELL1* COM A PRESENÇA DA
PERIODONTITE



Salvador

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



JAIZA KÊNSULY MOURA PINHEIRO CARNEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *NELL1* COM
A PRESENÇA DA PERIODONTITE**

Salvador, BA
2023

JAIZA KÊNSULY MOURA PINHEIRO CARNEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *NELL1* COM
A PRESENÇA DA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Orientação da Prof.^a Dr.^a Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto e coorientação da Prof.^a Dr.^a Camila Alexandrina Figueiredo.

Salvador, BA
2023

-
- C289a Carneiro, Jaiza Kênsuly Moura Pinheiro.
Associação de variantes genéticas do gene Nell-1 com a presença da periodontite / Jaiza Kênsuly Moura Pinheiro Carneiro. – 2023.
74 f.: il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 20203.
"Orientadora: Profª Drª Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto"
"Co-orientadora: Profª Drª Camila Alexandrina Figueiredo"
1. Doenças periodontais. 2. Periodontite. 3. Variante genética. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. 5. Fator de crescimento epidérmico. I. Carletto, Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz. II. Figueiredo, Camila Alexandrina. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.
- CDU 616.314.17
-

JAIZA KÊNSULY MOURA PINHEIRO CARNEIRO

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *NELLI* COM A
PRESENÇA DA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Salvador, 12 de dezembro de 2023.

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto (Orientadora)

Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA. Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Prof.^aDr.^a Quiara Lovatti Alves

Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz. Salvador, Bahia.

Prof.^aDr.^aValdirene Leão Carneiro

Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA. Universidade do Estado da Bahia–UNEB, Bahia, Brasil.

Salvador, BA
2023

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida: minha avó Hezir Moura, meu esposo Ailton Pereira e meus amados pais, Jairo Carneiro e Jezir Moura.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um dos aspectos principais de uma conquista. Em primeiro lugar, agradeço a meu Deus criador e mantenedor, doador da vida, meu guia maior e meu suporte nessa jornada de desafios, que cuida de todos os detalhes.

A meu marido Ailton Pereira, seu amor, seu companheirismo e compreensão foram imprescindíveis durante esse processo. Obrigada por sempre me apoiar, me incentivar a permanecer e acreditar em mim.

A minha avó Hezir Moura, minha preciosidade! Como é maravilhoso ter uma avó tão amável como a senhora! Obrigada pelas orações, por suas doces e sábias palavras de incentivo, sempre ditas no momento certo.

A meus amados pais: Jairo Carneiro e Jezir Moura. O amor de vocês foi mais importante do que tudo. Obrigada pelo apoio de sempre e por acreditarem em mim.

A minha querida orientadora, Prof.^a Tatiane Teixeira, uma orientadora maravilhosa, que me impulsiona a ir além e a dar o meu melhor. Está sempre disposta a ajudar no que for preciso. Obrigada por cada palavra, cada ensinamento que a senhora me proporcionou. Eu a admiro como profissional e como pessoa. Gratidão por tudo!

Às pessoas incríveis que estiveram comigo desde o início, de forma especial, minha eterna professora, Prof.^a Dr.^a Márcia Barrientos. Sua brilhante docência foi uma inspiração e me incentivou na busca por mais conhecimento. Obrigada por me incentivar a ir além. Agradeço por sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas e pela constante ajuda nas análises. A senhora teve um papel muito importante nesse processo, além de me apresentar à Prof.^a Tatiane. Obrigada por tudo!

Francine, obrigada por compartilhar suas experiências e conhecimentos em nosso grupo da Periodontia do Imunobio e por ser sempre gentil comigo! Às colegas Jamile e Louise, gratidão por terem disponibilizado o tempo de vocês em reuniões, me ajudando com as dúvidas e etapas da pesquisa. Vocês foram essenciais em minha caminhada!

Às amigas do mestrado: Swany, Natália e Juliana. Vocês foram um presente que o mestrado me proporcionou. Obrigada pela amizade de vocês e por também partilharem as inseguranças e desafios passados nesta jornada. Em especial, gratidão a minha amiga Swany.

Minha dupla neste desafio! Uma dando suporte à outra. Cada passo que demos juntas foi uma evolução. Sua amizade foi essencial!

Aos meus amigos da graduação e amigos de infância que sempre torceram e vibraram pelas minhas conquistas! Vocês aquecem meu coração!

Agradeço a minha professora e orientadora durante o período da graduação, que também é uma inspiração para mim: Prof.^a Dr.^a Juliana Borges. Obrigada por cada conselho, cada ensinamento, desde a graduação! Obrigada por também ser um incentivo a ir além.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação PIOS, obrigada pelos conhecimentos compartilhados. Nossa turma foi incrível! Apesar de distantes fisicamente na maior parte dos momentos, devido ao fato de as aulas permanecerem de forma remota, nos unimos virtualmente, proporcionando aprendizados e troca de experiências diárias.

Aos excelentes secretários do Programa, Sr. Carlos e Tarcísio, pela disponibilidade em me orientar e ajudar em todos os momentos em que precisei.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior, por me conceder bolsa de mestrado.

CARNEIRO, Jaiza Kênsuly Moura Pinheiro. **Associação de variantes genéticas do gene *NELLI* com a presença da periodontite.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória que ocorre por interações complexas entre uma microbiota oral disbiótica e uma resposta imunológica do hospedeiro. Aspectos genéticos, ambientais e sistêmicos podem estar associados à periodontite. Estudos de genes candidatos e estudos de ampla associação do genoma (GWAS) buscam identificar associações entre variantes nos genes e a periodontite. O gene *NELLI* codifica uma proteína citoplasmática que contém repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e suas variantes genéticas podem estar envolvidas na regulação da diferenciação e do crescimento celular, relacionadas a proteína NELL-1 codificada. **Objetivo:** Investigar a associação entre variantes genéticas do gene *NELLI* e a periodontite. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal com 506 indivíduos adultos, não aparentados, classificados com presença (n=117) ou ausência (n=389) de periodontite, recrutados através do Programa para controle da Asma na Bahia (ProAR). Através de um questionário e entrevista, foram obtidas informações sobre características sociodemográficas, hábitos e estilo de vida, histórico médico e odontológico. Após a realização do exame oral, foram classificados com periodontite os indivíduos que apresentavam pelo menos 4 dentes com ao menos 1 sítio com profundidade de sondagem ≥ 4 mm; nível de inserção clínica ≥ 3 mm e sangramento ao estímulo no mesmo local. A genotipagem foi realizada utilizando o *kit Illumina Infinium Multi-Ethnic*. A análise de associação foi realizada no software Plink 1.9 através da regressão logística multivariada ajustada por idade maior ou igual a 40 anos, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental, asma e ancestralidade. **Resultados:** Foram associadas positivamente à periodontite 25 variantes de nucleotídeo único (SNV) do gene *NELLI* e 14 variantes associadas negativamente. Foram observadas associações que dizem respeito à idade, obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental e asma. Os alelos das variantes rs10766721-A, rs74326837-A e rs76391583-G foram positivamente associados com a periodontite. As variantes rs6483735-A, rs919476-A e rs111375391-G foram positivamente associadas à periodontite. O alelo C do rs10766743 foi negativamente ligado a periodontite. Na variante rs34835859, indivíduos com o genótipo C/A no modelo aditivo, que utilizam o fio dental, apresentam 2,45 vezes a mais de chances de desenvolver periodontite, (OR = 2,45; IC95%= 1,17-5,12; valor de p = 0,026). Pessoas com idade maior ou igual a 40 anos, com genótipo G/G na variante rs7130084, possuem 2,88 vezes a mais de chances de desenvolver periodontite (OR = 2,88; IC95% = 1,35 – 6,13; valor de p = 0,035) do que pessoas com o mesmo genótipo e idade maior ou igual a 40 anos. **Conclusão:** Neste estudo, Variantes do gene *NELLI* foram associadas à periodontite. Na análise de gene-ambiente, as covariáveis obesidade, o não uso do fio dental, a presença de asma e a idade superior ou igual a 40 anos foram vinculadas às variantes relacionadas ao desenvolvimento da periodontite. Estudos prospectivos futuros devem ser realizados para testar a hipótese da influência e funcionalidade dessas variantes descritas no presente estudo.

Palavras-chave: Doenças periodontais; periodontite; polimorfismo de nucleotídeo único; fator de crescimento epidérmico.

CARNEIRO, Jaiza Kênsuly Moura Pinheiro. **Association of genetic variants of the *NELLI* gene with the presence of periodontitis.** Dissertation (Master's Degree) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2023.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is an inflammatory disease due to complex interactions between a dysbiotic oral microbiota and the host's immune response. Genetic, environmental, and systemic aspects may be associated with periodontitis. Candidate gene studies and genome-wide association studies (GWAS) seek to identify correlations between variants in genes and periodontitis. The *NELLI* gene encodes a cytoplasmic protein that contains epidermal growth factor (EGF)-like repeats and its genetic variants may be involved in the regulation of differentiation and cell growth, related to the encoded NELL-1 protein. **Purpose:** Investigate the association between genetic variants of the *NELLI* gene and periodontitis. **Materials and Methods:** A cross-sectional study was carried out with 506 unrelated adult individuals, classified as having the presence (n=117) or absence (n=389) of periodontitis, recruited through the Program for Asthma Control in Bahia (ProAR). Through a questionnaire and an interview, pieces of information were obtained about sociodemographic characteristics, habits and lifestyle, and medical and dental history. After the oral examination, individuals with at least 4 teeth with at least 1 site with a probing depth ≥ 4 mm, clinical attachment level ≥ 3 mm, and bleeding upon stimulation in the same location were classified as periodontitis. Genotyping was performed using the Illumina Infinium Multi-Ethnic kit. The association analysis was carried out in the Plink 1.9 software using multivariate logistic regression adjusted for age greater than or equal to 40 years, obesity, mouth breathing habits, use of dental floss, asthma, and ancestry. **Results:** Twenty-five variants of the *NELLI* single nucleotide (SNV) gene were positively associated with periodontitis and 14 variants were negatively associated. Correlations referring to age, obesity, mouth breathing habits, dental flossing, and asthma were observed. The alleles of the variants rs10766721-A, rs74326837-A, and rs76391583-G were positively related to periodontitis. Variants rs6483735-A, rs919476-A, rs111375391-G were positively associated with periodontitis. The C allele of rs10766743 was negatively associated with periodontitis. In the rs34835859 variant, individuals with the C/A genotype in the additive model, who use dental floss, are 2.45 times more likely to develop periodontitis, (OR = 2.45; 95% CI = 1.17-5, 12; p-value = 0.026). People aged 40 years or older, with the G/G genotype in the rs7130084 variant, are 2.88 times more likely to develop periodontitis (OR = 2.88; 95% CI = 1.35 – 6.13; value p = 0.035) than people with the same genotype and age greater than or equal to 40 years. **Conclusion:** In this study, variants of the *NELLI* gene were associated with periodontitis. In the gene-environment analysis, the covariates obesity, lack of flossing use, presence of asthma, and age greater than or equal to 40 years are linked to variants associated with the development of periodontitis. Future prospective studies should be carried out to test the hypothesis of the influence and functionality of these variants described in the present study.

Keywords: Periodontal Disease; Periodontitis; Single nucleotide polymorphism; Epidermal Growth Factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Diferenças entre um periodonto saudável e um doente. (a) Tecido periodontal saudável. (b) Inflamação gengival precoce (seta preta) entre os dentes incisivos centrais. (c) Sinais clínicos da periodontite, com recessão de tecido gengival, perda óssea e bolsas periodontais (seta preta)20

Figura 2 –Associação entre espécies subgengivais. A base da pirâmide representa os primeiros colonizadores, seguida pelo complexo laranja, que une os colonizadores primários ao complexo vermelho, que é o complexo dominante do biofilme em estágios avançados da periodontite.....21

Figura 3 –Funções atuais de NELL-1 descritas na literatura. Aumento da vascularização, condrogênese e osteogênese. Supressão da adipogênese, da atividade osteoclástica e supressão da inflamação.....27

Figura 4 –Função de NELL-1 na osteogênese, condrogênese e adipogênese. Durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais, NELL-1 promove a diferenciação de células osteoprogenitoras em pré-osteoblastos e osteoblastos. NELL-1 e Runx2 regulam-se mutuamente, e NELL-1 ativa a sinalização canônica Wnt e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Durante a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais, NELL-1 promove a formação e a maturação dos condrócitos através das cascatas de sinalização: Runx2-NELL-1- fator nuclear de células T ativadas 1 (Nfatc1) -Runx3- Indian hedgehog (Ihh). A inibição da adipogênese ocorre por força de NELL-1 inibir o principal fator de transcrição adipogênico receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), que é dependente da via de sinalização Hedgehog (HH).....29

ARTIGO

Figura 1 –Análise do DL de 39 variantes genéticas associadas à periodontite (1A) e 10 variantes (1B), localizadas no cromossomo 11(n = 506).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição de frequências absolutas e relativas das características da população estudada (n = 506).....	42
Tabela 2– Associação significativa entre variantes do gene <i>NELLI</i> e periodontite por regressão logística ajustada para idade dicotomizada, obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental, asma e ancestralidade.....	43
Tabela 3– Associação de haplótipos entre variantes do gene <i>NELLI</i> com presença de periodontite (n = 506).....	48
Tabela 4– Associação entre genótipos de variantes genéticas do gene <i>NELLI</i> e a idade dicotomizada. Análise ajustada para obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental e asma.....	48
Tabela 5– Associação entre genótipos de variantes genéticas do gene <i>NELLI</i> e a obesidade. Análise ajustada para idade dicotomizada, hábito de respiração bucal, uso de fio dental e asma.....	49
Tabela 6– Associação entre genótipos de variantes genéticas do gene <i>NELLI</i> eo hábito de respiração bucal. Análise ajustada para idade dicotomizada, obesidade, uso de fio dental e asma.....	50
Tabela 7– Associação entre genótipos de variantes genéticas do gene <i>NELLI</i> e uso de fio dental pelo menos uma vez ao dia. Análise ajustada para idade dicotomizada, obesidade, hábito de respiração bucal, e uso do fio dental.....	53
Tabela 8– Associação entre genótipos de variantes genéticas do gene <i>NELLI</i> e a asma. Análise ajustada para idade dicotomizada, obesidade, hábito de respiração bucal, e uso do fio dental.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Alelo 1
A2	Alelo 2
ADD	Modelo aditivo
APC	Células apresentadoras de antígeno
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP9	Proteína morfogenética óssea 9
CHR	Cromossomo
CTM	Células-tronco mesenquimais
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOM	Modelo dominante
EGFL	Do inglês <i>Epidermal growth factor (EGF)-like</i> , traduzido como semelhante ao fator de crescimento epidérmico.
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GENO	Genótipo
GWAS	Do inglês <i>Genome-wide association studies</i> , traduzido como estudos de associação genômica ampla.
HH	Via de sinalização Hedgehog (família de proteínas de sinalização de células embrionárias em muitos animais)
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confiança
IHH	<i>Indian Hedgehog</i> – “ouriço indiano” (proteínas que atuam na regulação do desenvolvimento de vários tecidos e órgãos; aspecto semelhante ao ouriço indiano, observado nos embriões de <i>Drosophila</i>)
IFN- γ	Interferon gama
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAF	Do inglês <i>Minor allele frequency</i> , traduzido como frequência do menor alelo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MODEL	Modelo de regressão logística
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NELL1	Do inglês <i>Neural EGFL Like-1</i> , traduzido como semelhante ao fator de crescimento epidérmico neural 1
NFATC1	Fator nuclear de células T ativadas 1
NK	Do inglês <i>Natural killer cells</i> , traduzido como células assassinas naturais
OPG	Osteoprotegerina
OR	<i>OddsRatio</i>
PCR	Proteína C reativa
PGE2	Prostaglandina E 2
PMNs	Polimorfonucleados
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
ProAR	Programa para controle da asma na Bahia
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B
REC	Modelo recessivo
RNA	Ácido ribonucléico
Runx2	Fator de transcrição 2 da “família” RUNX
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNV	Variante de nucleotídeo único
TGF- β	Fator de transformação de crescimento-beta
Th	Linfócitos T “helper” auxiliares

Th1	Linfócitos T Helper 1
Th17	Linfócitos T Helper 17
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	Receptor Toll-like
Treg	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 PATOGÊNESE DA PERIODONTITE.....	19
2.2 GENE <i>NELLI</i> E VARIANTES GENÉTICAS NA PERIODONTITE.....	25
2.3 FUNÇÕES IDENTIFICADAS DA PROTEÍNA NELL-1 E SEU ENVOLVIMENTO NO METABOLISMO ÓSSEO	Erro! Indicador não definido.
2.4 FATORES AMBIENTAIS E GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE.....	32
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Erro! Indicador não definido.
4 ARTIGO.....	35
1 INTRODUÇÃO	357
2 MATERIAIS E MÉTODOS	399
2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	399
2.2 DIAGNÓSTICO DE PERIODONTITE.....	40
2.3 EXTRAÇÃO GENÔMICA DE DNA E GENOTIPAGEM.....	40
2.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	40
2.5 ESTRATÉGIA ESTATÍSTICA	41
3 RESULTADOS	42
3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	42
3.2 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	456
3.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO GENE E AMBIENTE	478
4 DISCUSSÃO	546
5 CONCLUSÃO.....	579
REFERÊNCIAS.....	60
5 CONCLUSÃO GERAL	634
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	645

1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças periodontais compreendem uma ampla gama de condições inflamatórias que afetam as estruturas de suporte dos dentes (gengiva, osso alveolar, cimento e ligamento periodontal), o que pode levar à perda dentária e contribuir para a inflamação sistêmica.^{1,2} As características principais da periodontite são a perda de suporte do tecido periodontal, através da perda de inserção clínica, perda óssea alveolar, presença de bolsas periodontais e sangramento gengival.^{3,4}

A inflamação gengival é desencadeada pelo acúmulo de biofilme bacteriano, que compõe a placa dental, nos dentes adjacentes à gengiva.⁵ O início e a progressão da periodontite dependem de alterações ecológicas disbióticas na microbiota oral, em resposta aos produtos inflamatórios gengivais e à degradação tecidual, que enriquecem os microrganismos presentes, além dos mecanismos antibacterianos que tentam conter o desafio microbiano na área do sulco gengival.^{1,6,7} No entanto, diferentemente da periodontite, a gengivite não afeta as estruturas de suporte subjacentes dos dentes, tratando-se de um quadro reversível.^{1,5} A periodontite resulta na perda de tecido conjuntivo e suporte ósseo, sendo uma das principais causas de perda dentária em adultos.^{3,4,8}

Evidências epidemiológicas indicam que doenças periodontais afetam de 20 a 50% da população mundial.¹⁵ De acordo com o *Global Burden of Disease Study*¹⁶, em 2016, a periodontite foi a 11ª condição mais prevalente no mundo.^{15,16} Essa doença representa a maior causa de perda dental.¹⁵ Devido a sua alta prevalência, a periodontite é considerada um problema de saúde pública importante, uma vez que a perda dos elementos e a incapacidade dentária afeta negativamente a função mastigatória e estética, prejudicando a qualidade de vida dos indivíduos e levando a custos com tratamentos e reabilitação oral.^{15,16}

Fatores genéticos e ambientais contribuem para causar essa doença, como a presença persistente de uma microbiota disbiótica no biofilme.^{2,9,10} Espécies bacterianas influenciam fortemente o estímulo de uma resposta prolongada do hospedeiro.⁶ Alguns patógenos considerados de maior virulência passam a ter seu desenvolvimento aumentado, a exemplo de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, promovendo desequilíbrio ou disbiose da microbiota local.^{11,12} Além disso, fatores de risco ambientais, somados à resposta do hospedeiro, influenciam na susceptibilidade individual e no desenvolvimento da doença. Evidências apontam variáveis associadas a um maior risco para a

periodontite – obesidade¹⁸, tabagismo¹⁹, nível socioeconômico²⁰, raça ou etnia²¹, estresse²², idade²³, sexo ou gênero²⁴, diabetes²⁵ e asma²⁶ que são apontadas como fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença.²⁷

O estudo genético, na periodontite, vem sendo amplamente difundido na literatura científica, devido ao padrão de herdabilidade da doença e associações genéticas específicas.^{28,29,30} Estudos apontam que variantes genéticas podem estar relacionadas ao desenvolvimento da periodontite.^{10,17,29,30,31} As variantes têm sido utilizadas como marcadores genéticos para identificar a associação de genes com doenças.³² O tipo de variante em evidência na literatura é a de base única, conhecida como variante de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Variant* (SNV).^{32,33,34} A presença de uma variante pode implicar mudança no código genético e na sequência da proteína correspondente, levando a alterações importantes, resultando em uma proteína disfuncional, afetando ou não o fenótipo que determinará a função proteica e podendo influenciar na resposta imunológica e inflamatória frente a uma agressão microbiana.^{31,34,35}

Estudos de associação genômica ampla, do inglês *Genome-wide association studies* (GWAS), envolvem variantes genéticas de nucleotídeo único de todo o genoma de muitos indivíduos para identificar associações positivas ou negativas no genótipo-fenótipo, e têm sido direcionados à investigação genética da periodontite.^{31,33} Devido a sua ampla cobertura genômica, os GWAS ofereceram informações promissoras sobre possíveis influências genéticas da periodontite, incluindo vários *loci* e genes candidatos.³⁵⁻³⁷ Por meio desses estudos e dos estudos de genes candidatos, tem sido investigado o envolvimento de variantes genéticas com a periodontite.^{36,37}

O gene *Neural EGFL Like 1 (NELLI)*, que é traduzido para o português como semelhante ao fator de crescimento epidérmico neural 1, codifica uma proteína citoplasmática que contém repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGFL).³⁸ A proteína codificada pode estar envolvida na regulação da diferenciação e no crescimento celular, bem como em diversas funções relacionadas ao desenvolvimento de algumas doenças.³⁹ As primeiras investigações foram direcionadas às propriedades osteogênicas da proteína codificada NELL-1 no metabolismo ósseo, bem como na supressão da atividade osteoclástica e da inflamação.³⁸⁻⁴⁰

A periodontite é uma doença complexa e multifatorial. A dificuldade no tratamento periodontal convencional, em alguns indivíduos, pode estar associada à variação na combinação de fatores ambientais e genéticos. A compreensão desses fatores pode ser determinante para o

diagnóstico e o prognóstico, bem como para desvendar novas estratégias terapêuticas seguras e eficazes que direcionem o tratamento da periodontite. A proteína codificada pelo gene *NELLI* pode estar relacionada com a periodontite por apresentar envolvimento no metabolismo ósseo. Diante dos fatores expostos, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência de variantes genéticas do gene *NELLI* na presença da periodontite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PATOGÊNESE DA PERIODONTITE

A periodontite é uma condição inflamatória crônica, de etiologia multifatorial, que envolve interações complexas entre patógenos e hospedeiro.^{5,6} A presença de microrganismos que constituem o biofilme dental e a resposta imunomediada inata e adaptativa, frente às agressões dos agentes patogênicos, ocasionam a destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes –osso alveolar, cemento, ligamentos periodontais e gengiva¹¹, podendo levar à perda de unidades dentárias.^{1,40}

A gengivite, caracterizada por inflamação aguda do tecido gengival, presença de edema, hiperemia e sangramento gengival, não apresenta alteração no nível de inserção do tecido conjuntivo ao dente.⁴¹ A gengivite é desencadeada pelo desequilíbrio dos patógenos presentes no biofilme dentário, que são compostos por proteínas salivares e células epiteliais descamadas, quando não removidos de forma periódica.^{1,5,7,9,12} O surgimento de colônias bacterianas, somado à resposta imune do indivíduo, promovem o processo inflamatório.^{1,2,41,42,43} Essa inflamação pode progredir e acometer os demais tecidos periodontais.^{5,9,11,12,43} O mecanismo de perda do tecido gengival, do osso e do ligamento, leva à formação de bolsas periodontais profundas, que constituem uma característica importante da doença e podem, eventualmente, levar à perda dos dentes.^{1,5,43,44} A Figura 1 demonstra as características clínicas de um periodonto saudável, a presença de gengivite e periodontite. Um periodonto saudável é observado clinicamente sem perda de inserção clínica, profundidade de sondagem de até 3 mm, ausência de sangramento à sondagem e ausência de imagens sugestivas de perda óssea em exames de imagem.^{14,44-46} A saúde gengival apresenta características como cor rósea pálida,

exceto em casos de pigmentação melânica, textura firme, e as papilas ocupam os espaços interdentais.^{14,15,44-46} A gengivite é caracterizada pela presença de necrose das papilas interdentais, sangramento gengival e sintomatologia dolorosa.^{44,46} A periodontite se caracteriza clinicamente por perda de inserção clínica detectada em dois ou mais sítios interproximais não adjacentes, bem como por perda de inserção de 3 mm ou mais em, pelo menos, 2 dentes.⁴⁷

Figura 1– Diferenças entre um periodonto saudável e um doente. (a) Tecido periodontal saudável. (b) Inflamação gengival precoce (seta preta) entre os dentes incisivos centrais. (c) Sinais clínicos da periodontite, com recessão de tecido gengival, perda óssea e bolsas periodontais (seta preta)



Fonte: Kinane, Stathopoulou, Papapanouet *al.*¹

A cavidade oral é colonizada por múltiplos microrganismos, a exemplo das bactérias periodontopatogênicas, que estão relacionadas ao desenvolvimento da periodontite.¹¹ Além disso, estão presentes *Archaea*, protozoários, vírus, e milhões de genes distintos são expressos. Vírus e *Archaea* representaram cerca de 0,1% e 0,22%, respectivamente, do total de leituras de *mRNA*.⁴⁰

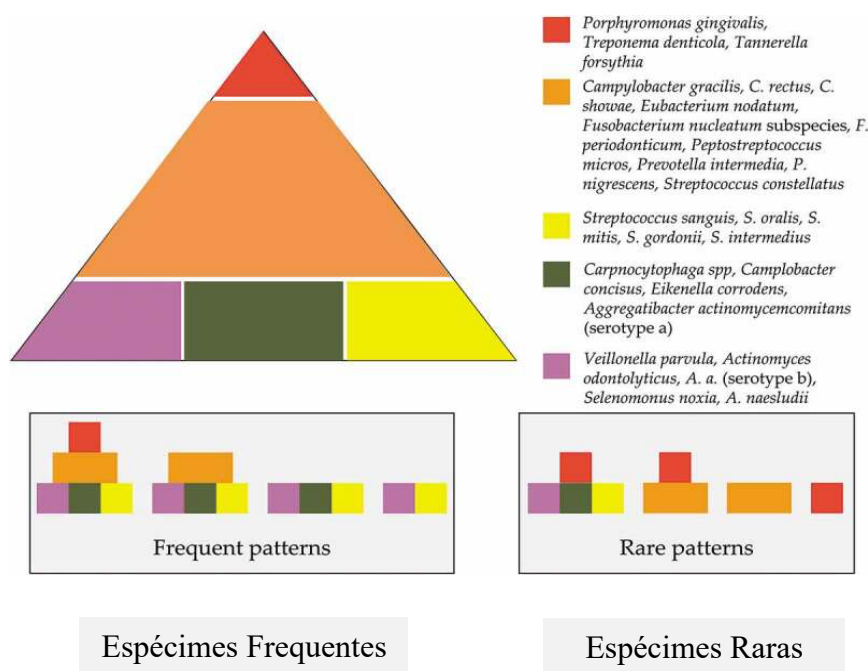
A camada inicial depositada na superfície dos dentes, durante a formação da placa dentária, é definida como película adquirida.^{5,9,15} É formada quando as superfícies dentárias são expostas na cavidade oral e ocorre a subsequente fixação dos colonizadores primários do biofilme, as espécies *Streptococcus* e *Actinomyces*, bactérias gram-positivas facultativas.^{5,41} Os receptores de adesina presentes na superfície dos colonizadores primários se ligam às proteínas da película, expondo sítios receptores conhecidos como criptitopos, o que viabiliza a agregação bacteriana.^{5,6,11} A deposição da placa dentária ocorre de forma gradual, leva a uma deficiência de oxigênio no ambiente e à subsequente colonização de bactérias anaeróbias.⁴¹⁻⁴³

Os mecanismos de transição da saúde periodontal para a gengivite e para estágios avançados da periodontite estão associados à mudança microbiana das principais bactérias simbióticas para a disbiose, com bactérias patogênicas que modificam condições aeróbicas para anaeróbicas.^{6,11,41-43} Essa transição é influenciada de maneira multifatorial, pois inclui fatores ambientais, a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, além da susceptibilidade

individual.^{2,5,6,43} O ambiente subgengival possui determinantes ecológicos distintos, sendo considerado um dos nichos orais mais característicos de interação íntima entre as comunidades microbianas e a resposta imunológica do hospedeiro.^{7,9,15} Variantes genéticas do hospedeiro podem afetar a colonização bacteriana. Além de mediar a resposta imunológica, também podem influenciar na composição e na carga microbiana de bactérias agregadas ao biofilme subgengival.⁶

O estudo clássico de Socransky *et al.*⁴⁸, em 1998, dividiu os patógenos em cinco grandes complexos microbianos da comunidade bacteriana, baseados em cores e presentes em placas subgengivais (Figura 2). O primeiro deles é o complexo vermelho, que inclui as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*. Essas espécies têm sido associadas fortemente à manifestação clínica grave da periodontite, relacionada à profundidade de bolsa e sangramento à sondagem.^{48,49} O complexo laranja, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*, apresentou íntima relação com o complexo vermelho e está envolvido com o início e a progressão da periodontite.⁴⁸ O complexo verde é composto pelas espécies: *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetecomitans* sorotipo a. *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis* fazem parte do complexo amarelo. Ao quinto grupo, complexo roxo, foram adicionados *Actinomyces odontolyticus* e *Veilonella parvula*.^{48,49}

Figura 2 – Associação entre espécies subgengivais. A base da pirâmide representa os primeiros colonizadores, seguida pelo complexo laranja, que une os colonizadores primários ao complexo vermelho, que é o complexo dominante do biofilme em estágios avançados da periodontite



Fonte: Abdulkareemet *al.*⁴³; adaptado de Socranskyet *al.*⁴⁸ pelos autores.

As análises do microbioma oral foram possíveis através do sequenciamento do RNA ribossômico 16S, que viabilizou a ampla compreensão da etiologia bacteriana das doenças periodontais, a descoberta de novas bactérias taxonômicas que anteriormente não eram associadas à periodontite, além de compreender a dinâmica das comunidades associadas às condições de saúde e doença.^{9,15,50}

A periodontite é considerada uma condição inflamatória crônica.^{1,4,5,51} Mecanismos inflamatórios, na periodontite, resultam da interação de agentes patogênicos com a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção persistente.^{42,52,53}

A integridade do epitélio atua como uma importante barreira física contra a invasão patogênica durante a inflamação.^{2,9,11,12,53,54} A primeira linha de defesa do hospedeiro encontrada pelos microrganismos, em ambiente supra ou subgingival, inclui as mucosas, mecanismos de defesa salivar, neutrófilos e outros polimorfonucleados (PMNs), e peptídeos antimicrobianos.^{1,5,12} As reações inflamatórias resultam no aumento do fluido crevicular gengival, com produtos de degradação do colágeno e uma gama de fatores imunológicos inatos e adaptativos do hospedeiro.^{6,50,51-53} Imunoglobulinas, componentes do sistema complemento, proteínas séricas, citocinas, quimiocinas, células imunitárias, a exemplo dos leucócitos, células do epitélio de bolsa descamado e produtos provindos da degradação do colágeno gengival por metaloproteinasas da matriz (MMPs) participam diretamente desse mecanismo.^{2,42,52,53}

Ao ocorrer a infiltração bacteriana no tecido, inicia-se o processo inflamatório em resposta à intensa presença de moléculas produzidas por bactérias patogênicas presentes no biofilme, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, proteases e outras toxinas bacterianas.^{9,11,49,51-54} Células imunes circulantes, a exemplo de mastócitos e monócitos/macrófagos, invadem o tecido e degradam essas substâncias através de seus mediadores antimicrobianos, como a atividade fagocitária, a liberação de enzimas lisossomais como as MMPs e substâncias citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio (EROs).^{9,12,50} A liberação de citocinas é induzida através da interação direta dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), a exemplo do receptor Toll-like (TLR), um dos componentes principais da resposta ao biofilme e seus produtos, expressos em membrana de células fagocitárias ou células apresentadoras de antígeno (APC) do epitélio gengival, com os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPS) em bactérias gram-positivas e gram-negativas.^{50,55}

Os neutrófilos expressam receptores de superfície celular e se ligam a estímulos quimiotáticos, iniciando as sequências de sinalização.^{54,56} Constituem os primeiros a serem recrutados ao local da inflamação periodontal para combater os agentes patogênicos, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , IL-23, IL-8 e IL-1 α , que estimulam as células epiteliais orais, fibroblastos e células imune a expressarem peptídeos antimicrobianos, a exemplo de β -defensinas humanas.^{43,56} Os peptídeos antimicrobianos neutrofílicos são substituídos pelo aumento da atividade das células dendríticas, unindo os mecanismos inatos e adaptativos do hospedeiro.^{40,43,52-54} A ação dos neutrófilos leva à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos patogênicos, bem como à liberação de enzimas, prostaglandinas e MMPs.^{57,58} As metaloproteinases da matriz são constituídas de um grupo de enzimas endopeptidases, responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais.^{54,57} Além disso, atuam no processo de homeostase local, com a ativação de células imunes, reabsorção óssea por meio da ativação de osteoclastos, além de recrutarem mais células inflamatórias para o local da inflamação.^{53,57,58} As MMPs são consideradas as principais responsáveis pela quebra do colágeno durante a destruição tecidual periodontal.^{59,60} Fibroblastos gengivais, queratinócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares são capazes de expressar MMPs -1, -2, -3, -8, -9, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que regulam a transcrição das MMPs.^{59,57} Altos níveis de MMPs nos tecidos periodontais promovem um desequilíbrio entre a produção e degradação do colágeno, o que pode culminar na perda de inserção clínica.^{57,59}

À medida que a disbiose progride, durante o processo de transição da gengivite para a lesão de periodontite avançada, o número de neutrófilos aumenta e a ação se torna exacerbada.^{42,43,48} Ocorre a destruição dos tecidos periodontais devido à quantidade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-17, quimiocinas e enzimas proteolíticas que induzem a ativação dos mecanismos de reabsorção óssea.^{11,12,55,58,60,61}

Células *natural killer* (NK) atuam induzindo a ativação de linfócitos T em resposta aos TLR e desencadeiam a resposta humoral através da invasão dos linfócitos B e T.^{55,62} A ativação da resposta imune adaptativa leva à diferenciação de células T auxiliares (Th) em células Th1, Th2, Th17 ou células T regulatórias (Treg), que também são relatadas como responsáveis pela homeostase do sistema imune.⁶⁰⁻⁶² As células Th1 e Th2 estão relacionadas à resposta imune, produzem interferon gama (IFN- γ), fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), além de estimularem a produção de imunoglobulinas (Ig) por linfócitos B.^{61,62} Células T auxiliares (Th) -17 e B, quando ativadas, aumentam a expressão do receptor-ativador do ligante fator nuclear kappa-B (RANKL), que também é ativado diretamente através de neutrófilos recrutados.^{62,63} O RANKL impulsiona a ativação e maturação do precursor dos osteoclastos para ser um osteoclasto ativo que predispõe à reabsorção óssea.⁶³ As interações microbianas – células adaptativas e inatas – demonstram os principais mecanismos envolvidos na cronicidade da inflamação que, quando não solucionados, promovem a destruição tecidual.^{9,11,12,40}

O metabolismo ósseo envolve mecanismos dinâmicos de remodelação óssea por meio de interações entre células formadoras do tecido ósseo, os osteoblastos, e células que reabsorvem a matriz óssea, os osteoclastos.⁶³⁻⁶⁵ A deposição óssea é mediada por osteoblastos.⁶⁶ A diferenciação osteoblástica é estimulada por citocinas osteogênicas, como proteína morfogenética óssea (BMP) e proteínas Wntless (Wnt), que são glicoproteínas cruciais para a diferenciação dos osteoblastos, bem como para uma variedade de outras funções celulares.^{39,67} A diferenciação dos osteoblastos é controlada através do fator de transcrição relacionado à *Runt* (*Runx2*) e osterix.^{67,68} Os osteoblastos maduros aderem à matriz óssea, transformando-se em osteócitos.^{63,66} Os osteócitos, as células mais abundantes no osso, se conectam entre si de modo a formar uma rede dentro da matriz óssea.⁶⁶

A osteoclastogênese, processo em que ocorre a ativação e a diferenciação dos osteoclastos, é mediada pela interação entre o receptor-ativador do ligante fator nuclear kappa-B (RANKL), receptor-ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e osteoprotegerina

(OPG).⁶⁹ A função do RANKL é inibida pela osteoprotegerina, proteína que se liga ao RANKL e impede sua ligação ao RANK nas células progenitoras de osteoclastos.^{64,65,69} Uma vez que a OPG pode ser produzida pelos mesmos tipos de células que produzem o RANKL, a proporção de RANKL e OPG é um fator determinante e importante na formação de osteoclastos e no mecanismo da reabsorção óssea.^{65,69} Hormônios, fatores de crescimento e citocinas modulam a atividade dos osteoclastos, regulando sua diferenciação, ativação, sobrevivência e função.⁶⁴ Eles incluem hormônio da paratireoide: paratormônio (PTH), calcitriol, PGE 2, TNF, TGF e 1,25-di-hidroxivitamina D, tiroxina e IL-11.^{61,64} O PTH estimula a produção osteoblástica de IL-6, o que aumenta a diferenciação osteoclástica e faz com que os osteoblastos se contraíam, tornando a superfície óssea mais suscetível à reabsorção.^{65,68} Calcitonina, interferon gama (IFN- γ) e TGF β são potentes inibidores da atividade e da diferenciação dos osteoclastos.⁶⁸

A osteoclastogênese desempenha uma função importante na reabsorção óssea inflamatória e sua expressão é aumentada na periodontite.^{11,42,52,63} Em estados patológicos inflamatórios, os linfócitos T ativados podem mediar a reabsorção óssea através da produção excessiva de RANKL, estando os linfócitos T e B ativados dentre as principais fontes de expressão de RANKL no tecido periodontal patológico.⁶⁸ Citocinas pró-inflamatórias de células T-helper 1 e T-helper 17, como interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-17, interferon- γ e fator de necrose tumoral- α , estimulam os osteoblastos periodontais a expressarem RANKL ligado à membrana.^{60,61,62} Neutrófilos também podem induzir a expressão do ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) na membrana dos osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea.^{62,68,69}

Células periodontais residentes, incluindo fibroblastos ligamentares e gengivais, também participam na regulação da remodelação e reabsorção óssea.⁶⁸ Os leucócitos infiltrados produzem mediadores inflamatórios como IL-1 e prostaglandina E2 (PGE2), em resposta às toxinas bacterianas, a exemplo de LPS, que induz a expressão de RANKL em osteoblastos e fibroblastos gengivais.^{54,58,60} Os fibroblastos gengivais e periodontais também são fontes de RANKL e OPG.⁶⁸ Durante o processo inflamatório da periodontite, RANKL é regulado positivamente, enquanto o OPG é regulado negativamente, em comparação com a saúde periodontal, resultando num aumento da relação RANKL/OPG.⁶⁹

2.2 GENE *NELL1* EVARIANTES GENÉTICAS NA PERIODONTITE

O gene *NELLI* codifica uma proteína citoplasmática que contém repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF). A proteína codificada pode estar envolvida na regulação e na diferenciação do crescimento celular, bem como em diversas funções relacionadas ao desenvolvimento de doenças.^{38,39,70}

Investigações de dados de GWASs e estudo de gene candidato revelaram possíveis associações de SNV de *NELLI* e amplas funções do gene e suas propriedades osteogênicas e condrogênicas relatadas na literatura.^{39,70} Essas descobertas contribuem na expansão do conhecimento de determinadas doenças, além de incluir as possíveis causas, fisiopatologia e tratamento.⁷¹

As variantes genéticas resultam de tipos de alterações na sequência do DNA, como: variações de nucleotídeo único (que afetam um único nucleotídeo ou correspondem à substituição de um nucleotídeo por outro); inserções ou deleções de bases, que podem envolver uma única base ou centenas de milhares de bases de nucleotídeos e deleções repetitivas de DNA.^{71,72} As variantes de nucleotídeo único constituem o tipo de variante mais caracterizada em todo o genoma humano.^{34,71,72,73}

Existem aspectos principais para associações com doenças genéticas: a ampla descoberta de variantes, determinação precisa da frequência de alelos e compreensão do padrão de variação normal e seu efeito na expressão gênica.⁷¹⁻⁷³ O padrão normal de variação genética inclui frequência de mutação, distinção demográfica e seleção evolutiva em qualquer *locus* gênico.⁷²

Algumas variantes não apresentam efeito fenotípico, ou seja, não implicam o desenvolvimento de alguma doença, enquanto outras afetam a expressão e a função da proteína codificada pelo gene.^{27,30,34} Se a proteína afetada atua em um processo biológico, algumas variantes gênicas podem aumentar ou reduzir o risco de uma pessoa para o fenótipo da doença.³³⁻³⁴ Alterações no código genético e na sequência da proteína correspondente resultam em uma proteína disfuncional, o que pode influenciar na resposta imunológica e inflamatória do indivíduo.³⁴ Essas alterações na função das proteínas podem ser exacerbadas quando expostas a fatores ambientais, como dieta, tabagismo e fatores microbianos.³² A compreensão dessas alterações genéticas é de fundamental importância no curso das doenças e na possibilidade de associação com o desenvolvimento, o diagnóstico e o tratamento.^{34,35}

As primeiras descobertas acerca da função do gene *NELLI* demonstraram que o gene é expresso predominantemente em tecidos neurais.^{74,75} As primeiras investigações foram direcionadas às propriedades osteogênicas da proteína codificada NELL-1 no metabolismo

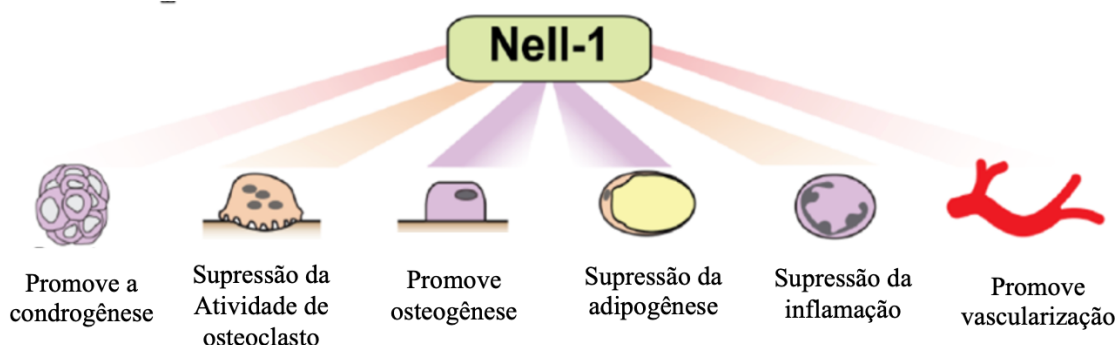
ósseo.⁷⁵ As atuais funções de NELL-1, descritas na literatura, envolvem a promoção do aumento da vascularização, da condrogênese e da osteogênese, bem como a supressão da atividade osteoclástica, da adipogênese e da inflamação.³⁹

Além das descobertas das funções na modulação da osteogênese e seu envolvimento no metabolismo ósseo^{39,74,75}, estudos demonstram o envolvimento de variantes do gene *NELL1* com outras doenças inflamatórias, incluindo a periodontite.⁷⁰ O primeiro GWAS para periodontite foi dirigido, em 2009, por Schaefer *et al.*⁷⁶, em uma população alemã, e replicado em holandeses, identificando-se variantes genéticas associadas à periodontite. A partir de então, foram realizados estudos de associação genômica ampla em outras populações.^{76,77}

2.3 FUNÇÕES IDENTIFICADAS DA PROTEÍNA NELL-1 E SEU ENVOLVIMENTO NO METABOLISMO ÓSSEO

As funções de NELL-1 atualmente registradas na literatura são: aumento da vascularização, condrogênese e osteogênese; supressão da adipogênese, da atividade osteoclástica e supressão da inflamação (Figura 3). A figura 3 apresenta as funções de NELL-1 na osteogênese, condrogênese e adipogênese, para elucidar os mecanismos envolvidos.^{39,78,79}

Figura 3 – Funções atuais de NELL-1 descritas na literatura. Aumento da vascularização, condrogênese e osteogênese. Supressão da adipogênese, da atividade osteoclástica e supressão da inflamação



Fonte: adaptado e traduzido de Li *et al.*³⁹ pelos autores.

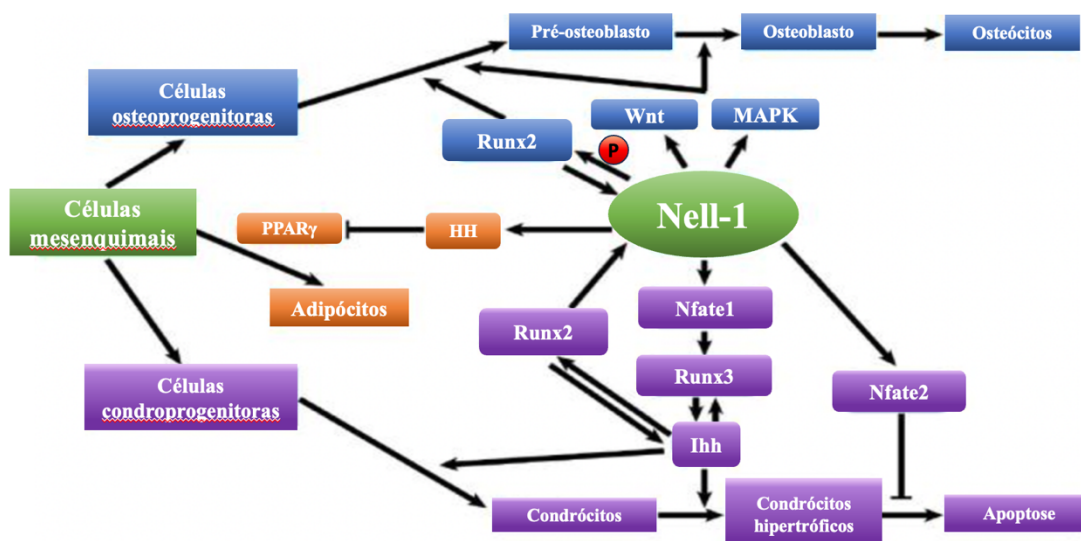
O papel funcional da proteína NELL-1 começou a ser desvendado ao se investigar a associação positiva da expressão de NELL-1 com a craniossinostose coronal unilateral,

caracterizada por malformação congênita do crânio devido ao fechamento precoce das suturas cranianas em humanos.^{74,75,80,81}

Desde então, diversos estudos passaram a investigar as funções de NELL-1.^{39,80-82} Pesquisas atribuíram múltiplos papéis ao NELL-1 em processos fisiológicos e patológicos, apresentando propriedades osteoindutivas.^{39,82,83} NELL-1 é um potente fator pró-osteogênico para a regeneração do tecido osteocondral, sendo importante na esquelotogênese craniofacial e apendicular. Apresenta efeitos antiadipogênicos, uma vez que pode inibir a diferenciação de células mesenquimais em adipócitos, para se transformarem em osteoblastos, melhorando condições de regeneração óssea.^{39,78,79} Portanto, NELL-1 direciona a diferenciação de células mesenquimais multipotentes de adipócitos para osteoblastos.^{79,84}

Acredita-se que a sinalização de NELL-1, na formação óssea, seja mediada pela integrina e subsequente ativação da via Wnt/ β -catenina.^{39,85} As integrinas constituem um grupo de proteínas de superfície celular que possibilitam a adesão celular e englobam sinais de diversas citocinas e outros fatores de crescimento.⁸⁶ NELL-1 se liga diretamente ao receptor de superfície celular Integrin β 1.^{85,86} De forma subsequente, a ligação de NELL-1 à Integrin β 1 ativa uma cascata de sinalização intracelular, promovendo adesão celular, proliferação e diferenciação osteogênica, sendo considerada um fator de transcrição imprescindível no controle da osteogênese.⁸⁷ A sinalização de Wnt, glicoproteínas importantes na diferenciação dos osteoblastos e outras funções celulares, contribui para a osteogênese por regular, de forma temporária, a expressão do gene *Runx-related transcription factor 2* (*Runx2*), que é o principal fator de transcrição da osteogênese, importante em muitos estágios do desenvolvimento ósseo (Figura 4).^{39,85-87}

Figura 4 – Função de NELL-1 na osteogênese, condrogênese e adipogênese. Durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais, NELL-1 promove a diferenciação de células osteoprogenitoras em pré-osteoblastos e osteoblastos. NELL-1 e Runx2 regulam-se mutuamente, e NELL-1 ativa a sinalização canônica Wnt e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Durante a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais, NELL-1 promove a formação e a maturação dos condrócitos através das cascatas de sinalização: Runx2-NELL-1- fator nuclear de células T ativadas 1 (Nfatc1) -Runx3- Indian hedgehog (Ihh). A inibição da adipogênese ocorre por força de NELL-1 inibir o principal fator de transcrição adipogênico receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), que é dependente da via de sinalização Hedgehog (HH)



Fonte: adaptado e traduzido de Li *et al.*³⁹ pelos autores.

NELL-1 eleva a expressão e a translocação nuclear de Wnt/ β -catenina em osteoblastos e osteoclastos, o que aumenta a diferenciação de osteoblastos e inibe a reabsorção óssea direcionada por osteoclastos (Figura 4).⁸⁷⁻⁸⁹ Além dos osteoblastos, as células progenitoras mesenquimais podem dar origem a adipócitos, miócitos e condrócitos.^{89,90}

No processo da diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais, NELL-1 promove a formação e a maturação dos condrócitos através das cascatas de sinalização: *Runx2*-fator nuclear de células T ativadas 1 (*Nfate1*) - *Runx3* - Indian hedgehog (*Ihh*), traduzida para o português como “ouriço indiano”, devido ao aspecto semelhante ao ouriço indiano, observado nos embriões de *Drosophila*.⁹¹ É uma molécula sinalizadora importante, que também está envolvida no controle da proliferação e diferenciação de condrócitos.^{67,68,91,92} Já na adipogênese, NELL-1 inibe o principal fator de transcrição adipogênico, o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPAR γ*), que são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares, reguladores da homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação.^{87,89,92} Os *PPAR γ* são dependentes da via de sinalização Hedgehog (*HH*) – via associada a mecanismos de proliferação celular, diferenciação, angiogênese e homeostase de células-tronco (Figura 4).^{39,87,93} Os efeitos de NELL-1 na vascularização foram inicialmente observados em um estudo *in vitro*, em células murais, que estão intimamente associadas às células endoteliais nas paredes dos capilares e microvasos em todos os tecidos vascularizados do corpo humano.⁹⁴ Foram cultivadas em meio osteogênico suplementado com a proteína NELL-1 humana (*rhNELL1*) recombinante. Esse estudo demonstrou que NELL-1 aumenta a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*), aumentando também a angiogênese durante a regeneração óssea.^{93,94} O *VEGF* compartilha algumas semelhanças funcionais com o NELL-1, e também participa do mecanismo da formação óssea.⁹⁴ Assim como

o NELL-1, por exemplo, os osteoblastos também secretam VEGF, o que sugere um papel do VEGF na regulação da migração e diferenciação dos osteoblastos.^{93,94}

Estudos demonstraram que a expressão do gene *NELL1*, no tecido embrionário, é essencial para o crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo, bem como indução da regeneração óssea e cartilaginosa com alta especificidade para linhagem de condrócitos.^{80,95} A proteína NELL-1 está envolvida na diferenciação osteogênica, sendo a expressão do gene *NELL1* aumentada durante a osteogênese.^{91,93,95}

A expressão de NELL-1 aumenta a atividade de *Runx2*, via sinalização das proteínas Wnt, que é essencial para a diferenciação de células progenitoras em osteoblastos e o desenvolvimento ósseo normal.⁸⁴⁻⁸⁷ Em células precursoras de osteoblastos, a sinalização Wnt canônica estimula diretamente o promotor *Runx2* e conduz à diferenciação osteoblástica.⁶⁸ Sendo assim, NELL-1 influencia na osteogênese através do estímulo de Wnt canônica e aumento da atividade de *Runx2*.^{78,91}

Dentre as funções observadas, a proteína NELL-1 é capaz de regular negativamente a expressão de moléculas pró-inflamatórias e catabólicas e, como resultado, demonstrou uma ação anti-inflamatória em estudos *in vitro* e *in vivo*.^{79,89,96} Por meio de um estudo *in vivo*, com replicação *in vitro*, Shen *et al.*⁹⁶, em 2013, investigaram o papel anti-inflamatório de NELL-1, que foi evidenciado através da redução de marcadores inflamatórios estimulados por interleucina 1 beta (IL1 β) e suas enzimas catabólicas, responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC) expressa na cartilagem articular de camundongos utilizados no estudo.⁹⁶

A supressão da atividade osteoclástica da proteína NELL-1 é caracterizada por apresentar efeitos inibitórios sobre os osteoclastos, com diminuição do número e da atividade celular.^{82,85,97} NELL-1 ativa diretamente a via de sinalização Wnt/ β -catenina nas células osteoclásticas e osteoblásticas.⁸⁵ De forma específica, a via de sinalização Wnt/ β -catenina em osteoblastos induz a expressão do principal inibidor de osteoclastos e osteoprotegerina, alterando o equilíbrio entre osteoprotegerina e RANKL e inibindo indiretamente a atividade osteoclástica.⁹⁷ Portanto, os efeitos positivos da NELL-1 na formação óssea e os efeitos negativos na reabsorção óssea podem ser explicados pela ativação ou inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina nos precursores de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente.⁹⁷

O desequilíbrio nos processos dinâmicos de reabsorção e formação óssea pode levar à destruição óssea progressiva, presente em doenças como osteoporose, osteopenia e periodontite, que apresentam características de perda óssea. Estudos nas últimas décadas

documentaram o envolvimento dos genes na variação da densidade mineral óssea e o risco de fraturas osteoporóticas.⁹⁷⁻⁹⁹

Karasiket *al.*⁹⁸, em 2010, examinaram as relações entre as características relacionadas à osteoporose com base em GWAS.⁹⁸ Avaliaram diversas variantes de nucleotídeo único em 2.073 mulheres com idade média de 65 anos, estimando as correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre as características ósseas. Foram encontrados 38 SNV em genes que poderiam estar associados à osteoporose, dentre estes o *NELL1*. Todavia, os autores afirmam que são necessários mais estudos para entender melhor a especificidade do local dos determinantes genéticos dos fenótipos ósseos e a associação deles com o maior risco de fratura.⁹⁸

Liet *al.*¹⁰⁰, em 2020, realizaram uma investigação *in vivo* acerca do papel da proteína NELL-1 na patogênese da osteoartrite e seus potenciais benefícios terapêuticos. A osteoartrite é condição inflamatória crônica em que ocorre a degeneração da cartilagem articular e das estruturas ósseas adjacentes.¹⁰¹ Nesse estudo, os autores verificaram que a administração de NELL-1, em injeção intra-articular, suprimiu a expressão de citocinas inflamatórias e suas enzimas catabólicas da cartilagem de camundongos, regulando positivamente o fator de transcrição relacionado ao *runt (Runx)1* em condrócitos da cartilagem articular de camundongos e humanos. Em acréscimo, NELL-1 reduziu significativamente a inflamação estimulada por interleucina 1 β e os danos à cartilagem articular.¹⁰¹

Na periodontite, observa-se um infiltrado inflamatório nos tecidos moles gengivais e no periodonto, mediado pela resposta imune, desencadeando inflamação caracterizada pela produção de uma série de citocinas que, dentre outros mecanismos pró-absortivos, ativam os osteoclastos, células centrais da reabsorção óssea.^{42,43} O infiltrado inflamatório, nos tecidos moles gengivais e no periodonto, produz citocinas que ativam os osteoclastos, células centrais da reabsorção óssea, estimulando osteoblastos e células do ligamento periodontal a expressarem RANKL, bem como outras citocinas inflamatórias, estimulando, conseqüentemente, os osteoclastos a reabsorverem osso.⁶²⁻⁶⁵

Em um estudo dirigido por Wang *et al.*, em 2022, constatou-se que o uso combinado de BMP9 e proteína NELL-1 pode ter o potencial de promover a regeneração do osso alveolar na periodontite.⁸⁸ Uma investigação realizada por Lee *et al.*, em 2013 identificou genes fortemente expressos no folículo dental, relacionados ao desenvolvimento e à remodelação óssea. NELL-1 apresentou forte associação, uma vez que pode contribuir na diferenciação e na mineralização das células osteoblásticas.¹⁰¹

Algumas variantes genéticas que codificam proteínas envolvidas na resposta do hospedeiro podem ser fatores de risco para doenças inflamatórias, incluindo a periodontite.²⁹⁻³⁵ Com a finalidade de identificar possíveis variantes genéticas com a periodontite, Sanders *et al.*³⁶, em 2017 realizaram um GWAS em 10.395 participantes hispânicos e latinos, selecionaram os níveis de inserção clínica interproximal como medida de periodontite e relataram a existência de um *locus* gênico de significância genômica e outros quatro de significância sugestiva. O gene *NELLI* apresentou um SNV rs75715012, que mostrou associação positiva sugestiva.³⁶ Embora os resultados demonstrem possível associação de *NELLI*, são necessários mais estudos para ilustrar o papel funcional de variantes do gene na periodontite.

2.4 FATORES AMBIENTAIS E GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE

A multifatorialidade da periodontite envolve fatores relacionados ao comportamento do indivíduo quanto ao estilo de vida, o que inclui a higiene oral, condição sistêmica do paciente, hábitos de vida e fatores ambientais que podem ou não apresentar influência epigenética.^{10,28,51} A disbiose bacteriana, as características anatômicas locais e os mecanismos genéticos, quando somados à resposta inflamatória imune do hospedeiro, configuram a complexidade da periodontite por estabelecerem um fenótipo que pode dificultar as estratégias de prevenção e de tratamento.⁴³

A literatura aponta a terapia mecânica e a antibioticoterapia sistêmica como tratamentos bem estabelecidos para a periodontite.^{102,103} A terapia mecânica, a raspagem e o alisamento radicular, constituem o tratamento tradicionalmente utilizado na periodontite.¹⁰⁴ Consiste na utilização de instrumentos automatizados, como raspadores ultrassônicos e instrumentos manuais, cuja finalidade é realizar raspagem e alisamento radicular dos elementos dentários.¹⁰⁴ Também se verifica a utilização de terapias cirúrgicas.^{103,104} Modalidades terapêuticas adjuvantes e alternativas disponíveis atualmente são evidenciadas na literatura, porém de forma limitada, a exemplo da terapia fotodinâmica antimicrobiana TFDa¹⁰⁵, a laserterapia de baixa potência (LBP)¹⁰⁶, o uso de probióticos¹⁰⁷, da própolis¹⁰⁸ e da clorexidina.¹⁰⁹ A terapia de manutenção periodontal e o acompanhamento longo prazo também são cruciais para o sucesso do tratamento.⁴³

Evidências apontam que uma parcela da população não responde aos tratamentos periodontais.^{2,6,10} A ausência de resposta aos tratamentos convencionais pode ser justificada pelo fato de a maior parte do dano tecidual na periodontite ser dependente da resposta imunológica inflamatória do hospedeiro.^{9,11,12,42} Essa resposta pode variar de acordo com os aspectos biológicos associados à predisposição genética do indivíduo.^{2, 3, 28, 103}

Existe uma variedade de determinantes que regulam o sistema imunológico, e esses fatores são intrínsecos ou adquiridos.³² Os fatores causais intrínsecos são os fatores de risco hereditários, ou seja, a suscetibilidade genética.^{2,3,6,32} Já os adquiridos estão relacionados ao estilo de vida e ao ambiente, podendo ter um impacto significativo na função imunológica.² Um aspecto em comum em doenças inflamatórias crônicas é o fato de estarem envolvidas com variantes genéticas a elas associadas, a exemplo dos polimorfismos de nucleotídeo único.^{2,34}

Estudos evidenciam variáveis importantes que estão associadas a um maior ou menor risco para a periodontite, dentre elas obesidade¹¹⁰, tabagismo¹¹¹, nível socioeconômico¹¹², raça ou etnia¹¹³, estresse¹¹⁴, idade¹¹⁵, sexo ou gênero¹¹⁶, diabetes¹¹⁷ e asma^{118,119}, apontadas como fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença.^{1,28,29}

Vários estudos relataram uma associação entre obesidade e periodontite.¹²⁰ A inflamação local, na periodontite, tem maior probabilidade de ter um efeito sistêmico em pacientes obesos do que em pacientes não obesos.¹¹⁰ As células imunológicas são ativadas no tecido adiposo e algumas das células imunes, ativadas por produtos bacterianos ou fatores inflamatórios do hospedeiro, podem migrar para o tecido adiposo através da circulação.¹²⁰ Os adipócitos liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, que induzem a produção de proteína C reativa (PCR), alterando a resposta do hospedeiro, deixando-o suscetível à infecção bacteriana. Na relação entre obesidade e periodontite, evidencia-se que a inflamação local é amplificada, afetando a porção sistêmica.^{29,120} Assim, a obesidade pode exacerbar a doença periodontal.^{29,110,120}

O tabagismo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite, independentemente do início, da extensão e da gravidade da doença.^{1,29} O tabaco desencadeia a supressão do sistema imunológico e a liberação de citocinas inflamatórias do fluido crevicular gengival, altera a função das células imunológicas e a regulação proteolítica além de promover danos oxidativos aos tecidos periodontais.¹¹¹

A presença da periodontite pode contribuir indiretamente, através da recorrência ou do agravamento dos ataques respiratórios, em pacientes com asma.¹¹⁸⁻¹²⁰ Alguns mecanismos

foram propostos para a associação entre as duas doenças, como aspiração de bactérias presentes no biofilme, disseminação hematogênica ou presença de mediadores químicos inflamatórios em bolsas periodontais, redução do fluxo salivar, desidratação da mucosa alveolar devido à respiração bucal e alteração da função imunológica.¹²¹ Somado a isso, o uso dos corticosteroides para o tratamento da asma pode promover efeitos imunossupressores.¹¹⁹ Em um estudo, foi demonstrado que a frequência da periodontite é maior em indivíduos com asma grave do que em indivíduos sem o diagnóstico de asma.¹²²

Com relação à associação do nível socioeconômico com periodontite, é possível observar que indivíduos com nível socioeconômico mais baixo apresentam sintomas da doença periodontal mais avançados, como edema gengival, enquanto aqueles com nível socioeconômico mais elevado relataram sintomas periodontais mais incipientes, como sangramento gengival.¹¹² A acessibilidade às orientações sobre higiene oral também influencia na saúde bucal e, conseqüentemente, no desenvolvimento da periodontite.^{28,29} Sobre a correlação de gênero com a predisposição em desenvolver periodontite, foi relatado, por meio de um estudo epidemiológico, que os homens correm maior risco de desenvolver as formas agressivas da periodontite, sugerindo interação entre sexo e fatores genéticos.^{29,112}

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de variantes do gene *NELLI* com a periodontite em uma população brasileira de Salvador, Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar e investigar a associação entre variantes genéticas no gene *NELLI* e a periodontite.

3.2.2 Avaliar o impacto funcional *in silico* das variantes genéticas estudadas em *NELLI* no estudo de associação com a periodontite.

3.2.3 Avaliar a interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NELLI* associados à periodontite e idade, obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental e asma.

4 ARTIGO

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *NELLI* COM A PRESENÇA DA PERIODONTITE EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Carneiro, Jaiza Kênsuly Moura Pinheiro¹; Cruz, Álvaro A.⁴; Barrientos, Marcia Otto^{1,3}; Gomes-Filho, Isaac Suzart⁵; Trindade, Soraya Castro⁵; Santana, Cinthia Vila Nova^{4,6}; Pinheiro, Gabriela Pimentel⁴; Souza-Machado, Adelmir⁴; Costa, Ryan dos Santos^{1,2}; Figueiredo, Camila A.^{1,2}; Oliveira, Tatiane Teixeira Muniz Carletto^{1,2}.

¹Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ²Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ³Escola de Saúde, Faculdade Adventista da Bahia, FADBA, Cachoeira, Bahia, Brasil; ⁴Fundação Programa para o Controle da Asma na Bahia –ProAR e Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil; ⁵Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil; ⁶Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: tatiane.teixeira@ufba.br

Resumo

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória que ocorre por interações complexas entre uma microbiota oral disbiótica e uma resposta imunológica do hospedeiro. Aspectos genéticos, ambientais e sistêmicos podem estar associados à periodontite. Estudos de genes candidatos e estudos de ampla associação do genoma (GWAS) buscam identificar associações entre variantes nos genes e a periodontite. O gene *NELLI* codifica uma proteína citoplasmática que contém repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e suas variantes genéticas podem estar envolvidas na regulação da diferenciação e do crescimento celular, relacionadas a proteína NELL-1 codificada. **Objetivo:** Investigar a associação entre variantes genéticas do gene *NELLI* e a periodontite. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal com 506 indivíduos adultos, não aparentados, classificados com presença (n=117) ou ausência (n=389) de periodontite, recrutados através do Programa para controle da Asma na Bahia (ProAR). Através de um questionário e entrevista, foram obtidas informações sobre características sociodemográficas, hábitos e estilo de vida, histórico médico e odontológico. Após a realização do exame oral, foram classificados com periodontite os indivíduos que apresentavam pelo menos 4 dentes com ao menos 1 sítio com profundidade de sondagem ≥ 4 mm; nível de inserção clínica ≥ 3 mm e sangramento ao estímulo no mesmo local. A genotipagem foi realizada utilizando o kit Illumina Infinium Multi-Ethnic. A análise de

associação foi realizada no software Plink 1.9 através da regressão logística multivariada ajustada por idade maior ou igual a 40 anos, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental, asma e ancestralidade. **Resultados:** Foram associadas positivamente à periodontite 25 variantes de nucleotídeo único (SNV) do gene *NELLI* e 14 variantes associadas negativamente. Foram observadas associações que dizem respeito à idade, obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental e asma. Os alelos das variantes rs10766721-A, rs74326837-A e rs76391583-G foram positivamente associados com a periodontite. As variantes rs6483735-A, rs919476-A e rs111375391-G foram positivamente associadas à periodontite. O alelo C do rs10766743 foi negativamente ligado a periodontite. Na variante rs34835859, indivíduos com o genótipo C/A no modelo aditivo, que utilizam o fio dental, apresentam 2,45 vezes a mais de chances de desenvolver periodontite, (OR = 2,45; IC95%= 1,17-5,12; valor de p = 0,026). Pessoas com idade maior ou igual a 40 anos, com genótipo G/G na variante rs7130084, possuem 2,88 vezes a mais de chances de desenvolver periodontite (OR = 2,88; IC95% = 1,35 – 6,13; valor de p = 0,035) do que pessoas com o mesmo genótipo e idade maior ou igual a 40 anos. **Conclusão:** Neste estudo, Variantes do gene *NELLI* foram associadas à periodontite. Na análise de gene-ambiente, as covariáveis obesidade, o não uso do fio dental, a presença de asma e a idade superior ou igual a 40 anos foram vinculadas às variantes relacionadas ao desenvolvimento da periodontite. Estudos prospectivos futuros devem ser realizados para testar a hipótese da influência e funcionalidade dessas variantes descritas no presente estudo.

Palavras-chave: Doenças periodontais; periodontite; polimorfismo de nucleotídeo único; fator de crescimento epidérmico.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is an inflammatory disease due to complex interactions between a dysbiotic oral microbiota and the host's immune response. Genetic, environmental, and systemic aspects may be associated with periodontitis. Candidate gene studies and genome-wide association studies (GWAS) seek to identify correlations between variants in genes and periodontitis. The *NELLI* gene encodes a cytoplasmic protein that contains epidermal growth factor (EGF)-like repeats and its genetic variants may be involved in the regulation of differentiation and cell growth, related to the encoded NELL-1 protein. **Purpose:** Investigate the association between genetic variants of the *NELLI* gene and periodontitis. **Materials and Methods:** A cross-sectional study was carried out with 506 unrelated adult individuals, classified as having the presence (n=117) or absence (n=389) of periodontitis, recruited through the Program for Asthma Control in Bahia (ProAR). Through a questionnaire and an interview, pieces of information were obtained about sociodemographic characteristics, habits and lifestyle, and medical and dental history. After the oral examination, individuals with at least 4 teeth with at least 1 site with a probing depth ≥ 4 mm, clinical attachment level ≥ 3 mm, and bleeding upon stimulation in the same location were classified as periodontitis. Genotyping was performed using the Illumina Infinium Multi-Ethnic kit. The association analysis was carried out in the Plink 1.9 software using multivariate logistic regression adjusted for age greater than or equal to 40 years, obesity, mouth breathing habits, use of dental floss, asthma, and ancestry. **Results:** Twenty-five variants of the *NELLI* single nucleotide (SNV) gene were positively associated with periodontitis and 14 variants were negatively associated. Correlations referring to age, obesity, mouth breathing habits, dental flossing, and asthma were observed. The alleles of the variants rs10766721-A, rs74326837-A, and rs76391583-G were positively related to periodontitis. Variants rs6483735-A, rs919476-A, rs111375391-G were positively associated with periodontitis. The C allele of rs10766743 was negatively associated with periodontitis. In

the rs34835859 variant, individuals with the C/A genotype in the additive model, who use dental floss, are 2.45 times more likely to develop periodontitis, (OR = 2.45; 95% CI = 1.17-5, 12; p-value = 0.026). People aged 40 years or older, with the G/G genotype in the rs7130084 variant, are 2.88 times more likely to develop periodontitis (OR = 2.88; 95% CI = 1.35 – 6.13; value p = 0.035) than people with the same genotype and age greater than or equal to 40 years. **Conclusion:** In this study, variants of the *NELLI* gene were associated with periodontitis. In the gene-environment analysis, the covariates obesity, lack of flossing use, presence of asthma, and age greater than or equal to 40 years are linked to variants associated with the development of periodontitis. Future prospective studies should be carried out to test the hypothesis of the influence and functionality of these variants described in the present study.

Keywords: Periodontal Disease; Periodontitis; Single nucleotide polymorphism; Epidermal Growth Factor.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma condição inflamatória iniciada pela interação entre um biofilme subgingival disbiótico e a resposta imunológica do hospedeiro.¹ Fatores ambientais e do hospedeiro influenciam nesse processo dinâmico.^{1,2} A doença afeta os tecidos de sustentação que circundam os dentes – osso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular e gengiva –, podendo resultar na perda de elementos dentários e até mesmo ocasionar uma condição inflamatória sistêmica.^{2,3} A perda de elementos dentários, associada a uma variedade de condições sistêmicas, tem sido reconhecida como um problema de saúde pública em todo o mundo.⁴

Mecanismos inflamatórios resultam da interação de agentes patogênicos com a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção persistente.^{5,6,7} A persistência da colonização bacteriana envolve a imunidade inata e adquirida do hospedeiro, levando à ativação de vias de sinalização, o que induz a resposta inflamatória, ocasionando a destruição do tecido ósseo e estruturas periodontais de suporte.⁸ A imunidade inata ativa as células hospedeiras primárias do corpo, preparando-o para a defesa contra infecções bacterianas, além de desencadear a imunidade adaptativa.^{8,9} Ocorre um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina 1-beta (IL-1 β), prostaglandinas e fator de necrose tumoral (TNF).^{5,6,9,10} A regulação do metabolismo ósseo é mediada pelo sistema receptor, ativador do fator nuclear kappa B (RANK) – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) – osteoprotegerina (OPG).¹¹ Essas proteínas apresentam papéis fundamentais na formação e na

sobrevida dos osteoclastos, sendo a interação RANKL e RANK essencial para a estimulação da osteoclastogênese e promoção da reabsorção óssea.^{5,8,11}

A interação de fatores de risco intrínsecos e extrínsecos influenciam a resposta do hospedeiro e a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da doença.¹² Estudos evidenciam variáveis importantes que estão associadas a um maior ou menor risco para a periodontite, como obesidade¹³, tabagismo¹⁴, nível socioeconômico¹⁵, estresse¹⁶, asma¹⁷, sexo ou gênero¹⁸, diabetes¹⁹, idade²⁰ e etnia ou raça²¹, apontados como fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença.²² Estudos passaram a investigar as influências genéticas para a suscetibilidade e gravidade da periodontite por meio de variantes genéticas em uma determinada população.^{23,24,25,26,27}

O gene *Neural EGFL Like 1*, *NELLI* (traduzido para o português: semelhante ao fator de crescimento epidérmico neural 1), codifica uma proteína citoplasmática que contém repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF).^{28,29} *NELLI* pode estar envolvido na regulação e na diferenciação do crescimento celular, bem como em diversas funções relacionadas ao desenvolvimento de doenças.^{29,30}

A proteína NELL-1 participa diretamente na ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina em células osteoclásticas e osteoblásticas.²⁹ Portanto, os efeitos positivos da NELL-1 na formação óssea e os efeitos negativos na reabsorção óssea podem ser explicados pela ativação ou inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina nos precursores de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. No processo patológico da periodontite, ocorre o estímulo da produção do RANKL e inibição da OPG.^{5,11} Alterações importantes nesse mecanismo podem resultar na perda óssea que caracteriza a periodontite.^{4,6,8,9,10,12}

Investigações de dados de GWASs e estudo de gene candidato revelaram possíveis associações de SNV de *NELLI* e amplas funções do gene, a exemplo de seu envolvimento no metabolismo ósseo.^{30,31} A identificação dos fatores genéticos para a periodontite e o estudo de possíveis genes envolvidos são importantes para avaliar o curso da doença quanto ao risco ou à gravidade da periodontite.^{2,4,32,33} Apesar do desenvolvimento de novos estudos, o mecanismo da patogênese da periodontite ainda não está completamente elucidado, uma vez que essa condição pode estar associada a diversas doenças sistêmicas e a aspectos multifatoriais do indivíduo.^{8,9,12} Portanto, este estudo tem por objetivo investigar a associação entre variantes do gene *NELLI* e a periodontite na população definida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo transversal envolveu 506 indivíduos adultos (≥ 18 anos), não aparentados e de ambos os sexos, sendo 117 com periodontite e 389 sem periodontite. Foram inicialmente recrutados através da coorte do Programa para controle da Asma na Bahia (ProAR), em Salvador (Bahia, Brasil). Foram coletadas informações de todos os participantes por meio de questionário e entrevista sobre hábitos e estilo de vida, antecedentes médicos e odontológicos, bem como acessibilidade a cuidados de saúde bucal. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), por escrito, foi obtido de cada indivíduo. A aprovação ética foi obtida pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CONEP nº 15782) com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 25000.013834/2010-96.

2.2 DIAGNÓSTICO DE PERIODONTITE

Para a determinação do diagnóstico de periodontite, foram verificados seis sítios em cada dente, com exceção dos terceiros molares. Os critérios foram definidos de acordo com Gomes-Filho *et al.* (2018)³⁴, envolvendo parâmetros de avaliação clínica como: medição de recessão, nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem. O exame intraoral foi realizado por um cirurgião-dentista periodontista, devidamente calibrado. A confiabilidade intraexaminador das medidas de recessão gengival e profundidade de sondagem foi avaliada pelo método de Bland e Altman (0,067 e 0,071 respectivamente) em 10% da amostra.³⁵

Foi identificada a presença de periodontite em elementos com, pelo menos, quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, com perda de inserção clínica ≥ 3 mm no mesmo sítio e presença de sangramento à sondagem, de acordo com os critérios de Gomes-Filho *et al.*³⁴, em 2018; nos demais, foi considerada a ausência de periodontite.

2.3 EXTRAÇÃO GENÔMICA DE DNA E GENOTIPAGEM

Amostras de sangue foram coletadas para a realização da extração genômica de DNA, utilizando-se o *kit FlexiGene (FlexiGene DNA Kit)*. A genotipagem foi realizada através do *Chip Illumina Multi-Ethnic Global Array (MEGA, Illumina)* com aproximadamente 2 milhões de marcadores do genoma humano (www.Illumina.com). As informações genéticas das variantes de *NELLI* foram extraídas entre as posições localizadas no cromossomo 11: NC_000011.10 (20669551-21575686) versão do genoma GRCh38 (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os limites dos genes nas coordenadas GRCh38 foram determinados empregando-se o banco de dados *ENSEMBL* ([//useast.ensembl.org/](http://useast.ensembl.org/)).

2.4 ANÁLISE *IN SILICO*

Análises funcionais foram verificadas, neste estudo, para cada SNV estatisticamente significativo em *NELLI*, catalogado em bancos de dados públicos, como o repositório de variantes dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). A caracterização e as informações sobre a função foram verificadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) e no banco de dados *ENSEMBL* (<https://www.ensembl.org>). A análise do desequilíbrio de ligação (DL) foi realizada com o *software Haploview*[®] 4.2 ([//www.broadinstitute.org/haploview/haploview](http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview)), em que o valor de $r^2 \geq 0,7$ foi estabelecido como alta correlação entre as variantes. A plataforma *on-line SNPStats* (www.snpstats.net) foi utilizada para as análises de gene-ambiente, em que foi realizada análise de interação de cada SNV com cada covariável (idade, obesidade, respiração bucal, uso de fio dental, asma), para verificar como o ambiente poderia interferir na periodontite. Essa análise foi ajustada pelas demais covariáveis que não estão sendo analisadas. Para a associação de haplótipos, os dados obtidos foram inseridos no pacote *snp.plotter* na versão R 4.0.3 (<https://cran.microsoft.com/snapshot/2019-10-09/web/pacotes/snp.plotter/index.html>).

2.5 ESTRATÉGIA ESTATÍSTICA

A investigação da associação de variantes genéticas no gene *NELLI* com a periodontite foi realizada através de regressão logística multivariada em três modelos – aditivo (ADD), dominante (DOM) e recessivo (REC) –, usando-se o *software PLINK 1.9*. Para a decisão quanto ao melhor modelo de ajuste, as covariáveis inicialmente foram verificadas com o desfecho através do teste qui-quadrado.³⁶ O modelo de ajuste adequado apresentou as variáveis idade (dicotomizada ≥ 40 anos), obesidade ($\text{IMC} \geq 30$), respiração bucal, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), asma e ancestralidade. Para os resultados, foram determinados os valores de *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC = 95%). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valor de p e valor p permutacional de 10.000 vezes, quando menor ou igual a 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram incluídos, no estudo, 506 participantes do Programa para Controle de Asma na Bahia, que possuíam dados relacionados à genotipagem e que atendiam aos critérios de qualidade anteriormente descritos. A amostra foi composta por 506 indivíduos, 85 homens e 421 mulheres. A Tabela 1 apresenta características relacionadas ao estilo de vida, características gerais de saúde e de saúde bucal da amostra. Podem ser observadas, nessa tabela, as diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com e sem periodontite em relação a idade (≥ 40 anos), obesidade, diagnóstico de asma, uso de fio dental e hábito de respirar pela boca ($p < 0,05$).

Tabela 1–Caracterização da população de estudo quanto a parâmetros demográficos, presença de morbidades e saúde bucal

Características	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	p-valor*
-----------------	----------------------	----------------------	----------

	n = 389	n = 117	
≥ 40 anos	253 (65.0)	88 (75.2)	0.04
Mulheres	327 (84.1)	94 (80.3)	0.345
Idade escolar ≤ 4	325 (83.5)	80 (68.4)	0.000
Comorbidades			
Sobrepeso (IMC ≥ 25)	265 (68.1)	91 (77.8)	0.045
Obesidade (IMC ≥ 30)	102 (26.2)	47 (40.2)	0.004
Hipertensão	99 (25.5)	43 (36.8)	0.017
Diabetes	18 (4.7)	9 (7.7)	0.196
Presença de cardiopatias	10 (2.6)	8 (6.8)	0.029
Hipercolesterolemia	43 (11.1)	15 (12.80)	0.599
Asma	219 (56.3)	95 (81.2)	0.000
Histórico odontológico			
Respiração bucal	228 (58.6)	91 (77.8)	0.000
Nunca ou ≥ 1 ano/dentista	204 (52.4)	76 (65.0)	0.017
Dente permanente perdido	335 (86.1)	110 (94.0)	0.021
Presença de má oclusão	270 (69.4)	92 (78.6)	0.053
Hábitos de higiene bucal			
Uso de fio dental	221 (56.8)	45 (38.5)	0.000
Uso de enxaguante bucal	148 (38.1)	52 (44.4)	0.215
Troca de escova em menos de 4 meses	269 (69.2)	77 (65.8)	0.496

*Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: Barrientos.³⁵

As variantes examinadas neste estudo que apresentaram associação significativa com a periodontite estão inseridas na Tabela 2. No gene *NELLI*, 25 variantes foram positivamente associadas e 14 negativamente associadas à periodontite, nos modelos recessivo, dominante e aditivo.

Tabela 2 – Associação significativa entre variantes do gene *NELL-1* e periodontite por regressão logística ajustada para idade, obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental, asma e ancestralidade.

<i>NELLI</i>									
SNV	A1/A2	Modelo	Genótipo	Com periodontite (%)	Sem periodontite (%)	OR*	IC95%	Valor de p	p perm
rs7126959	G/A	REC	AA+AG	102(87.1)	373(95.9)	3.15	1.43 - 6.90	0.004	0.003
			GG	15(12.8)	16(4.11)				
rs1793003	C/G	REC	GG+GC	90(76.8)	330(84.7)	1.99	1.15 - 3.45	0.014	0.012

			CC	27(23.0)	59(15.1)				
			GG	37(31.6)	144(37.0)				
rs6483735	A/G	ADD	GA	55(47.0)	193(49.6)	1.41	1.03 - 1.95	0.034	0.035
			AA	25(21.3)	52(13.3)				
		REC	GG+GA	92(78.6)	337(86.6)	1.97	1.12 - 3.48	0.019	0.018
			AA	25(21.3)	52(13.3)				
rs73456743	C/A	ADD	AA	61 (52.1)	244 (62.7)	1.61	1.13 - 2.30	0.009	0.011
			AC	45 (38.4)	130 (33.4)				
			CC	11(9.4)	15 (3.8)				
		DOM	AA	61(52.1)	244(62.7)	1.61	1.03 - 2.51	0.036	0.046
			CC+AC	56(47.8)	145(37.2)				
		REC	AA+AC	106(90.5)	374(96.1)	2.79	1.17 - 6.66	0.021	0.014
CC	11(9.4)		15(3.8)						
rs7109477	G/A	REC	AA+AG	108(92.2)	329(84.5)	0.42	0.20 - 0.90	0.025	0.019
			GG	09(7.6)	60(15.4)				
rs1557461	G/A	REC	AA+AG	104(68.1)	368(94.5)	2.41	1.10 - 5.30	0.029	0.019
			GG	13(11.1)	21(5.4)				
rs10766721	A/G	ADD	GG	33(28.0)	144(37.0)	1.57	1.13 - 2.18	0.007	0.008
			GA	61(52.1)	201(51.6)				
			AA	23(19.6)	44(11.3)				
		DOM	GG	33(28.2)	144(41.7)	1.73	1.06 - 2.80	0.028	0.036
			AA+GA	84(71.7)	245(62.9)				
		REC	GG+GA	94(80.3)	345(88.6)	1.91	1.06 - 3.43	0.031	0.027
AA	23(19.6)		44(11.3)						
rs7130084	A/G	REC	GG+GA	111(94.8)	347(89.2)	0.36	0.14 - 0.91	0.031	0.027
			AA	6(5.1)	42(10.8)				
rs1400366	A/G	REC	GG+GA	99(84.5)	349(89.6)	1.99	1.05 - 3.77	0.034	0.042
			AA	18(15.4)	40(10.3)				
rs7109004	G/A	REC	AA+AG	99(84.6)	295(75.8)	0.54	0.30 - 0.97	0.040	0.042
			GG	18(15.4)	94(24.1)				
rs4539321	A/C	ADD	CC	49(41.8)	133(34.1)	0.72	0.52 - 0.99	0.043	0.039
			CA	55(47.0)	185(47.5)				
			AA	13(11.1)	70(17.9)				
		REC	CC+CA	104(88.8)	318(81.9)	0.52	0.27 - 0.99	0.047	0.047
AA	13(11.1)		70(18.0)						
rs1670644	A/G	REC	GG+GA	98(83.7)	288(74.0)	0.57	0.32 - 0.99	0.049	0.046
			AA	19(16.2)	100(25.7)				
rs7114554	A/G	DOM	GG	94(80.3)	351(90.4)	3.02	1.63 - 5.59	<0.001	<0.001
			AA+GA	23(19.6)	37(9.5)				
rs76391583	G/A	DOM	AA	101(86.3)	370(95.1)	3.27	1.55 - 6.92	0.002	0.002
			GG+AG	16(13.6)	19(4.8)				
rs77258944	C/A	ADD	AA	70(59.8)	184(47.3)	0.63	0.44 - 0.92	0.015	0.012

			AC	41(35.0)	170(43.7)				
			CC	6(5.1)	35(8.9)				
		DOM	CC+CA	70(59.8)	184(89.6)	0.58	0.37 - 0.90	0.015	0.014
			AA	47(40.2)	205(10.3)				
		ADD	CC	84(71.7)	238(61.1)	0.59	0.38 - 0.90	0.015	0.015
			CA	30(25.6)	135(34.7)				
			AA	3(2.5)	16(4.1)				
rs10833542	A/C	DOM	CC	84(71.7)	238(61.1)	0.53	0.33 - 0.87	0.011	0.009
			AA+CA	33(28.2)	151(38.8)				
		ADD	AA	71(60.6)	190(48.9)	0.63	0.44 - 0.92	0.016	0.017
			AC	41(35.0)	166(42.7)				
rs116092797	C/A		CC	5(4.2)	32(8.2)				
		DOM	AA	71(60.6)	190(48.9)	0.59	0.38 - 0.92	0.021	0.024
			CC+AC	46(39.3)	198(51.0)				
rs78633883	G/A	DOM	AA	99(84.6)	361(92.8)	2.21	1.13 - 4.34	0.021	0.021
			GG+AG	18(15.3)	28(7.1)				
rs76863810	A/G	DOM	GG	115(98.2)	358(92.0)	0.18	0.04 - 0.77	0.021	0.014
			AA+GA	2(1.7)	31(7.9)				
		ADD	AA	102(87.1)	366(94.0)	2.20	1.11 - 4.35	0.024	0.017
			AG	14(11.9)	22(5.6)				
rs145112118	A/G		GG	1(0.8)	1(0.2)				
		DOM	GG	102(87.1)	366(94.0)	2.19	1.05 - 4.58	0.036	0.039
			AA+GA	15(12.8)	23(5.9)				
rs113987552	A/G	DOM	GG	101(86.3)	366(94.1)	2.30	1.11 - 4.74	0.025	0.027
			AA+GA	16(13.7)	23(5.9)				
rs1611930	A/G	DOM	GG	30(25.6)	150(38.5)	1.84	1.13 - 2.99	0.015	0.012
			AA+GA	87(74.3)	239(61.4)				
rs10766737	G/A	ADD	AA	40(34.1)	101(25.9)	0.73	0.53 - 0.99	0.041	0.034
			AC	55(47.0)	187(48.0)				
			CC	22(18.8)	101(25.9)				
rs10766816	C/A	ADD	AA	69(58.9)	268(68.8)	1.48	1.00 - 2.16	0.046	0.046
			AC	41(35.0)	111(28.5)				
			CC	7(5.9)	10(2.5)				
rs114514959	A/G	DOM	GG	106(90.5)	372(95.6)	2.36	1.01 - 5.55	0.048	0.040
			AA+GA	11(9.4)	17(4.37)				
rs1429793	A/C	DOM	CC	50(42.7)	210(54.0)	1.66	1.07 - 2.58	0.024	0.029
			AA+CA	67(57.3)	179(46.0)				
rs6483725	A/C	DOM	CC	94(80.34)	329(84.57)	1.83	1.02 - 3.27	0.041	0.046
			AA+CA	23(19.65)	60(64.83)				
rs919476	A/G	REC	GG+GA	109(93.16)	380(97.68)	2.99	1.03 - 8.72	0.043	0.019
			AA	7(6.03)	9(02.31)				
rs10766743	C/A	ADD	AA	56(47.86)	132(33.93)	0.66	0.48 - 0.91	0.012	0.013

			AC	47(40.17)	183(47.04)				
			CC	14(11.96)	74(19.03)				
		DOM	AA	56(47.86)	132(33.93)	0.59	0.38 - 0.92	0.021	0.022
			CC+AC	61(52.13)	257(66.06)				
rs10833411	A/G	ADD	AA	50(42.73)	123(31.61)	0.71	0.52 - 0.97	0.033	0.034
			AG	51(43.58)	188(48.32)				
			GG	16(13.67)	78(20.05)				
		ADD	AA	26(22.22)	143(36.76)	1.46	1.07 - 1.99	0.018	0.020
			AG	65(55.55)	184(47.38)				
			GG	26(22.22)	62(15.93)				
rs1465604	A/G	DOM	GG	26(22.22)	143(27.20)	2.08	1.25 - 3.45	0.004	0.005
			AA+GA	91(77.77)	246(63.23)				
rs34835859	C/A	DOM	AA	32(18.82)	155(40.15)	1.69	1.05 - 2.71	0.032	0.037
			CC+AC	85(72.64)	234(60.15)				
rs74326837	A/G	DOM	GG	109(93.16)	376(96.75)	2.88	1.09 - 7.60	0.033	0.018
			AA+GA	8(06.83)	13(03.34)				
rs79245106	G/A	DOM	AA	107(91.45)	372(95.62)	2.70	1.11 - 6.56	0.029	0.023
			GG+AG	10(08.54)	17(04.37)				
rs111375391	G/A	DOM	AA	108(92.30)	373(95.88)	2.65	1.07-6.567	0.022	0.036
			GG+AG	9(21.36)	16(06.42)				
rs7934072	A/G	DOM	GG	103(88.03)	367(96.65)	2.13	1.01 - 4.45	0.0457	0.038
			AA+GA	14(11.96)	22(05.65)				
		ADD	CC	85(72.64)	235(60.41)	0.64	0.43 - 0.96	0.029	0.038
			CG	28(23.93)	128(30.39)				
			GG	4(03.41)	26(06.68)				
rs11605646	C/G	DOM	GG	85(72.64)	235(60.41)	0.60	0.37 - 0.96	0.034	0.029
			CC+GC	32(27.35)	154(39.58)				
rs7120820	A/G	DOM	GG	62(52.99)	156(13.33)	0.60	0.39 - 0.94	0.024	0.025
			AA+GA	55(47.00)	233(59.89)				
rs1544266	G/A	DOM	AA	37(31.62)	160(41.13)	1.68	1.05 - 2.67	0.029	0.026
			GG+AG	80(68.37)	229(58.86)				

Nota: A1/A2 –menor alelo/alelo selvagem; ADD – modelo aditivo; modelo DOM – dominante; REC – modelo recessivo; OR – razão de chances; IC95% – intervalo de confiança 95%; p – valor significância estatística $p < 0,05$; p perm – p permutacional.

Fonte: dados do estudo.

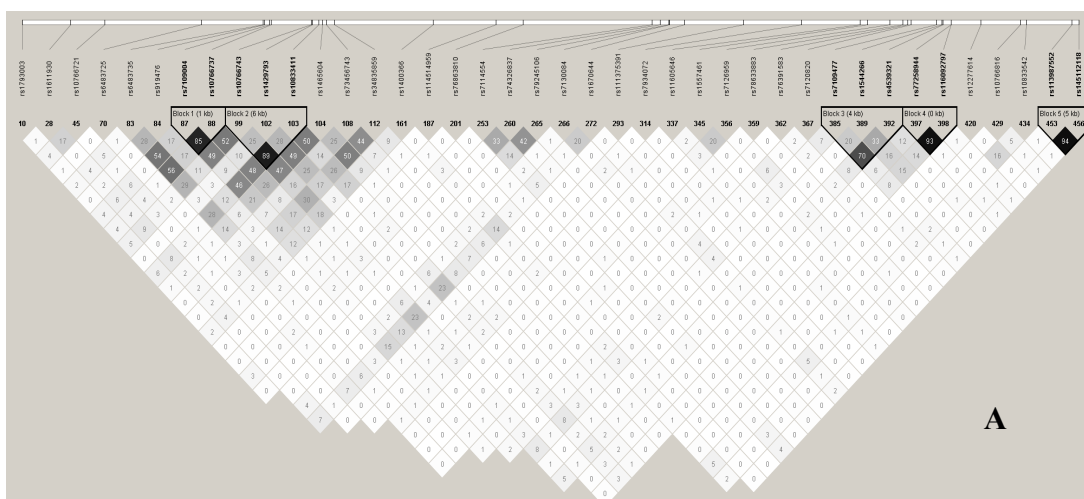
3.2 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

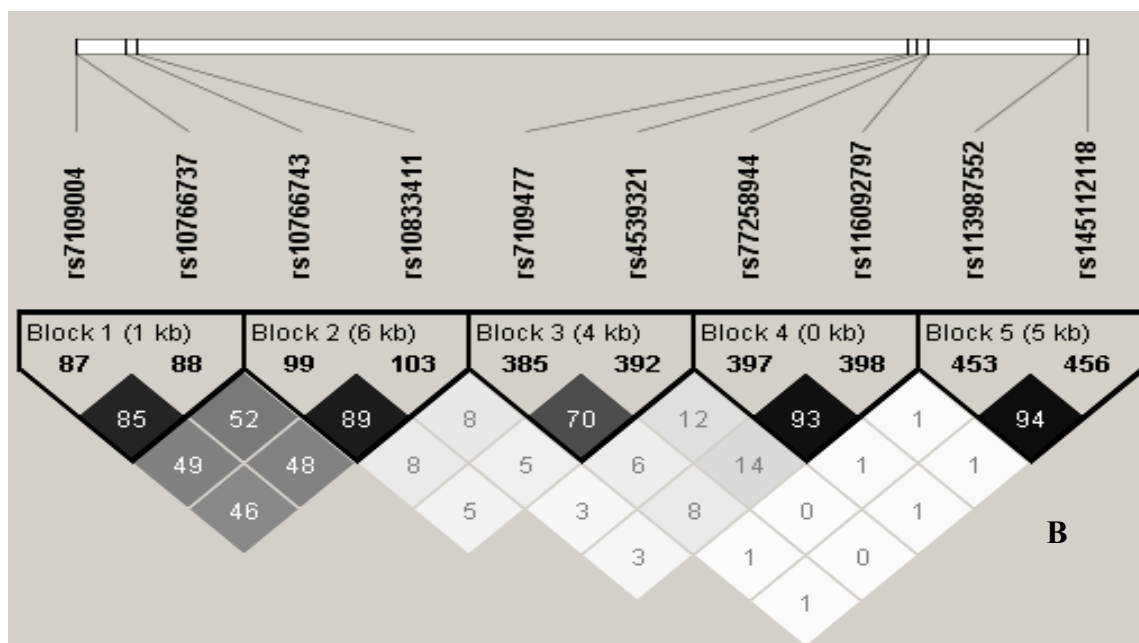
Os resultados da análise do desequilíbrio de ligação das 39 variantes genéticas incluídas neste estudo estão representados na figura 1A, apresentando 10 variantes separadas por blocos

de haplótipos. Ao verificar os resultados das 10 variantes demonstradas na figura 1B, pode-se observar que há um forte DL entre as variantes rs113987552 e rs145112118 ($r^2 = 0.94$) contidas no bloco 5 (5kb), e entre as variantes rs77258944 e rs116092797 ($r^2 = 0.93$), contidas no bloco 4 (0kb). Nesta amostra, as variantes rs7109004 e rs10766737, presentes no bloco 1(1kb), apresentaram alto desequilíbrio de ligação ($r^2 = 0.85$). As variantes rs10766743 e rs10833411, contidas no bloco 2 (6kb), também apresentaram DL elevado ($r^2 = 0.89$). As variantes do bloco 3 (4kb), rs7109477 e rs4539321, também estão em DL ($r^2 = 0.70$).

Em seguida, foi verificada a formação de haplótipos entre variantes do gene *NELL1* associados à periodontite, e foi identificada, apesar da alta frequência haplotípica, uma associação negativa dos haplótipos formados com o desfecho (Tabela 3). Indivíduos que herdam, de forma conjunta, os alelos polimórficos G e G do haplótipo rs7109004–rs10766737 têm diminuídas, em 0,72 vezes, as chances de desenvolverem periodontite, apesar de terem apresentado frequência haplotípica elevada: 0,4523. Os demais haplótipos também apresentaram associação negativa com a periodontite. O haplótipo rs10766743-rs10833411 obteve a frequência haplotípica elevada (0.3982), e os indivíduos que apresentam os alelos polimórficos C e A, dessa associação de haplótipo, têm uma redução de 0,39 vezes na chance do diagnóstico da periodontite. As variantes dos haplótipos foram analisadas isoladamente e permaneceram em associação negativa com a periodontite, ou seja, o valor da OR se manteve menor que 1 em cada SNV isolada. Apesar de os haplótipos apresentarem DL alto, nenhum foi associado positivamente à periodontite (Figura 1B).

Figura 1 – Análise do DL de 39 variantes genéticas associadas à periodontite (Figura 1A), e 10 variantes (Figura 1B), localizadas no cromossomo 11 (n = 506).





Fonte: dados do estudo.

Tabela 3 – Associação de haplótipos entre variantes do gene *NELL1* com presença de periodontite (n = 506)

Chr	Combinação de haplótipos	Genótipo	Frequência de haplótipo	OR (95%CI)	p-valor
11	rs7109004- rs10766737	G-G	0,4523	0,72(0,52-0,98)	0,04
11	rs10766743- rs10833411	C-A	0,3982	0,68 (0,49-0,94)	0,02
11	rs7109477- rs4539321	G-A	0,3391	0,71 (0,51-0,99)	0,047
11	rs77258944- rs116092797	C-C	0,2767	0,63 (0,44-0,92)	0,017

Chr: cromossomo. OR: *odds ratio* ajustada para obesidade, hábito de respiração bucal, uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia) e asma. IC95%: intervalo de confiança 95%. p-valor < 0.05

Fonte: dados do estudo.

3.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO GENE E AMBIENTE

Para a covariável idade dicotomizada de 18 a 39 anos e ≥ 40 anos, somente uma variante foi associada à periodontite, para o modelo aditivo e dominante. Pessoas com idade maior ou igual a 40 anos, com genótipo G/G na variante rs7130084, possuem 2,88 vezes mais chances

de desenvolvimento de periodontite (OR = 2,88; IC95% = 1,35 – 6,13; valor de p = 0,035) do que pessoas do mesmo genótipo com idade menor ou igual a 39 anos (Tabela 4). A análise foi ajustada por presença de obesidade, presença de respiração bucal, uso de fio dental e presença de asma.

Tabela 4– Razão de chances para desenvolver periodontite em portadores do genótipo GG na variante rs7130084 comparativamente entre participantes do estudo com idade superior ou inferior a 40 anos

SNV	Modelo	Genótipo	Idade ≥40 anos	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	OR (95%IC)	p-valor
rs7130084	ADD	G/G	não	76 (40.86)	11 (20.37)	1	0.035
	DOM		sim	110 (59.14)	43 (79.63)	2.88 (1.35-6.13)	

SNV: variante de nucleotídeo único. IC95%: intervalo de confiança 95%. ADD: modelo aditivo. DOM: modelo dominante.

Fonte: dados do estudo.

Foi verificada a associação com a periodontite, através da razão de chances, entre pessoas com obesidade e pessoas não obesas com o mesmo genótipo. Dentre os participantes com genótipo G/G na variante rs10766721, os obesos apresentaram 3,46 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite (OR = 3,46; IC95% = 1.51 – 7.92; p-valor = 0.039). Dentre os indivíduos com genótipo G/G na variante rs74326837, os que estão em condição de obesidade apresentam 1,99 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite (OR = 1,99; IC95%= 1.25-3.17; p-valor= 0.026). Dentre aqueles com genótipo A/A na variante rs76391583, os obesos apresentaram 1,64 vezes mais chances de ter o diagnóstico de periodontite (OR= 1,64; IC95%= 1.01-2.66; p-valor= 0.049). Indivíduos obesos, com genótipo C/C na variante rs10833542 possuem 2,59 chances a mais de desenvolvimento de periodontite do que os não obesos no modelo aditivo (OR= 2,59; IC95%= 1.48-4.54; p-valor= 0.036). Os modelos genéticos de associação genotípica podem ser verificados na Tabela 5.

Além disso, foi realizada a análise de associação de periodontite em obesos com diferentes genótipos. Para a variante rs10833542, as pessoas obesas e que possuem genótipo A/C-A/A apresentam associação negativa com a periodontite, apresentando 7,3 vezes menos chances de desenvolvê-la (OR= 0.27; IC95%= 0.12-0.61; p-valor=0.033). Ainda entre participantes obesos, na variante rs10766743, a associação negativa com a periodontite se repetiu entre os indivíduos com genótipo C/A, pois eles apresentaram chances 6,6 vezes

menores de desenvolvimento de periodontite do que as pessoas com genótipo A/A (OR = 0,34 95% IC = 0.15 – 0.81 p-valor = 0.017). A análise foi ajustada para idade (≥ 40 anos), hábito de respiração bucal, uso de fio dental e presença de asma (Tabela 5).

Tabela 5—Análise de interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NELL1* associados à periodontite e à obesidade. Análises ajustadas para idade, respiração bucal, uso de fio dental e asma

SNV	Modelo	Genótipo	Obesidade (sim/não)	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	OR (95%IC)	P-valor
rs10766721	ADD	G/G	não	109 (75.69)	16 (48.49)	1.00	0.039
			sim	35 (24.30)	17 (51.51)	3.46 (1.51-7.92)	
rs74326837	ADD e REC	G/G	não	279 (57.5)	62 (12.7)	1.00	0.026
			sim	97 (20)	47(9.6)	1.99 (1.25-3.17)	
rs76391583	ADD e DOM	A/A	não	269 (57.1)	60 (12.7)	1.00	0.049
			sim	101 (21.4)	41 (8.7)	1.64 (1.01-2.66)	
rs10833542	ADD E DOM	C/C	não	183 (76.8)	48(57.1)	1.00	0.036
			sim	55 (23.1)	36(42.8)	2.59 (1.48-4.54)	
	DOM	C/C	sim	55 (53.9)	36 (76.5)	1.00	0.033
		A/C – A/A	sim	47 (46.0)	11 (23.4)	0.27 (0.12-0.61)	
rs10766743	ADD	A/A	sim	34 (40.4)	25 (67.5)	1.00	0.017
		C/A	sim	50 (59.5)	12 (32.4)	0.34 (0.15-0.81)	

SNV: variante de nucleotídeo único. IC95%: intervalo de confiança 95%. ADD: modelo aditivo. DOM: modelo dominante. REC: modelo recessivo.

Fonte: dados do estudo.

Em indivíduos com o mesmo genótipo em uma determinada variante genética, foi verificada uma associação positiva ou negativa com a periodontite e o hábito de respiração bucal. Indivíduos com genótipo A/A na variante rs111375391, que possuíam hábito de respiração bucal, apresentaram 2,04 vezes mais chances para desenvolvimento de periodontite, com OR = 2,04; IC95% = 1.16-3.60; valor de p = 0.026, do que aqueles que não possuíam o mesmo hábito. Aqueles com genótipo G/G, na variante rs919476, que possuíam hábito de respiração bucal, apresentaram 2,91 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite, com OR = 2,91; CI95% =1.41-5.99; valor de p = 0.0055, do que os que não possuíam esse hábito (Tabela 6).

Adicionalmente, foi verificada uma associação entre periodontite e hábito de respirar pela boca, em indivíduos com diferentes genótipos para uma mesma variante genética. Entre os indivíduos que não possuíam o hábito de respirar pela boca, aqueles com genótipos A/G-A/A, modelo dominante, na variante rs919476, apresentaram 2,90 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite, com OR = 2,90; IC95% = 1.21-6.95 e valor de p = 0.008, do que os indivíduos G/G. Analisando-se apenas indivíduos com hábito de respiração bucal, os com genótipo A/G, na variante rs114514959, apresentaram 3,62 mais chances de desenvolvimento de periodontite em algum momento da vida, do que aqueles com genótipo G/G (OR = 3,62; IC95% = 1.38 – 9.46; valor de p = 0,022). Análises foram ajustadas para idade (≥ 40 anos), presença de obesidade, uso de fio dental e presença de asma. Os modelos genéticos utilizados nas associações podem ser conferidos junto aos resultados expostos na Tabela 6.

Tabela 6–Análise de interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NELLI* associados à periodontite e o hábito de respiração bucal. Análises ajustadas para idade, obesidade, uso de fio dental e asma

SNV	Modelo	Genótipo	Respirador bucal (sim/não)	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	OR (95%IC)	p-valor	
rs111375391	ADD	A/A	não	154 (41.2)	20(18.5)	1.00	0.026	
	DOM REC		sim	219 (58.7)	88 (81.4)	2.04 (1.16-3.60)		
rs919476	ADD	G/G	não	113 (44.1)	11 (14.6)	1.00	0.0055	
			sim	143 (55.8)	64 (85.3)	2.91 (1.41-5.99)		
	DOM	G/G	não	113 (44.1)	11 (14.6)	1.00	0.008	
			sim	143 (55.8)	64 (85.3)	2.90 (1.41-5.98)		
		A/G-A/A	G/G	não	113 (70.1)	11 (42.3)		1.00
			não	48 (29.8)	15 (57.6)	2.90 (1.21-6.95)		
rs114514959	ADD	G/G	sim	218 (95.6)	80 (87.9)	3.62 (1.38 – 9.46)	0.022	
	DOM	A/G	sim	10 (4.3)	11 (12.0)			
	REC							

SNV: variante de nucleotídeo único. IC95%: intervalo de confiança 95%. ADD: modelo aditivo. DOM: modelo dominante. REC: modelo recessivo.

Fonte: dados do estudo.

Foi estudada a interação existente entre o uso e o não uso de fio dental, ao menos uma vez ao dia, em pessoas com o mesmo genótipo numa variante genética associada à presença de periodontite (Tabela 7). Pessoas que possuíam o hábito do uso de fio dental, pelo menos uma vez ao dia, com genótipo A/G, na variante rs1611930, para o modelo aditivo, apresentaram chances 7,3 vezes menores de desenvolvimento de periodontite do que aquelas que não

utilizavam o fio dental (OR= 0,27; IC = 0,14-0,51; valor de p= 0,033). Esse resultado é reforçado no modelo genético dominante, pois, dentre os indivíduos com genótipos A/G-A/A, os que utilizavam fio dental ao menos uma vez ao dia apresentaram chances 7 vezes menores de desenvolvimento de periodontite, quando comparados aos que não fazem esse uso.

Para a variante rs34835859, os que apresentavam o genótipo A/A-C/A e que utilizavam o fio dental, revelaram associação negativa para a doença em questão, com menor chance (4 vezes) de desenvolvimento de periodontite do que os que não utilizavam o fio dental com regularidade, ao menos uma vez ao dia (OR = 0,60; IC95% = 0,37-0,97; valor de p = 0,023) (Tabela 7). Indivíduos com genótipo G/G, na variante rs74326837, que usavam fio dental ao menos uma vez ao dia, apresentaram chances 4,8 vezes menores de desenvolvimento de periodontite, com OR= 0,52; IC95%= 0,33-0,82; valor de p = 0,038, do que os que não usavam, ao menos uma vez por dia, para os modelos aditivo e recessivo. Pessoas que utilizavam o fio dental ao menos uma vez ao dia e possuíam genótipo A/A, na variante rs79245106, revelaram chances 4,5 vezes menores de ter o diagnóstico de periodontite, (OR= 0,55; IC95%= 0,35-0,87; valor de p = 0,0043), do que as pessoas que não possuíam esse hábito. Esse resultado se replicou nos modelos aditivo e dominante.

Para indivíduos com genótipos G/G-A/G da variante rs6483735, no modelo recessivo, observou-se que os possuidores do hábito de uso de fio dental, ao menos uma vez ao dia, apresentaram associação negativa com a presença de periodontite, tendo OR = 0,59; IC95% - 0,36-0,95 e valor de p = 0,03. As pessoas que faziam uso do fio dental, ao menos uma vez por dia, e que possuíam genótipo C/C-A/C, na variante rs10833542, revelaram proteção para a doença, reduzindo para 0,44 as chances de desenvolvimento de periodontite (OR= 0,44; IC95%=0,28-0,70; valor de p = 0,024), do que as pessoas que possuíam o mesmo genótipo sem o hábito referido. Resultados semelhantes foram encontrados na verificação de interação entre o hábito de usar fio dental ao menos uma vez ao dia e a presença de periodontite, em análise genética, no modelo recessivo, para aqueles com mesmo genótipo nas variantes rs1670644, rs7109477, rs4549321 e rs116092797. Notou-se que, na presença do mencionado hábito, os indivíduos com genótipos G/G-A/G, A/A-G/A, C/C-A/C, A/A-C/A, correspondentes às variantes citadas, demonstraram uma redução de 5,6 a 6,5 vezes nas chances de desenvolvimento de periodontite.

Quando foram considerados os indivíduos que possuíam o hábito de usar o fio dental ao menos uma vez ao dia e que possuíam diferente genótipo em variantes genéticas associadas à

presença de periodontite, neste estudo, constatou-se a existência de 2,45 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite em indivíduos com genótipo C/A do que o A/A na variante rs34835859 (OR = 2.45; IC95% = 1.17-5.12 e valor de $p = 0,026$), e chances 6,2 vezes menores de presença de periodontite para indivíduos com genótipo A/C quando comparados aos de genótipo C/C na variante rs10833542 (OR = 0,38; IC95% = 0,17 – 0,87 e valor de $p = 0,044$).

Ao analisar os indivíduos que não possuíam o hábito de usar o fio dental ao menos uma vez ao dia, observou-se que os que possuíam o genótipo A/G-A/A da variante rs1611930, no modelo dominante, revelaram quatro vezes mais chances de desenvolvimento da doença do que aqueles que possuíam o genótipo G/G e também não usavam (OR = 4,00; IC95% = 1.92-8.35 e valor de $p = 0,0017$). Confirmando esse resultado no modelo aditivo, indivíduos com genótipos A/G e A/A, separadamente, apresentaram 4,22 e 3,58 mais chances de desenvolverem periodontite do que os com genótipo G/G, nas mesmas condições analisadas. Também foram encontradas associações positivas para a presença de periodontite entre aqueles com genótipo A/A, comparados aos de genótipos G/G-A/G (modelo recessivo), dentre os que não usam fio dental com a regularidade de, ao menos, uma vez ao dia (OR = 3,60; IC95% = 1,62 – 7,96; valor de $p = 0,03$). A análise foi ajustada para idade (≥ 40 anos), presença de obesidade, hábito de respiração bucal e presença de asma (Tabela 7).

Tabela 7–Análise de interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NEL1* associados à periodontite e uso de fio dental, pelo menos uma vez ao dia. Análise ajustada para idade, obesidade, respiração bucal e asma

SNV	Modelo	Genótipo	Uso de fio dental	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	OR (95%IC)	p-valor
rs1611930	ADD	A/G	não	73 (40.7)	43 (67.1)	1.00	0.033
			sim	106(59.2)	21 (32.8)	0.27 (0.14-0.51)	
	DOM	A/G-A/A	não	103 (43.0)	60 (68.9)	0,30 (0,17-0,52)	0,0017
			sim	136 (56.9)	27 (31.0)		
	DOM	G/G	não	65 (38.6)	12 (16.6)	1.00	0.0017
		A/G-A/A	não	103 (61.3)	60 (83.3)	4.00 (1.92-8.35)	
	ADD	G/G	não	65 (38.6)	12 (16.6)	1,00	0,0058
		A/G	não	73 (43.4)	43 (59.7)	4,22 (1,95 – 9,11)	
	ADD	A/A	não	30 (17.8)	17 (23.6)	3,58 (1,45 – 8,84)	0,026
			sim	95 (50.8)	13 (30.9)		

rs34835859	REC	C/A	sim	92(49.1)	29(69.0)	2.45 (1.17-5.12)	0.023
			não	145 (43.6)	53 (55.7)	1.00	
rs74326837	ADD e REC	A/A-C/A	sim	187 (56.3)	42 (44.2)	0.60 (0.37-0.97)	0.038
			não	166 (44.1)	66(60.5)	1.00	
rs79245106	ADD e DOM	A/A	sim	208 (55.9)	44 (41.1)	0.55 (0.35-0.87)	0.0043
			não	164 (44.0)	63 (58.8)	1.00	
rs6483735	REC	G/G-A/G	sim	184 (54.5)	38 (41.3)	0.59 (0.36-0.95)	0,03
			não	153 (91.0)	54 (75)	3,60 (1,62-7,96)	
			A/A	15 (8.9)	18 (25)		
rs10833542	REC	C/C-A/C	sim	212 (56.8)	42 (36.8)	0.44 (0.28-0.70)	0.024
			não	161 (43.1)	72 (63.1)	1.00	
			C/C	132 (62.2)	33 (78.5)	0,38 (0,17 - 0,87)	
rs1670644	ADD	A/C	sim	80 (37.7)	9 (21.4)		0,044
			não	121 (42.0)	66 (67.3)	0,35 (0,21-0,59)	
rs7109477	REC	G/G-A/G	sim	167 (57.9)	32 (32.6)		0,0045
			não	136 (41.3)	70 (64.8)	0,39 (0,24-0,62)	
rs4549321	REC	A/A-G/A	sim	193 (58.6)	38 (35.1)		0,0052
			não	132 (41.5)	69 (66.3)	0,37 (0,23-0,60)	
rs116092797	REC	C/C-A/C	sim	186 (58.4)	35 (33.6)		0,0027
			não	157 (44.1)	72 (64.2)	0,44 (0,28 - 0,69)	
rs116092797	REC	A/A-C/A	sim	199 (55.8)	40 (35.7)		0,0058
			não	157 (44.1)	72 (64.2)		

SNV: variante de nucleotídeo único. IC95%: intervalo de confiança 95%. ADD: modelo aditivo. DOM: modelo dominante. REC: modelo recessivo

Fonte: dados do estudo.

Na análise de gene ambiente com a covariável asma, somente uma variante foi associada positivamente à periodontite para o modelo recessivo. Indivíduos asmáticos, com genótipo A/A-C/A, na variante rs10766743, apresentaram 2,41 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite do que aqueles que não eram asmáticos (OR = 2,41 CI95% = 1,37 – 4,22 e valor de p = 0,028). A análise foi ajustada para idade (≥ 40 anos), presença de obesidade, hábito de respiração bucal e uso do fio dental (Tabela 8).

Tabela 8 –Análise de interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NELL1* associados à periodontite e à asma. Análise ajustada para idade, obesidade, respiração bucal e uso do fio dental

SNV	Modelo	Genótipo	Asma	Sem periodontite (%)	Com periodontite (%)	OR (95%IC)	p-valor
-----	--------	----------	------	----------------------	----------------------	------------	---------

rs10766743	REC	A/A-C/A	não	139 (33.2)	22(5.2)	1	0.028
			sim	176 (42.1)	81 (19.3)	2.41(1.37-4.22)	

SNV: variante de nucleotídeo único. IC95%: intervalo de confiança 95%. ADD: modelo aditivo. DOM: modelo dominante. REC: modelo recessivo.

Fonte: dados do estudo.

4 DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo de associação genética que caracterizou variantes do gene *NELL1* e evidenciou a associação com a periodontite, com 25 SNV associados positivamente e 14 negativamente, em uma população miscigenada, em sua maioria autorreferida afrodescendente. Das 39 variantes analisadas e associadas ao desfecho, as variantes rs113987552 e rs145112118, rs77258944 e rs116092797, rs7109004 e rs10766737, rs10766743 e rs10833411, rs7109477 e rs4539321 demonstraram valores que estão relacionados a uma alta probabilidade de serem herdadas juntas e, dessa forma, aumentarem a chance de o indivíduo desenvolver periodontite. Em contrapartida, apesar da alta frequência haplotípica, foi observada uma associação negativa dos haplótipos formados com o desfecho.

Foi possível observar cinco haplótipos com alta probabilidade de serem herdados juntos, variando de 70% a 94%. Indivíduos podem herdar, de forma conjunta, os alelos do haplótipo rs7109004-G - rs10766737-G, que apresentam alto DL e frequência haplotípica elevada, porém com associação negativa com a periodontite. Na análise isolada das variantes dos haplótipos, observou-se que todas permaneceram em associação negativa com a periodontite. No estudo de Xu e colaboradores (2007)³⁷, realizou-se uma análise sistemática do DL de afro-americanos (AfA). Foi genotipada uma amostra de 48 indivíduos AfA em 24.341 SNVs, abrangendo quase todo o cromossomo 21, com uma densidade de 1,5 kb/SNV. Foram demonstrados aumentos substanciais do desequilíbrio de ligação, tanto em magnitude quanto em extensão, em populações recentemente miscigenadas, como a afro-americana.³⁷

Um estudo que replicou resultados de um GWAS, publicado no Estudo Auxiliar de Saúde Oral do Washington Heights/Inwood Columbia Aging Project (WHICAP)³⁸, realizou análises em genes relacionados a múltiplos fenótipos clínicos associados à periodontite, incluindo a perda de unidades dentárias, bem como característica de colonização microbiana periodontal,

sendo identificados 136 *loci* gênicos. Sete genes (*KIAA1715*, *LNPk*, *ROBO2*, *RAB28*, *LINC01017*, *NELL1*, *LDLRAD4 (C180rF1)*, *CRYBB2P1*) foram estatisticamente associados, de forma significativa, com a porcentagem de dentes com nível de inserção clínica ≥ 3 mm e dois genes (*RUNX2*, *LAMA2*) com a porcentagem de dentes com nível de inserção ≥ 5 mm. No referido estudo, o gene *NELL1* foi associado ao fenótipo de dentes com perda do nível de inserção clínica maior que 3mm. Esse foi um dos parâmetros considerados para o diagnóstico da periodontite, em nosso estudo. O total de 22 SNVs identificadas e as variantes associadas de forma significativa foram demonstradas por haplótipos: rs10833389 (T/G) e rs79814951(A/T). As variantes rs10833389 (T/G) e rs79814951 (A/T) foram associadas negativamente ao fenótipo de dentes com perda do nível de inserção clínica maior que 3mm. Os haplótipos rs74930916 e rs76797531 apresentaram um desequilíbrio de ligação elevado, aumentando as chances de associação ao fenótipo perda de nível de inserção clínica superior a 3 mm.³⁸ Não houve haplótipos coincidentes entre as duas investigações citadas na literatura e o presente estudo.

Muitos autores discutem o perfil complexo e multifatorial da periodontite. Nesse contexto, fatores ambientais, comportamentais e genéticos e suas relações são estudados.¹²⁻¹⁷ Este estudo analisou a interação entre genótipos de variantes genéticas do gene *NELL1* associados à periodontite e variáveis relacionadas a essa doença. O alelo A do rs7130084 está negativamente associado com a periodontite. Na análise do gene-ambiente, foi possível observar que indivíduos com idade maior ou igual a 40 anos, com genótipo G/G na variante rs7130084, possuem 2,88 vezes mais de chances de desenvolvimento de periodontite do que pessoas do mesmo genótipo com idade menor ou igual a 39 anos. A periodontite ocorre com maior frequência em indivíduos de faixas etárias avançadas, nos quais a prevalência pode chegar em torno de 90% entre os brasileiros com idade entre 45 e 49 anos.³⁹ O agravamento da periodontite com o envelhecimento está associado a diversos fatores. Algumas doenças sistêmicas são fatores de risco para a periodontite, e elas têm sua prevalência aumentada com a idade.⁴⁰ Eke *et al.*, em 2016, apresentaram dados com maior prevalência de periodontite nos EUA em uma parcela (45,9%) da população afetada com 30 anos ou mais.⁴¹

Os alelos das variantes rs10766721-A, rs74326837-A e rs76391583-G foram positivamente associados com a periodontite. Nas análises de interação com a obesidade, foi possível observar que a obesidade pode ser um fator de risco para a periodontite. Pessoas com obesidade, com genótipo G/G na variante rs10766721, apresentaram 3,46 vezes mais chances de desenvolvimento de periodontite do que as não obesas. Assim como indivíduos obesos com

genótipo G/G, na variante rs74326837, e obesos com genótipo A/A, na variante rs76391583, apresentaram mais chances de ter o diagnóstico de periodontite. Os alelos das variantes rs10833542-A e rs10766743-C foram negativamente associados com a periodontite. Nas análises de interação, indivíduos obesos, com genótipo C/C na variante rs10833542, possuíam 2,59 mais chances de desenvolvimento de periodontite do que os não obesos. As pessoas obesas, com genótipo C/A, na variante rs10766743, apresentaram 2,94 vezes menos chances de desenvolvimento de periodontite do que as não obesas. A literatura evidencia que a presença de obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite.⁴² No estudo de Kim *et al.*⁴³, em 2022, foi demonstrado que a obesidade evidenciou maior probabilidade de existência de periodontite, com uma razão de chances de 1,35. Já na análise de subgrupos, os países europeus apresentaram o OR mais elevado: 2,46.⁴³

Na associação com a presença do hábito de respiração bucal, três variantes apresentaram resultado com associação positiva, e uma foi negativamente associada à periodontite. Em nosso estudo, a ausência do hábito de respiração bucal demonstrou ser um fator de proteção ao diagnóstico clínico da periodontite. As variantes rs6483735-A, rs919476-A e rs111375391-G foram positivamente associadas à periodontite. Pessoas que não possuíam o hábito de respiração bucal, mas com genótipo A/A-A/G, na variante rs6483735, apresentaram mais chances de desenvolvimento de periodontite, do que as portadoras do genótipo G/G e que não apresentavam o hábito de respiração bucal. As que possuíam o hábito de respiração bucal e genótipo G/G, na variante rs919476, apresentaram mais chances de desenvolver periodontite, do que as que não possuíam o hábito e eram portadoras do mesmo genótipo. Já os indivíduos com genótipo A/G-A/A, na variante rs919476, e que não possuem o hábito de respiração bucal apresentaram chances 2,90 vezes maiores de desenvolvimento de periodontite, do que os indivíduos G/G que não apresentavam respiração bucal. Os indivíduos que apresentavam hábito de respiração bucal e genótipo A/A, na variável rs111375391, possuíam mais chances de desenvolvimento de periodontite do que aqueles que não possuíam esse hábito. A literatura evidencia um maior grau de inflamação gengival e maior tendência ao acúmulo de placa bacteriana entre os pacientes respiradores bucais.⁴⁴ A ausência do selamento do lábio superior ocasiona a formação de biofilme, diminuindo a resistência tecidual, sendo que a gravidade da inflamação depende da composição da microbiota local, o que pode evoluir para a periodontite.⁴⁵ O respirador bucal apresenta características clínicas bem definidas de inflamação gengival. A respiração bucal, em pacientes asmáticos, pode provocar redução do

fluxo salivar e desidratação da mucosa alveolar, aumentando as chances de desenvolvimento de periodontite.^{44,46}

Considerando o uso de fio dental (pelo menos uma vez ao dia), as variantes para seus respectivos genótipos apresentaram associação negativa com periodontite, com exceção da variante rs34835859, que, mesmo com utilização do fio dental, a presença do genótipo C/A para o modelo aditivo apresenta associação positiva com 2,45 vezes mais de chances para o diagnóstico da doença. A literatura destaca o uso adequado e regular de fio dental para remoção de placa dentária recém-formada. Usar o fio dental pode reduzir a gengivite, mais do que apenas escovar os dentes, e diminuir o risco de desenvolvimento de periodontite.⁴⁷

O alelo C do rs10766743 foi negativamente associado a periodontite. Na análise de interação com a asma, indivíduos com genótipo A/A-C/A apresentaram associação positiva com 2,41 vezes mais chances para o diagnóstico da doença. Dessa maneira, ser asmático é um fator de risco para o desenvolvimento da periodontite. Em um estudo dirigido por Soledade-Marques *et al.*⁴⁸, em 2018, observou-se uma associação entre asma grave e periodontite, pois a frequência de periodontite foi maior em indivíduos do grupo caso em comparação ao grupo controle, bem como nos indivíduos com periodontite, que apresentaram risco 3 vezes maior de desenvolver a asma grave.⁴⁸ Um estudo transversal, em indivíduos com diagnóstico autorrelatado de doenças alérgicas, incluindo asma e rinite, mostrou uma correlação positiva com problemas de saúde bucal, incluindo periodontite em adolescentes coreanos.⁴⁹

A plausibilidade biológica da associação entre saúde oral deficiente e asma ainda não foi estabelecida, porém se sugere que pode ocorrer maior deterioração periodontal em indivíduos asmáticos, devido ao aumento das citocinas inflamatórias e ao aumento de IgE no tecido gengival.⁵⁰ Gomes-Filho *et al.*⁵¹, em 2014, realizaram um estudo caso-controle e concluíram que pacientes adultos com periodontite apresentaram, aproximadamente, cinco vezes mais probabilidade de ter asma do que aqueles sem o diagnóstico de periodontite.⁵¹

5 CONCLUSÃO

As variantes do gene *NELLI* apresentam-se associadas positiva ou negativamente à periodontite. Na análise de gene-ambiente, as covariáveis obesidade, não uso do fio dental,

presença de asma e idade superior ou igual a 40 anos estão associadas a variantes vinculadas ao desenvolvimento da periodontite. Embora os resultados relatados promovam maior evidência dessa importante associação, estudos prospectivos futuros devem ser realizados a fim de melhor testar a hipótese sobre a influência e a funcionalidade das variantes descritas, no presente estudo, do gene *NELL1* com a periodontite.

Tabela suplementar

<i>NELL1</i>				
Posição	SNV	A1/A2	Função	Rank RegulomeDB
Chr11:21355605	rs7126959	G/A	Íntron	1f
Chr11:21169902	rs7114554	A/G	Íntron	1f
Chr11:21069124	rs76863810	A/G	Íntron	2b
Chr11:20715592	rs1611930	A/G	Íntron	3a
Chr11:20903493	rs10766743	C/A	Íntron	1f
Chr11:20912419	rs1465604	A/G	Íntron	1f
Chr11:21396536	rs1544266	G/A	Íntron	1f
Chr11:20677848	rs1793003	C/G	Íntron	7
Chr11:20866153	rs6483735	A/G	Íntron	5
Chr11:20915446	rs73456743	C/A	Íntron	5
Chr11:21392234	rs7109477	G/A	Íntron	7
Chr11:21338558	rs1557461	G/A	Íntron	5
Chr11:20742453	rs10766721	A/G	Íntron	5
Chr11:21183544	rs7130084	A/G	Íntron	6
Chr11:20999014	rs1400366	A/G	Íntron	7
Chr11:20871217	rs7109004	G/A	Íntron	7
Chr11:21397200	rs4539321	A/C	Íntron	6
Chr11:21195306	rs1670644	A/G	Íntron	7
Chr11:21369645	rs76391583	G/A	Íntron	7
Chr11:21403607	rs77258944	C/A	Íntron	5
Chr11:21462569	rs10833542	A/C	Íntron	7
Chr11:21403609	rs116092797	C/A	Íntron	5
Chr11:21366091	rs78633883	G/A	Íntron	4

Chr11:21503249	rs145112118	A/G	Íntron	4
Chr11:21497991	rs113987552	A/G	Íntron	6
Chr11:20872552	rs10766737	G/A	Íntron	5
Chr11:21457692	rs10766816	C/A	Íntron	7
Chr11:21048002	rs114514959	A/G	Íntron	5
Chr11:20904710	rs1429793	A/C	Íntron	5
Chr11:20817862	rs6483725	A/C	Íntron	6
Chr11:20867079	rs919476	A/G	Íntron	7
Chr11:20909745	rs10833411	A/G	Íntron	7
Chr11:20921798	rs34835859	C/A	Íntron	6
Chr11:21176297	rs74326837	A/G	Íntron	7
Chr11:21183178	rs79245106	G/A	Íntron	6
Chr11:21241260	rs111375391	G/A	Íntron	7
Chr11:21286913	rs7934072	A/G	Íntron	7
Chr11:21332273	rs11605646	C/G	Íntron	7
Chr11:21372313	rs7120820	A/G	Íntron	5

Fonte: dados do estudo.

REFERÊNCIAS

1. Mehrotra N, Singh S. Periodontitis. StatPearls [Internet]; 2023 Jul [cited 2023 Aug 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126>
2. Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):129-42. doi: 10.1111/prd.12267
3. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;15(75):317-29.
4. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat rev immunol Nature*. 2015;15(1):30-44.
5. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000 [Internet]*. 2015 Oct;69(1):7-17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/prd.12104>

6. Suárez LJ, Garzón, H, Arboleda, S, &Rodríguez, A. Oral dysbiosis and autoimmunity: from local periodontal responses to an imbalanced systemic immunity. A Review. *Front Immunol.* 2020;11. doi: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.591255/FULL>
7. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Scientific World Journal.* 2020 May 28;2146160. doi: 10.1155/2020/2146160. PMID: 32549797; PMCID: PMC7275199.
8. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. Mecanismos de resposta do hospedeiro em doenças periodontais. *J Appl Oral Sci.* 2015 May-Jun;23(3):329-55.
9. Deng Z-L, Szafranski SP, Jarek M, Bhujji S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep.* 2017;7(1):3703.
10. Hajishengallis G, Lambris JD. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Mar;11(3):187-200.
11. Nędzi-Góra M, Kowalski J, Górska R. The immune response in periodontal tissues. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017;65(5):421-9.
12. Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, et al. Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis. *J Dent Res.* 2011;90(10):1164-170. doi: 10.1177/0022034511401405
13. Arboleda S, Vargas M, Losada S, Pinto A. Review of obesity and periodontitis: an epidemiological view. *Br Dent J.* 2019;227(3):235-9. doi: 10.1038/s41415-019-0611-1
14. Borojevic T. Smoking and Periodontal Disease. *Mater Sociomed.* 2012;24(4):274. doi: 10.5455/msm.2012.24.274-276
15. Kim H-N, Jang Y-E, Kim C-B, Kim N-H. Socioeconomic status and self-reported periodontal symptoms in community-dwelling individuals: data from the Korea Community Health Surveys of 2011 and 2013. *Int Dent J.* 2018;68(6):411-9.
16. Wadia R. Stress and periodontitis. *Br Dent J.* 2020 Nov 27;229(10):669-669. doi: 10.1038/s41415-020-2450-5
17. Shen T-C, Chang P-Y, Lin C-L, Wei C-C, Tu C-Y, Hsia T-C, et al. Risk of Periodontal Disease in Patients With Asthma: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *J Periodontol.* 2017;88(8):723-30.
18. Freitag-Wolf S, Dommisch H, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufenbiel I, et al. Genome-wide exploration identifies sex-specific genetic effects of alleles upstream NPY to increase the risk of severe periodontitis in men. *J Clin Periodontol.* 2014;41(12):1115-21. doi: 10.1111/jcpe.12317

19. Li Y, Du Z, Xie X, Zhang Y, Liu H, Zhou Z, et al. Epigenetic changes caused by diabetes and their potential role in the development of periodontitis. *J Diabetes Investig.* 2021;12(8):1326-35.
20. Wu Y, Dong G, Xiao W, Xiao E, Miao F, Syverson A, et al. Effect of Aging on Periodontal Inflammation, Microbial Colonization, and Disease Susceptibility. *J Dent Res.* 2016 Apr;95(4):460-6. doi: 10.1177/0022034515625962.
21. Gonçalves PF, Harris TH, Elmariah T, Aukhil I, Wallace MR, Shaddox LM. Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. *J Periodontal Res.* Blackwell Munksgaard; 2018;53:164-73. doi: 10.1111/jre.12505
22. Laine M, Jepsen S, Loos BG. Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health Rep.* 2014;1:272-8.
23. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(6):430-49. doi: 10.1177/154411130301400605
24. Brodzikowska, A.; Górski, B. Polymorphisms in Genes Involved in Inflammation and Periodontitis: A Narrative Review. *Biomolecules.* 2022;12:552. doi: <https://doi.org/10.3390/biom12040552>
25. Feng P, Wang X, Casado PL, Kuchler EC, Deeley K, Noel J, et al. Genome wide association scan for chronic periodontitis implicates novel locus. *BMC Oral Health.* 2014 Jul 9;14(1).
26. Munz M, Richter GM, Loos BG, Jepsen S, Divaris K, Offenbacher S, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of aggressive and chronic periodontitis identifies two novel risk loci. *Eur J Hum Genet.* 2019 Jan 1;27(1):102-13.
27. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, Yang J. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet.* 2017;101(1):5-22. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.00
28. NELL1 neural EGFL like 1 [*Homo sapiens* (human)]. NCBI. 2023.
29. Li C, Zhang X, Zheng Z, Nguyen A, Ting K, Soo C. Nell-1 Is a key functional modulator in osteochondrogenesis and beyond. *J Dent Res.* 2019;98(13):1458-63. doi: 10.1177/0022034519882000
30. Xia K, Cen X, Yu L, et al. Long noncoding RNA expression profiles during the NELL-like 1 protein-induced osteogenic differentiation. *J Cell Physiol.* 2020;1-13. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.29526>
31. Cheng X, Shi J, Jia Z, Ha P, Soo C, Ting K, et al. NELL-1 in genome-wide association studies across human diseases. *Am J Pathol.* 2022;192(3):395-405. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.11.006>.
32. Brodzikowska A, Górski B. Polymorphisms in Genes Involved in Inflammation and periodontitis: a narrative review. *Biomolecules.* 2022;12:552.

33. Shaddox LM, Morford LA, Nibali L. Periodontal health and disease: The contribution of genetics. *Periodontol 2000*. 2021;85(1):161-181.
34. Gomes-Filho IS, Trindade SC, Passos-Soares J de S, Figueiredo ACMG, Vianna MIP, Hintz AM, et al. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. *J Dent Health Oral Disord Ther*. 2018;9(5):354-6. doi:10.15406/jdhodt.2018.09.00408
35. Barrientos, Marcia Otto. Estudo de associação genética para periodontite em indivíduos de Salvador-Ba [dissertação]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia; 2022.
36. Barrientos MO, Cruz AA, Teixeira HMP, Silva HDS, Gomes-Filho IS, Trindade SC, et al. Variants in interferon gamma inducible protein 16 (IFI16) and absent in melanoma 2 (AIM2) genes that modulate inflammatory response are associated with periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2023;147:105640. doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105640
37. Xu S, Huang W, Wang H, He Y, Wang Y, Wang Y, Qian J, Xiong M, Jin L. Dissecting linkage disequilibrium in African-American genomes: roles of markers and individuals. *Mol Biol Evol*. 2007 Sep;24(9):2049-58. doi: 10.1093/molbev/msm135
38. Yang T, Cheng B, Noble JM, Reitz C, Papapanou PN. Replication of gene polymorphisms associated with periodontitis-related traits in an elderly cohort: the Washington Heights/Inwood Community Aging Project Ancillary Study of Oral Health. *J Clin Periodontol*. 2022;49(5):414-27.
39. Santos, c. ML, Gomes-Filho, IS, Passos, JS, Cruz, SS, Goese, CSB, Cerqueira, EMM. Fatores associados à doença periodontal em indivíduos atendidos em um hospital público de Feira de Santana, Bahia. *Rev. Baiana Saúde Pública*. 2011;35 Suppl.1:S87-102.
40. Wu Y, Dong G, Xiao W, Xiao E, Miao F, Syverson A, et al. Effect of Aging on Periodontal Inflammation, Microbial Colonization, and Disease Susceptibility. *J Dent Res*. 2016 Apr;95(4):460-6.
41. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2015 May;86(5):611-22.
42. Iwashita M, Hayashi M, Nishimura Y, Yamashita A. The Link Between Periodontal Inflammation and Obesity. *Curr Oral Health Rep*. 2021;1-8.
43. Kim CM, Lee S, Hwang W, Son E, Kim TW, Kim K, Kim YH. Obesity and periodontitis: A systematic review and updated meta-analysis. *Front Endocrinol*. 2022 Oct 24;13:999455. doi: 10.3389/fendo.2022.999455
44. Nascimento Filho, E.; Mayer, M. P. A.; Pontes, P. A. L.; Pignatari, A. C. C.; WECKX, L. L. M. A respiração bucal é fator de risco para cárie e gengivite? *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2003;26(6):243-49.

45. Stensson, m.; wendt, l.k.; koch, g.; oldaeus, g.; ramberg, p.; birkhed, D. Oral health in young adults with long-term, controlled asthma. *Act Odontol Scand.* 2010b; 69(3):158-64.
46. Shen TC, Chang PY, Lin CL, Wei CC, Tu CY, Hsia TC, Shih CM, et al. Risk of Periodontal Disease in Patients With Asthma: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *J Periodontol.* 2017 Aug;88(8):723-730. doi: 10.1902/jop.2017.160414
47. Worthington HV, MacDonald L, PoklepovicPericic T, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P, Clarkson JE. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* [Internet]. 2019 Apr 10;4(4):CD012018. doi: 10.1002/14651858.CD012018.pub2
48. Soledade-Marques KR, Gomes-Filho IS, da Cruz SS, Passos-Soares J de S, Trindade SC, Cerqueira E de MM, et al. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case-control study. *Oral Dis.* 2018;24(3):442-8. doi: 10.1111/odi.12737
49. Wee JH, Park MW, Min C, Park IS, Park B, Choi HG. Poor oral health is associated with asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis in Korean adolescents: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(31):e21534. doi: 10.1097/MD.00000000000021534
50. Gomes-Filho IS, Soledade-Marques KR, Seixas da Cruz S, de Santana Passos-Soares J, Trindade SC, Souza-Machado A, et al. Does periodontal infection have an effect on severe asthma in adults? *J Periodontol.* 2014 Jun;85(6):e179-87.
51. Arbes SJ Jr, Matsui EC. Can oral pathogens influence allergic disease? *J AllergyClinImmunol.* 2011 May;127(5):1119-27. doi: 10.1016/j.jaci.2011.03.023.

5 CONCLUSÃO GERAL

Esta dissertação apresentou o primeiro estudo de associação de variantes genéticas do gene *NELLI* com a presença da periodontite em uma população de Salvador, Bahia/Brasil. Foram analisadas 39SNVs do gene *NELLI*, sendo 25 associadas positivamente à doença periodontal e 14 variantes associadas negativamente. Foi verificado o melhor modelo de ajuste das análises, identificando que as covariáveis idade maior ou igual a 39 anos, obesidade, hábito de respirar pela boca, uso de fio dental ao menos uma vez ao dia e presença de asma, foi o melhor modelo de ajuste para as análises de regressão logística. A idade maior ou igual a 39 anos, a obesidade, o não uso de fio dental, o hábito de respiração bucal e presença de asma, foram apontados como indicadores para o desenvolvimento da periodontite. As variantes do gene *NELLI* apresentaram DL elevado, mas, como haplótipos, não houve associação positiva

com a periodontite. *NELLI* é um gene candidato no envolvimento da periodontite. Ao considerar que fatores genéticos têm diferentes efeitos em diferentes populações, sugere-se a importância do desenvolvimento de mais estudos abordando não somente a relação das variantes do gene *NELLI* com outras populações internacionais, como também com amostras de outras regiões brasileiras. O aprofundamento neste tema possibilita a obtenção de mais resultados conclusivos e a determinação de um novo marcador molecular genético para a doença periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038.
2. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):26-39.
3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S162-70.
4. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-72.
5. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
6. Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):129-42.
7. Mehrotra N, Singh S. Periodontitis. *StatPearls* [Internet]; 2023 Agosto-. [cited 2023 Aug 9] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126>.
8. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005;49(3 SPEC. ISS.):517-32.
9. Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2015;(1):18-27.
10. Shaddox LM, Morford LA, Nibali L. Periodontal health and disease: The contribution of genetics. *Periodontol 2000*. 2021;85(1):161-81.

11. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):7-17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/prd.12104>
12. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30-44. doi: 10.1038/nri3785. PMID: 25534621; PMCID: PMC4276050.
13. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
14. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1:S1-8.
15. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-72.
16. GBD. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
17. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal*. 2020;2020:2146160.
18. Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol*. 2015;86(6):766-76.
19. Laxman VK, Annaji S. Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(7):97-107.
20. Coelho Rde S, Gusmão ES, Jovino-Silveira RC, Caldas Ade F. Profile of periodontal conditions in a Brazilian adult population. *Oral Health Prev Dent*. 2008;6(2):139-45.
21. Weatherspoon DJ, Borrell LN, Johnson CW, Mujahid MS, Neighbors HW, Adar SD. racial and ethnic differences in self-reported periodontal disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Oral Health Prev Dent*. 2016;14(3):249-57.
22. Toy VE, Uslu MO. Do genetic polymorphisms affect susceptibility to periodontal disease? A literature review. *Niger J Clin Pract*. 2019;22(4):445-53.
23. Bodineau A, Folliguet M, Séguier S. Tissue senescence and modifications of oral ecosystem in the elderly: risk factors for mucosal pathologies. *Curr Aging Sci*. 2009;2(2):109-20.

24. Shiau HJ, Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):81-94.
25. Li Y, Du Z, Xie X, Zhang Y, Liu H, Zhou Z, et al. Epigenetic changes caused by diabetes and their potential role in the development of periodontitis. *J Diabetes Investig*. 2021;12(8):1326-35.
26. Thomas MS, Parolia A, Kundabala M, Vikram M. Asthma and oral health: a review. *Australian Dental Journal*. 2010;55(2):128-33.
27. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012 Feb;58(1):37-68. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00415
28. Loos BG, Papantonopoulos G, Jepsen S, Laine ML. What is the Contribution of Genetics to Periodontal Risk? *Dent Clin North Am*. 2015;59(4):761-80.
29. Laine M, Jepsen S, Loos BG. Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health Rep*. 2014;1:272-8.
30. Yoshie, H.; Kobayashi, T.; Tai, H.; Galicia, JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43:102-32.
31. Rhodin K, Divaris K, North KE, Barros SP, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Chronic periodontitis genome-wide association studies: gene-centric and gene set enrichment analyses. *J Dent Res*. 2014;93(9):882-90.
32. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(6):430-49.
33. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):5-22.
34. Lappalainen T, MacArthur DG. From variant to function in human disease genetics. *Science*. 2021;373(6562):1464-8.
35. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet*. 2013;22(11):2312-24.
36. Sanders AE, Sofer T, Wong Q, Kerr KF, Agler C, Shaffer JR, et al. Chronic Periodontitis Genome-wide Association Study in the Hispanic Community Health Study / Study of Latinos. *J Dent Res*. 2017;96(1):64-72.
37. Shimizu S, Momozawa Y, Takahashi A, Nagasawa T, Ashikawa K, Terada Y, et al. A genome-wide association study of periodontitis in a Japanese population. *J Dent Res*. 2015;94(4):555-61.
38. NELL1 neural EGFL like 1[Homo sapiens (human)]. NCBI. 2023.

39. Li C, Zhang X, Zheng Z, Nguyen A, Ting K, Soo C. Nell-1 Is a key functional modulator in osteochondrogenesis and beyond. *J Dent Res.* 2019;98(13):1458-63.
40. Deng Z-L, Szafranski SP, Jarek M, Bhujji S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep.* 2017;7(1):3703.
41. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling inflammation to control infection. *Periodontol 2000.* 2017;75:317-29.
42. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29(6):248-57.
43. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *J Oral Microbiol.* 2023;15(1):2197779.
44. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S17-27. doi: 10.1002/JPER.17-0095
45. Steffens JP, Marcantonio RAC. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Revista de Odontologia da UNESP [Internet].* 2018 Aug;47(4):189–97. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/rounosp/v47n4/1807-2577-rounosp-47-4-189.pdf>
46. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: consensus report of workgroup 1 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol.* 2018; Jun;45 Suppl 20:S68-77. doi: 10.1111/jcpe.12940. PMID: 29926499
47. Gomes-Filho IS, Trindade SC, Passos-Soares J de S, Figueiredo ACMG, Vianna MIP, Hintz AM, et al. Clinical diagnosis criteria for periodontal disease: an update. *J Dent Health Oral Disord Ther.* 2018;9(5):354–6. doi:10.15406/jdhodt.2018.09.00408
48. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
49. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87.
50. Offenbacher S, Divaris K, Barros SP, Moss KL, Marchesan JT, Morelli T, et al. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Hum Mol Genet.* 2016;25(10):2113-129.
51. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm Res.* 2021 Jan;70(1):29-49.

52. Nędzi-Góra M, Kowalski J, Górska R. The immune response in periodontal tissues. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(5):421-9.
53. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Mecanismos de resposta do hospedeiro em doenças periodontais. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(3):329-55.
54. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80.
55. Kashem MA, Yuan XY, Li L, Kimani J, Plummer F, Luo M. TILRR (Toll-like Interleukin-1 Receptor Regulator), an Important Modulator of Inflammatory Responsive Genes, is Circulating in the Blood. *J Inflamm Res*. 2021;14:4927-43.
56. Ryder MI. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun 53:124-37.
57. Li W, Zhu Y, Singh P, Ajmera DH, Song J, Ji P. Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. *Dis Markers*. 2016;2016:1545974.
58. Saliem SS, Bede SY, Cooper PR, Abdulkareem AA, Milward MR, Abdullah BH. Pathogenesis of periodontitis - A potential role for epithelial-mesenchymal transition. *Jpn Dent Sci Rev*. 2022;58:268-78.
59. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007 Mar 15;15(6):2223-68. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.011
60. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:e7.
61. Deng J, Lu C, Zhao Q, Chen K, Ma S, Li Z. The Th17/Treg cell balance: crosstalk among the immune system, bone and microbes in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2022;57(2):246-55.
62. Souto GR, Queiroz-Junior CM, de Abreu MH, Costa FO, Mesquita RA. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One*. 2014;9(3):e91636.
63. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013;54(2):258-63.
64. Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis*. 2022;60:e23490.
65. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019; 9(1):a031245.

66. Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74 (9):1649-57.
67. Bokui N, Otani T, Igarashi K, Kaku J, Oda M, Nagaoka T. Involvement of MAPK signaling molecules and Runx2 in the NELL1-induced osteoblastic differentiation. *FEBS Lett*. 2008; 23;582(2):365-71.
68. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486.
69. Gibertoni F, Sommer MEL, Esquisatto MAM, Amaral MECD, Oliveira CA, Andrade TAM, et al. Evolution of Periodontal Disease: Immune Response and RANK/RANKL/OPG System. *Braz Dent J*. 2017;28(6):679-87.
70. Cheng X, Shi J, Jia Z, Ha P, Soo C, Ting K, et al. NELL-1 in genome-wide association studies across human diseases. *Am J Pathol*. 2022;192(3):395-405.
71. Eichler EE. Genetic Variation, Comparative Genomics, and the Diagnosis of Disease. *N Engl J Med*. 2019;381(1):64-74.
72. Courivaud C, Saas P, Ducloux D. Polymorphismes génétiques: comment interpréter les études? [Genetic polymorphisms: how to interpret studies?]. *Nephrol Ther*. 2012;8(3):141-5.
73. Brodzikowska, A.; Górski, B. Polymorphisms in Genes Involved in Inflammation and Periodontitis: A Narrative Review. *Biomolecules*. 2022;12:552. doi: <https://doi.org/10.3390/biom12040552>
74. Ting K, Vastardis H, Mulliken JB, Soo C, Tieu A, Do H, et al. Human NELL-1 expressed in unilateral coronal synostosis. *J Bone Miner Res*. 1999;14(1):80-9.
75. Zhang X, Zara J, Siu RK, Ting K, Soo C. The role of NELL-1, a growth factor associated with craniosynostosis, in promoting bone regeneration. *J Dent Res*. 2010;89:865-78.
76. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, et al. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2009;19(3):553-62.
77. Sanders AE, Sofer T, Wong Q, Kerr KF, Agler C, Shaffer JR, et al. Chronic Periodontitis Genome-wide Association Study in the Hispanic Community Health Study / Study of Latinos. *J Dent Res*. 2017;96(1):64-72.
78. Lee JH, Song YM, Min SK, Lee HJ, Lee HL, Kim MJ, et al. NELL-1 Increased the osteogenic differentiation and mrna expression of spheroids composed of stem cells. *Medicina*. 2021;57(6):586.
79. James AW, Pan A, Chiang M, Zara JN, Zhang X, Ting K, et al. A new function of Nell-1 protein in repressing adipogenic differentiation. *BiochemBiophys Res Commun*. 2011 Jul 22;411(1):126-31.

80. Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:369-76.
81. Qi H, Kim JK, Ha P, Chen X, Chen E, Chen Y, et al. Inactivation of Nell-1 in chondrocytes significantly impedes appendicular skeletogenesis. *J Bone Miner Res.* 2019;34(3):533-e46.
82. Wang B, Wu Y, Yu H, Jiang L, Fang B, Guo Q. The effects of NELL on corticotomy-assisted tooth movement and osteogenesis in a rat model. *Biomed Mater Eng.* 2018;29(6):757-e71.
83. Siu RK, Zara JN, Hou Y, James AW, Kwak J, Zhang X, et al. NELL-1 promotes cartilage regeneration in an in vivo rabbit model. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(3-4):252-61.
84. Pakvasa M, Alverdy A, Mostafa S, Wang E, Fu L, Li A, et al. Neural EGF-like protein 1 (NELL-1): signaling crosstalk in mesenchymal stem cells and applications in regenerative medicine. *Genes Dis.* 2017;4(3):127-37.
85. Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol.* 2013 Feb;200(4):537-49.
86. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jan;7(1):3.
87. Prestwich TC, Macdougald OA. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Dec;19(6):612-7.
88. Wang L, Li X, Song Y, Zhang L, Ye L, Zhou X, et al. NELL1 Augments Osteogenesis and Inhibits Inflammation of Human Periodontal Ligament Stem Cells Induced by BMP9. *J Periodontol.* 2022 Jul;93(7):977-87. doi: 10.1002/JPER.20-0517
89. Pang S, Shen J, Liu Y, Chen F, Zheng Z, James AW, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by a short isoform of NELL-1. *Stem Cells.* 2015 Mar;33(3):904-15. doi: 10.1002/stem
90. Felber K, Elks PM, Lecca M, Roehl HH. Expression of osterix is regulated by FGF and Wnt/ β -catenin signalling during osteoblast differentiation. *PLoS One.* 2015;10(12):e1440982.
91. Li C, Zheng Z, Zhang X, Asatrian G, Chen E, Song R, et al. Nfatc1 Is a Functional Transcriptional Factor Mediating Nell-1-Induced Runx3 Upregulation in Chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):168. doi: 10.3390/ijms19010168
92. Shen J, James AW, Zhang X, Pang S, Zara JN, Asatrian G, et al. Novel Wnt regulator NEL-like molecule antagonizes adipogenesis and augments osteogenesis induced by bone morphogenetic protein 2. *Am J Pathol.* 2016;186:419-34. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.011

93. Zhang X, Péault B, Chen W, Li W, Corselli M, James AW, et al. The Nell-1 growth factor stimulates bone formation by purified human perivascular cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;(19-20):2497-509. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0705
94. Hu K, Olsen BR. Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev Dyn*. 2017 Apr;246(4):227-34. doi: 10.1002/dvdy.24463
95. Lee M, Siu RK, Ting K, Wu BM. Effect of Nell-1 delivery on chondrocyte proliferation and cartilaginous extracellular matrix deposition. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1791-800.
96. Shen J, James AW, Zara JN, Asatrian G, Khadarian K, Zhang JB, et al. BMP2-induced inflammation can be suppressed by the osteoinductive growth factor NELL-1. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2390-401.
97. James AW, Shen J, Zhang X, Asatrian G, Goyal R, Kwak JH, et al. NELL-1 in the treatment of osteoporotic bone loss. *Nat Commun*. 2015;6(7362):e75. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms8362>
98. Karasik D, Hsu YH, Zhou Y, Cupples LA, Kiel DP, Demissie S. Genome-wide pleiotropy of osteoporosis-related phenotypes: the Framingham study. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1555-e63.
99. Dempster DW. Osteoporosis and the burden of osteoporosis-related fractures. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 6:S164-69.
100. Li C, Zheng Z, Ha P, Jiang W, Berthiaume EA, Lee S, et al. Neural EGFL like 1 as a potential pro-chondrogenic, anti-inflammatory dual functional disease modifying osteoarthritis drug. *Biomaterials*. 2020;226:119541.
101. Lee HS, Lee J, Kim SO, Song JS, Lee JH, Lee SI, et al. Comparative gene-expression analysis of the dental follicle and periodontal ligament in humans. *PLoS One*. 2013 Dec;28(12):e84201.
102. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J*. 2021;71(6):462-476. doi: 10.1111/idj.12630
103. Sholapurkar A, Sharma D, Glass B, Miller C, Nimmo A, Jennings E. Professionally Delivered Local Antimicrobials in the Treatment of Patients with Periodontitis-A Narrative Review. *Dent J (Basel)*. 2020;9(1):2.
104. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):36-47.
105. Salvi GE, Stähli A, Schmidt JC, Ramseier CA, Sculean A, Walter C. Adjunctive laser or antimicrobial photodynamic therapy to non-surgical mechanical instrumentation in patients with untreated periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2020;47 Suppl 22:S176-98.

106. AlZoubi IA. An Overview of the Systematic Evidence on the Adjunctive Use of Laser Therapy in Non-surgical Periodontal Treatment. *Cureus*. 2023;15(8):e44268. doi: 10.7759/cureus.44268
107. Invernici MM, Salvador SL, Silva PHF, Soares MSM, Casarin R, Palioto DB, et al. Effects of Bifidobacterium probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2018 Oct;45(10):1198-1210.
108. Seth TA, Kale TA, Lendhey SS, Bhalerao PV. Comparative evaluation of subgingival irrigation with propolis extract versus chlorhexidine as an adjunct to scaling and root planing for the treatment of chronic periodontitis: A randomized controlled trial. *J Indian Soc Periodontol*. 2022;26(2):151-6.
109. Zhao H, Hu J, Zhao L. Adjunctive subgingival application of Chlorhexidine gel in nonsurgical periodontal treatment for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):34.
110. Iwashita M, Hayashi M, Nishimura Y, Yamashita A. The Link Between Periodontal Inflammation and Obesity. *Curr Oral Health Rep*. 2021;8(4):76-83.
111. Borojevic T. Smoking and Periodontal Disease. *Mater Sociomed*. 2012;24(4):274. doi: 10.5455/msm.2012.24.274-276
112. Kim H-N, Jang Y-E, Kim C-B, Kim N-H. Socioeconomic status and self-reported periodontal symptoms in community-dwelling individuals: data from the Korea Community Health Surveys of 2011 and 2013. *Int Dent J*. 2018;68(6):411–9.
113. Gonçalves PF, Harris TH, Elmariah T, Aukhil I, Wallace MR, Shaddox LM. Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. *J Periodontal Res*. Blackwell Munksgaard; 2018;53:164-73. doi: 10.1111/jre.12505
114. Wadia R. Stress and periodontitis. *Br Dent J*. 2020 Nov 27;229(10):669-669. doi: 10.1038/s41415-020-2450-5
115. Wu Y, Dong G, Xiao W, Xiao E, Miao F, Syverson A, et al. Effect of Aging on Periodontal Inflammation, Microbial Colonization, and Disease Susceptibility. *J Dent Res*. 2016 Apr;95(4):460-6. doi: 10.1177/0022034515625962
116. Freitag-Wolf S, Dommisch H, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufienbiel I, et al. Genome-wide exploration identifies sex-specific genetic effects of alleles upstream NPY to increase the risk of severe periodontitis in men. *J Clin Periodontol*. 2014;41(12):1115-21. doi: 10.1111/jcpe.12317
117. Li Y, Du Z, Xie X, Zhang Y, Liu H, Zhou Z, et al. Epigenetic changes caused by diabetes and their potential role in the development of periodontitis. *J Diabetes Investig*. 2021;12(8):1326-35.

118. Shen T-C, Chang P-Y, Lin C-L, Wei C-C, Tu C-Y, Hsia T-C, et al. Risk of Periodontal Disease in Patients With Asthma: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *J Periodontol*. 2017;88(8):723-30.
119. Moraschini V, Calasans-Maia JA, Calasans-Maia MD. Association between asthma and periodontal disease: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2018;89(4):440-55.
120. Arboleda S, Vargas M, Losada S, Pinto A. Review of obesity and periodontitis: an epidemiological view. *Br Dent J*. 2019;227(3):235–9.
121. Gomes-Filho IS, Soledade-Marques KR, Seixas da Cruz S, de Santana Passos-Soares J, Trindade SC, Souza-Machado A, et al. Does periodontal infection have an effect on severe asthma in adults? *J Periodontol*. 2014;85(6):e179-87.
122. Soledade-Marques KR, Gomes-Filho IS, da Cruz SS, Passos-Soares J de S, Trindade SC, Cerqueira E de MM, et al. Association between periodontitis and severe asthma in adults: A case–control study. *Oral Dis*. 2018;24(3):442–8.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

JAIZA KÊNSULY MOURA PINHEIRO CARNEIRO

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DO GENE *NELL-1* COM A PRESENÇA DA PERIODONTITE

Salvador, Bahia, 12 de dezembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
gov.br TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETTI
 Data: 13/12/2023 04:01:19-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROFA. DRA. TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETTI (Examinadora Interna)

Documento assinado digitalmente
gov.br QUIARA LOVATTI ALVES
 Data: 14/12/2023 12:22:14-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROFA. DRA. QUIARA LOVATTI ALVES (Examinadora Interna)

Documento assinado digitalmente
gov.br VALDIRENE LEAO CARNEIRO LIMA
 Data: 17/12/2023 15:04:45-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROFA. DRA. VALDIRENE LEÃO CARNEIRO (Examinador Externo)