

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
“PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL

JULIANA ROSA FERREIRA DE OLIVEIRA ANDRADE

POLIMORFISMOS GENÉTICO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL E PERI-IMPLANTAR

DUQUE DE CAXIAS

2020

JULIANA ROSA FERREIRA DE OLIVEIRA ANDRADE

**POLIMORFISMOS GENÉTICO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL E PERI-IMPLANTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Dra. Carina Maciel da Silva
Boghossian

DUQUE DE CAXIAS

2020

JULIANA ROSA FERREIRA DE OLIVEIRA ANDRADE

**POLIMORFISMOS GENÉTICO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM
INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL E PERI-IMPLANTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biomedicina
Translacional da Universidade do Grande
Rio “Professor José de Souza Herdy” como
requisito para à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 29 de abril de 2020.

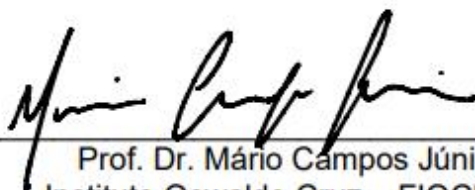
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Pereira
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Mário Campos Júnior
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus por me guiar até aqui; ao meu avô (*in memoriam*), que em vida, mesmo sem o mínimo estudo, sempre valorizou e priorizou a educação para todos os seus filhos e netos, para ele esse momento seria motivo de muito orgulho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e determinação diárias para chegar até aqui.

A Universidade do Grande Rio, pois desde o início da minha caminhada tem contribuído dia após dia para minha vida acadêmica.

A minha orientadora Carina Boghossian por ter me dado a primeira oportunidade na iniciação científica e ter novamente me dado a oportunidade de hoje estar me tornando mestre.

A todos os professores da pós graduação que agregaram imenso conhecimento a mim.

A toda equipe Labgen, que se tornara minha família acadêmica e foram fundamentais no meu aprendizado e crescimento nos últimos anos.

Aos órgãos de fomento FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, por todo apoio incondicional desde o início da minha trajetória.

Ao meu marido, que tem sido a minha calma nos momentos mais difíceis.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A doença periodontal é um dos principais problemas de saúde bucal, apresenta características inflamatórias e destrutivas e possui uma prevalência superior a 90%, sendo mais comum em indivíduos ≥ 50 anos tornando-se um caso de saúde pública, porém, pouco visibilizada. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de polimorfismos de mediadores inflamatórios em diferentes condições periodontais/peri-implantares. 111 indivíduos portadores ou não de implantes dentários foram submetidos a exame clínico periodontal e coleta de amostras de saliva. Os participantes foram divididos em 3 grupos: Saúde (n=36); Gengivite/Mucosite peri-implantar (n=40); e Periodontite/Peri-implantite (n=35). Foi avaliado o polimorfismo em interleucinas (*IL-1 β* , variante rs13032029; *IL-6*, variante rs2069837; e *IL-8*, variante rs4073) e no fator de necrose tumoral-alfa (*TNF- α* , variantes rs1799724, rs1800630 e rs1799964) através do PCR em Tempo Real e PCR-RFLP, respectivamente. Foram calculadas a distribuição genotípica e a alélica, assim como os valores de OR para a Periodontite/Peri-implantite. Na comparação entre Saúde e Periodontite/Peri-implantite, foram encontradas diferenças significativas na distribuição alélica somente para a variante rs13032029, pacientes portadores do alelo C possuem uma chance 2 vezes maior de desenvolvimento da Periodontite/Peri-implantite (OR = 2,24; IC 95%: 1,09-4,57). Em comparações entre os grupos Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/Mucosite, foi observado que há maior chance de Periodontite/ Peri-implantite quando o indivíduo apresenta o genótipo CC (OR = 3,84; IC 95%: 1,5-9,9) comparado com os genótipos CT+TT, e, na presença do alelo C, há chance maior de duas vezes de Periodontite/ Peri-implantite (OR = 2,45; IC 95%: 1,21-4,9). A comparação entre esses dois grupos mostrou também que, para a variante rs4073, o genótipo AA leva a uma maior chance de Periodontite/Peri-implantite (OR = 3,34; IC 95%: 1,03-10,76) em relação ao grupo Gengivite/ Mucosite; além disto, a variante rs1800630 demonstrou que a presença do alelo C diminui a chance do indivíduo ser portador de Periodontite/Peri-implantite (OR=0,40; IC 95%: 0,16-0,97). Conclui-se que na população estudada, houve associação entre variantes para os genes que codificam *IL-1B* rs13032029 alelo C, *IL-8* rs4073 genótipo AA e *TNF- α* rs1800630 alelo C e a susceptibilidade a doença periodontal destrutiva.

Palavras-chave: interleucina; fator de necrose tumoral; doença periodontal, periodontite; peri-implantite.

ABSTRACT

Periodontal disease is one of the main oral health problems, has inflammatory and destructive characteristics and has a prevalence above 90%, more common in individuals ≥ 50 years old, making it a public health case, however, little visible. The aim of this study was to investigate the occurrence of genetic polymorphisms of inflammatory mediators in different periodontal/ peri-implant conditions. 111 individuals with or without dental implants were subjected to periodontal examination and saliva sampling. Participants were divided in 3 groups: Health (n=36); Gingivitis/Peri-implant Mucositis (n=40); and Periodontitis/Peri-implantitis (n=35). The polymorphism of interleukins (*IL-1 β* , variant rs13032029; *IL-6*, variant rs2069837; and *IL-8*, variant rs4073) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α , variants rs1799724, rs1800630 and rs1799964), was evaluated using Real-Time PCR and PCR-RFLP techniques, respectively. Genotyping and allelic distribution were calculated, as well as OR values for Periodontitis/Peri-implantitis. Analysis between Health and Periodontitis/ Peri-implantitis, significant differences were found in the allelic distribution for variant rs13032029, and individuals with allele C were twice more prone to have Periodontitis/Peri-implantitis (OR = 2.24; IC 95%: 1.09-4.57). Comparisons between Periodontitis/Peri-implantitis and Gingivitis/ Mucositis groups showed that it is higher the chance to Periodontitis/ Peri-implantitis when there is the presence of wild genotype CC (OR = 3.84; IC 95%: 1.5-9.9) compared to CT+TT; and, in the presence of the allele C, there is a chance more than twice for Periodontitis/ Peri-implantitis (OR = 2.45; IC 95%: 1.21-4.9). Further analysis between those two groups have also shown that, for variant rs4073, wild genotype AA represents a higher chance of Periodontitis/Peri-implantitis (OR = 3.34; IC 95%: 1.03-10.76) compared to Gingivitis/Mucositis group; moreover, variant rs1800630 has shown that the presence of the wild allele C leads to a decrease in the chances of Periodontitis/ Peri-implantitis (OR=0.40; IC 95%: 0.16-0.97). In the studied population, associations between polymorphism variants code *IL-1B* rs13032029 allele C, *IL-8* rs4073 genotype AA and *TNF- α* rs1800630 allele C and susceptibility to destructive periodontal disease.

Keywords: interleukin; tumor necrosis factor; periodontal disease; periodontitis; peri-implantitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático das características periodontais.	17
Figura 2- Desenho esquemático das características peri-implantares.	18
Figura 3- Resposta imune do hospedeiro na periodontite crônica. Interação patogênica que ocorre no tecido gengival.	24
Figura 4- Avaliação clínica da medição dos sulcos.	32
Figura 5- Ciclagem padrão utilizada para o PCR em tempo real.....	36
Figura 6- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do IL-6 rs2069837 A/G que demonstra um resultado heterozigoto.	37
Figura 7- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do IL-6 rs2069837 A/G que demonstra um resultado para homozigoto selvagem.	37
Figura 8- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do IL-6 rs2069837 A/G que demonstra um resultado homozigoto mutado.	38
Figura 9- Ciclagem padrão para rs1799724.	39
Figura 10- Ciclagem padrão para rs1800630 e rs1799964.	39
Figura 11- Gel de agarose TNF- α rs1799964.....	40
Figura 12- Fluxograma com as etapas metodológicas.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes (IL) com sua respectiva variante (rs) e sondas empregadas no estudo.....	34
Tabela 2. Gene (TNF- α) com sua respectiva variante primers/ iniciadores empregados no estudo.....	34
Tabela 3. Protocolo utilizado no PCR em tempo real.	35
Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos estudados de acordo com o diagnóstico periodontal.....	43
Tabela 5. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs13032029 do gene IL-1 β na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.	45
Tabela 6. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs13032029 do gene IL-1 β na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.	46
Tabela 7. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs2069837 do gene IL-6 na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.	47
Tabela 8. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs2069837 do gene IL-6 na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.	48
Tabela 9. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs4073 do gene IL-8 na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal...	49
Tabela 10. Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs4073 do gene IL-8 na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.	50
Tabela 11. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799724 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.....	51
Tabela 12. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799724 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.....	52
Tabela 13. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799964 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.....	53
Tabela 14. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799964 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.....	53

Tabela 15. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800630 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.....54

Tabela 16. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800630 do gene TNF- α na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.....55

LISTA DE ABREVIACÕES

µL	Microlitro
Dp	Desvio-padrão
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Th	linfócito T auxiliar
TGF	Fator de crescimento transformador
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
OS	Profundidade de sondagem
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
P	Probabilidade
NCI	Nível clínico de inserção
MMPs	Metaloproteinases
IFN	Interferons
Mm	Milímetros
CFS	Fator estimulador de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Doença periodontal/ peri-implantar	17
2.1.2 Fatores de risco para doença periodontal/ peri-implantar	19
2.1.3 A genética da doença periodontal/ peri-implantar	21
2.1.4 Biomarcadores moleculares na periodontia	22
2.2 Processo inflamatório da doença periodontal/ peri-implantar	23
2.3 Genes candidatos	24
2.3.1 Citocinas	25
2.3.1.1 Interleucina-1	25
2.3.1.2 Interleucina-6	26
2.3.1.3 Interleucina-8	26
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 População de estudo	31
5.2 Dados anamnésicos	31
5.3 Avaliação Clínica	31
5.4 Coleta da saliva	33
5.4.1 Extração do DNA Genômico	33
5.5 Análise genético-molecular de polimorfismos	34
5.5.1 PCR em tempo real	34
5.5.2 PCR - RFLP	38
5.6 Fluxograma	40
5.7 Análise estatística	40
6. RESULTADOS	42
6.1 Dados demográficos e clínicos	42
6.2 Interleucinas	44
6.2.1 IL-1 β rs13032029	44
6.2.2 IL-6 rs2069837	46
6.2.3 IL-8 rs4073	49

6.3 Fator de necrose tumoral	51
6.3.1 TNF- α rs1799724	51
6.3.2 TNF- α rs1799964	52
6.3.3 TNF- α rs1800630	54
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	76
ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	79

1. INTRODUÇÃO

O periodonto é constituído pelos tecidos moles que envolvem os dentes, o osso alveolar e o ligamento periodontal. Essa estrutura pode ser acometida por uma patologia com característica infecto-inflamatória, a doença periodontal (DP), que é relativamente frequente na população (TE VELDE et al., 2016). Suas características envolvem uma série de quadros inflamatórios crônicos e pode ser especificado, de modo geral, da seguinte maneira quando afeta dentes: gengivite (não destrutiva) e periodontite (destrutiva). Quando esta doença afeta implantes dentários, pode ser do tipo não destrutiva (mucosite peri-implantar) ou destrutiva (peri-implantite) (KINANE et al., 2017).

A placa bacteriana dentária é um biofilme que se forma nas superfícies não descamativas da cavidade oral e é o fator etiológico das doenças periodontais/ peri-implantares. O acúmulo de placa culmina com a formação de um biofilme maduro patogênico, que com o passar do tempo, leva ao início de uma gengivite, uma condição inflamatória reversível nos tecidos marginais do periodonto. A gengivite não tratada, em alguns indivíduos, desencadeia a periodontite. Na periodontite, a resposta inflamatória leva à perda do tecido periodontal de sustentação dos dentes. Clinicamente, há a formação de "bolsas" periodontais e perda de inserção periodontal. Assim, a perda de inserção óssea e conjuntiva contínua, que são características da doença, pode levar à perda do dente (GOTSMAN et al., 2007; KHADER et al., 2006). Já em implantes, a mucosite peri-implantar se assemelha à gengivite, pois há apenas inflamação no tecido mole marginal. Na peri-implantite, semelhantemente à periodontite, além de existir a inflamação no tecido mole peri-implanta, há perda óssea ao redor do implante (BERGLUNDH et al. 2018; AAP, 2013; MOMBELLI *et al.*, 2012).

Há alguma variação na prevalência da DP entre populações. Isto é primeiramente devido à definição de casos, pois se baseia na combinação de perda de inserção clínica e profundidade de sondagem ou de bolsa. Estudos baseados nessas medições levaram a estimativas de prevalência superiores a 50% nos na população dos Estados Unidos. Além disto, as formas avançadas de periodontite, ou seja, perda grave de estruturas de suporte e perda dentária significativa, afetam 20 a 50% da população globalmente (NAZIR, 2017).

As buscas na literatura revelou uma carência de dados sobre a epidemiologia das doenças periodontais no Brasil. Uma revisão da literatura realizou o levantamento de dados epidemiológicos para avaliar a prevalência de doença periodontal através de uma revisão crítica da literatura odontológica referente a diversos estudos epidemiológicos independentes realizados e publicados no Brasil entre 1993 e 2003, concluiu-se que a prevalência geral de doença periodontal encontrada foi de 92,92% (CHAMBRONE et al., 2008).

Como mencionado acima, a presença de biofilme dentário patogênico é o fator etiológico das DP. Porém, a manifestação da doença dependerá de uma série de fatores comportamentais, como o tabagismo, e inerentes do indivíduo, como a resposta imunológica (PAGE & KORNMAN, 1997; ALBANDAR & RAMS, 2000). A resposta imunológica, por sua vez, é modulada por mecanismos epigenéticos e genéticos. Dentre os genéticos, podem ser incluídos os polimorfismos de citocinas inflamatórias. Há uma tendência mundial em identificar marcadores genéticos de suscetibilidade à DP focando em genes relacionados ao sistema imunoinflamatório, em particular as citocinas, essas são pequenas proteínas secretadas pelas células de defesa, são de grande importantes na regulação imune e já foi comprovada a sua relação com o processo de inflamação (HODGE et al., 2001; LÓPEZ et al., 2005). Estudos realizados anteriormente, demonstraram que variações alélicas, como os polimorfismos em genes que codificam citocinas, podem afetar a progressão e a suscetibilidade da DP (FRANCH et al., 2010; GRIGORIADOU et al., 2010; LÓPEZ et al., 2005; KIM et al., 2009). Diversos polimorfismos têm sido relacionados com a intensidade da resposta do hospedeiro ao biofilme, uma grande quantidade de genes de citocinas que foram alvo de estudos anteriores (*IL1*, *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *IL18*, Fator de Necrose Tumoral tipo Alfa - *TNFα*), foram selecionados para o presente estudo somente genes com maior frequência de estudos encontrados na literatura abordando DP em outras populações. Este estudo investigou a distribuição de polimorfismos de citocinas inflamatórias (*IL1*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, e Fator de Necrose Tumoral tipo Alfa – *TNFα*) em pacientes com quadro de doenças do periodonto/ peri-implante. Os genes selecionados para este estudo tiveram base na literatura, em que se verifica a associação dessas variantes com a DP em outros países com populações homogêneas como Ásia, Índia e Europa. Entretanto, poucos estudos foram vistos em uma população miscigenada como a brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença periodontal/ peri-implantar

As doenças do periodonto/ peri-implante são de natureza inflamatória multifatorial, resultado da interação entre patógenos e a resposta imune do hospedeiro (CHATZOPOULOS et al., 2018). Assim, podem apresentar ação destrutiva, com característica inflamatória estimulada por bactérias presentes nos tecidos de sustentação dos dentes (Figura 1), o que pode levar à perda dentária devido à progressão da reabsorção do osso alveolar e destruição das fibras conjuntivas (TE VELDE et al., 2016). Nos implantes, a doença inflamatória dos tecidos peri-implantares pode acometer somente os tecidos marginais, quando há presença de mucosite peri-implantar, ou pode induzir à perda do osso alveolar ao redor dos implantes, sendo chamada de peri-implantite (Figura 2) (BARTOLD & VAN DYKE, 2013).

Figura 1- Desenho esquemático das características periodontais.



Fonte: Adaptado de <http://www.arcodontologia.com.br/tratamento-periodontal>.

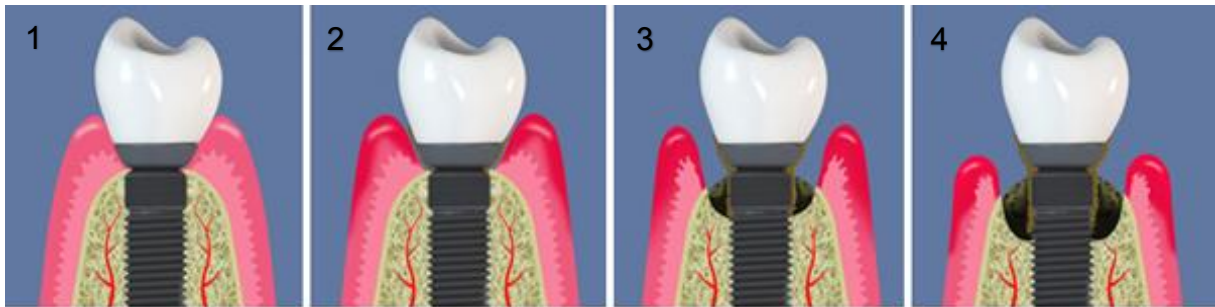
Acessado em 01 de agosto de 2018

1) Periodonto saudável; 2) Gengivite; 3) Periodontite; 4) Periodontite avançada.

O papel dos microrganismos como fator etiológico nas doenças periodontais ganhou novas perspectivas nas últimas décadas (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Principalmente na compreensão de que há um grupo bacteriano, o chamado “complexo vermelho”, formado pelas espécies: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, que são agentes etiológicos da periodontite. Dependendo dos níveis e das interações com o hospedeiro, pode indicar alto risco de perda de estrutura periodontal, pois esses microrganismos estão relacionados com o

aumento de profundidade de bolsa e da presença de sangramento à sondagem (TELES et al., 2013; COCHRAN, 2008; DAMGAARD et al., 2017).

Figura 2- Desenho esquemático das características peri-implantares.



Fonte: Adaptado de <https://lohcus.com.br/implantes-que-geram-complicacoes/peri-implantite/>. Acessado em 01 de agosto de 2018

1) Peri-implante saudável; 2) Mucosite peri-implantar; 3) Peri-implantite; 4) Peri-implantite avançada.

A microbiota periodontal é considerada o fator essencial, mas não determinante da DP, pois a interação patógeno-hospedeiro pode ser muito diversa e considerada única (TELES et al., 2013). Além disto, há que se considerar a quantidade e a qualidade das bactérias dentro do biofilme (TELES et al., 2013). Por outro lado, é entendido que a resposta inflamatória envolvida na patogênese da DP é modulada por vários fatores pertinentes ao hospedeiro, tanto intrínsecos (por exemplo, genética) quanto induzidos (por exemplo, tabagismo) (COCHRAN, 2008; KORNMAN et al., 1997a; TELES et al., 2013). Assim, a destruição associada à DP é o resultado da ativação do sistema imuno-inflamatório do hospedeiro em resposta ao estímulo bacteriano (TELES et al., 2013).

As espécies bacterianas patogênicas presentes no biofilme dentário têm diferentes fatores de virulência, que permitem colonizar a área subgengival e induzir dano ao hospedeiro (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). A presença destas bactérias leva à produção de citocinas e outros mediadores químicos pró-inflamatórios nos tecidos periodontais, gerando uma resposta inflamatória que pode ser destrutiva,

como na periodontite e peri-implantite (KORNMAN & PAGE, 1997; QUIRYNEN et al., 2002; QUIRYNEN et al., 2006).

Em termos de colonização do espaço peri-implantar, tem-se demonstrado que há uma semelhança no perfil microbiano com a doença do periodonto, contribuindo assim como fator etiológico (QUIRYNEN et al., 2002; QUIRYNEN et al., 2006). Isto é especialmente preocupante quando implantes dentários são instalados em indivíduos que têm histórico de perda dentária devido à DP ou indivíduos com higiene bucal inadequada. Estes indivíduos podem apresentar grandes chances de desenvolverem peri-implantite (ZHENG et al., 2015; ELEMEK et al., 2014)

Do ponto de vista microbiológico, não existem diferenças significativas entre os perfis microbianos subgengivais ao redor de implantes e de dentes, o que indica que, ao longo do tempo, a microbiota peri-implantar apresenta uma tendência a se igualar aos perfis encontrados em dentes (RENVERT et al., 2007).

2.1.2 Fatores de risco para doença periodontal/ peri-implantar

O biofilme dentário abrange uma ampla diversidade de espécie bacterianas. No entanto, as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são consideradas patógenos periodontais clássicos e podem ser um fator de risco para a destruição periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

Além do risco microbiano, podem ser subdivididos em fatores de risco modificáveis, como tabagismo, falta de higiene bucal, diabetes e gravidez e fatores de risco não modificáveis, como idade e hereditariedade, incluindo doenças genéticas (BERGSTRÖM, 2004). O tabagismo está entre os principais fatores para o desenvolvimento de DP/ peri-implantar destrutiva. Indivíduos que tem o hábito de fumar pode aumentar de 5 a 20 vezes o risco de doenças periodontais, com uma razão de chances (OR) de 5,4 entre o tabagismo e a periodontite. (KINANE et al., 2006; NOCITI et al., 2014; BERGSTRÖM, 2004). Quando comparados a indivíduos que nunca fumaram, os fumantes exibem pior condição periodontal e apresentam maior índice de perda dentária (HELAL et al., 2019). Além disto, observa-se sinais de inflamação tecidual mais ativa em fumantes quando comparada a não fumantes, que é devido ao aumento da vasoconstrição e aumento da queratinização do tecido

gingival nos fumantes (KINANE et al., 2006). O tabagismo possui associação com níveis elevados de perda óssea, bolsas periodontais profundas e a perda dentária, quando comparado a indivíduos não fumantes. Além do aumento da gravidade das doenças periodontais, o tabagismo também está associado a uma diminuição significativa na eficácia dos tratamentos (HILGERS et al., 2004; BROTHWELL, 2001).

Com relação às desordens metabólicas, o diabetes mellitus também é um dos principais contribuintes para as doenças periodontais, atualmente, a doença sistêmica mais pesquisada e comprovada como fator de predisposição à periodontite. Demonstra-se que os níveis de recorrência e a gravidade da periodontite são muito maiores em indivíduos diagnosticados com diabetes mellitus e, especificamente, em pacientes que não possui a doença controlada (WU et al., 2015). Em contrapartida, a periodontite crônica tem uma contribuição negativa em pacientes portadores de diabetes, pois ela contribui para um aumento da carga inflamatória e aumento da resistência à insulina (LALLA & PAPAPANOU, 2011). O diabetes está associado a determinados processos patológicos acentuam a ruptura periodontal, prejudicando a cicatrização. Pacientes portadores de diabetes mellitus possuem um quadro de doença periodontal mais grave e se correlaciona a um maior risco de mortalidade em comparação com pacientes com a ausência da doença ou leve (NAZIR, 2017; DOUGLASS, 2006).

A gravidez está associada a alteração nos níveis hormonais, que demonstram promover uma resposta inflamatória ligada à gengivite e periodontite. Embora não seja claramente entendido, os hormônios maternos se mostraram correlacionados com os níveis de *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno essencial na progressão da DP. Demonstrou-se que o hipoestrogenismo e o hiperestrogenismo contribuem para a gengivite (DAALDEROP et al., 2018; UWITONZE et al., 2018; CARRILLO et al., 2010; WU et al., 2015).

A idade é um fator de risco não modificável para DP muito discutido na literatura. Demonstrou-se que indivíduos mais velhos têm uma resposta inflamatória mais grave à deposição de placas, com a resposta contendo um número maior de células inflamatórias, fato devido ao fenômeno de imunossenescência (PERSSON, 2018). Essa agregação de células inflamatórias faz com que os coloca os idosos tenham maior risco de sofrer destruição do periodonto. Além disso, a pesquisa

demonstrou aumento da perda de inserção clínica (CAL) em indivíduos com idades entre 60 e 90 anos, em comparação com aqueles com menos de 50 anos (NAZIR, 2017; GRODSTEIN et al., 1996; RHEU et al., 2011.)

Assim, as predisposições genéticas para o início e, também, para o avanço da periodontite vêm sendo investigadas (BORRELL & PAPAPANOU, 2005), com estimativas de herança genéticas de 50% (MICHALOWICZ et al., 2000). No entanto, existem alguns estudos de associação genômica que até hoje não obtiveram êxito em identificar de maneira consistente polimorfismos em nucleotídeo único (SNP) entre as populações para as doenças periodontais (SCHAEFER et al., 2010; SANDERS et al., 2017). Diferente das doenças mendelianas, em que o fenótipo patológico é decorrente de uma anormalidade que afeta apenas um gene, a predisposição genética à periodontite crônica é, possivelmente, determinada por centenas de genes. Por sua vez, o fenótipo clínico é estabelecido pela interação entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos (KORNMAN et al., 1997a).

2.1.3 A genética da doença periodontal/ peri-implantar

As variações em determinados locais dentro do genoma são chamadas de polimorfismos genéticos, conhecidos como SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) (YOSHIE et al., 2007). Essas variações podem ou não modificar a proteína a ser codificada e/ ou sua expressão e com isso podem levar a alterações na resposta imune (KINANE et al., 2005), por outro lado, variações genéticas também pode exercer papel preventivo contra determinadas doenças (CHATZOPOULOS et al., 2018). Assim, grande parte dos estudos genéticos em periodontia são voltados aos SNPs relacionados ao metabolismo ou imunidade (YOSHIE et al., 2007).

A resposta imune apresentada pelo hospedeiro no combate de uma infecção é regulada por inúmeros genes. Desta forma, é a variação dos genes as responsáveis pela regulação da atividade do sistema imunológico que determina o grau e a predisposição à DP. Isto se dá porque determinadas alterações no código genético podem acabar resultando em mudanças na funcionalidade ou na liberação das proteínas, causando uma resposta imune desregulada que pode caracterizar um perfil hiper inflamatório (KINANE et al., 2005).

A DP é uma doença virulenta que pode progredir rapidamente, principalmente em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com imunodeficiência humana. (BABAY et al., 2019; TODESCAN et al., 2013), mas possuem a capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória desregulada ou mesmo exacerbada, o que acarreta destruição da matriz tecidual em resposta aos microrganismos patogênicos (BABAY et al., 2019; PAGE & KORNMAN, 1997).

No intuito de compreender mais amplamente os mecanismos da DP relacionados à patogênese, a presença de polimorfismos no DNA e a susceptibilidade à doença, esta ligação tem sido muito estudada na periodontia (CASADO et al., 2013; CHATZOPOULOS et al., 2018; CHATZOPOULOS et al., 2017; WU et al., 2013;). Estes estudos exploram o risco de desenvolvimento de DP destrutiva ou sua chance de progressão na tentativa de serem determinados biomarcadores genéticos para a DP. Dentre estes estudos, podemos citar a identificação dos polimorfismos no gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e sua associação com o risco aumentado para o desenvolvimento de periodontite crônica e periodontite agressiva em asiáticos e caucasianos (DING et al., 2014).

Assim, a importância dos biomarcadores (definidor da presença ou gravidade de uma doença) em periodontite pode ser exemplificada com os estudos direcionados aos SNPs do DNA e a sua capacidade de alterar a expressão de um gene associado com a resposta do organismo ao crescimento bacteriano (LINDROTH & PARK, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, quase todas as mensurações que reflitam a interação entre o sistema biológico e uma ameaça potencial pode ser um biomarcador, incluindo agentes químicos, físicos ou biológicos (WHO, 1993). Quando descoberto, e devidamente validado, proporciona um alto valor como um sinalizador prognóstico ou diagnóstico para a manifestação da doença, progressão ou ambos (STRIMBU et al., 2010).

2.1.4 Biomarcadores moleculares na periodontia

Apesar da DP ser biofilme-dependentes em sua essência, a agressividade destas doenças pode ser modulada pelo perfil genético de cada indivíduo. Assim, as técnicas moleculares para a identificação de biomarcadores podem auxiliar na predição do desenvolvimento da doença ou na predição de doença já existente

(CHAMPAGNE et al., 2003; GRANT, 2011). O fluido gengival e a saliva têm sido utilizados como fonte de material para estes estudos moleculares (DE SOUZA & COLOMBO, 2006; SILVA-BOGHOSSIAN et al., 2013). A saliva é um fluido de fácil acesso e sua coleta ocorre de maneira não invasiva (RAMSEIER et al., 2009). Além de conter material genético humano e bacteriano, é rica em compostos orgânicos e químicos (COSTA et al., 2010b; RAMSEIER et al., 2009; DE SOUZA & COLOMBO, 2006).

Um aspecto extremamente relevante a ser apontado é que o diagnóstico das doenças periodontais e peri-implantares somente é possível após o estabelecimento do quadro inflamatório ao redor dos dentes ou implantes dentários. Portanto, através do estudo de polimorfismos genéticos de citocinas pró-inflamatórias seria possível a identificação de biomarcadores para suscetibilidade a estas doenças. Desta forma, seria viável determinar quais indivíduos seriam mais suscetíveis a vir a desenvolver estas patologias no futuro e atuar no sentido da prevenção, permitindo a redução de custos com o tratamento, além da redução da morbidade nos indivíduos suscetíveis (CASADO et al., 2013; CHATZOPOULOS et al., 2018; CULLINAN et al., 2008; Graves & Cochran, 2003).

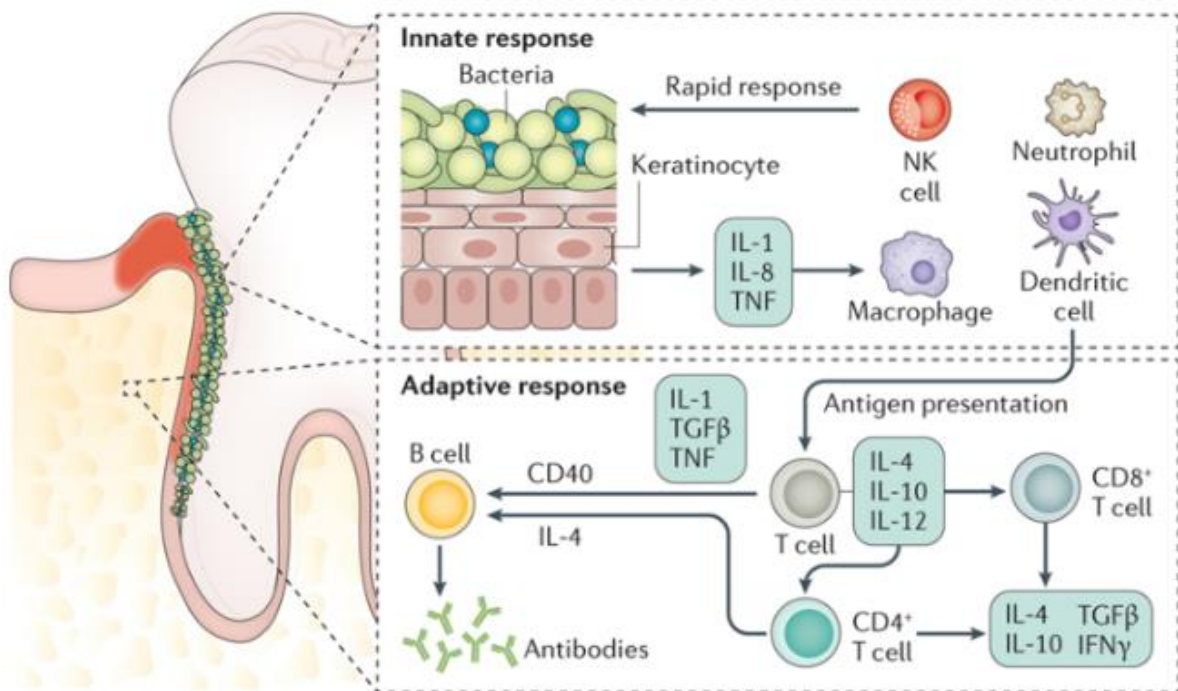
2.2 Processo inflamatório da doença periodontal/ peri-implantar

Além de suas implicações locais, a DP/peri-implantar, como outras infecções crônicas, pode contribuir para uma carga inflamatória sistêmica de baixo grau. Esta carga inflamatória está relacionada com a liberação de fatores bacterianos e de virulência e/ ou mediadores inflamatórios dos tecidos periodontais na corrente sanguínea. Por sua vez, esses fatores podem alterar níveis circulantes de citocinas e aumentar o risco de doenças sistêmicas, como doença cardiovascular, resistência à insulina e complicações relacionadas ao diabetes (LOOS et al., 2000; CHEN et al., 2015).

A resposta contínua do hospedeiro devido ao estímulo bacteriano interrompe o mecanismo homeostático e resulta no recrutamento de neutrófilos, macrófagos e na liberação de mediadores inflamatórios como: *IL -4*, *IL- 10*, *IL-11*, *IL-1*, *IL-6*, *TNF- α* , metaloproteinases de matriz (*MMPs*), metabólitos do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio, bem como liberação de mediadores para reabsorção óssea

osteoclástica (Figura 3). Estas citocinas são detectadas tanto nos tecidos periodontais quanto no fluido gengival de pacientes com periodontite. A atividade catabólica para estas citocinas são executadas por inibidores endógenos, que incluem o receptor de *IL-1* e antagonistas de *TNF* (Graves & Cochran, 2003).

Figura 3- Resposta imune do hospedeiro na periodontite crônica. Interação patogênica que ocorre no tecido gengival.



Fonte: Adaptado de Kinane et al. (2017)

Cascata de eventos que ocorrem diante da presença do biofilme sub gengival, onde ocorre a resposta imediata da nossa primeira linha de defesa que são os macrófagos que recrutam outras células de defesa como os neutrófilos, células dendríticas e ativam citocinas que atuam como mediadoras da resposta imune

2.3 Genes candidatos

As doenças complexas são resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais. Vários genes têm um determinado papel no desenvolvimento da doença, esses genes são considerados genes de suscetibilidade (RISCH et al., 2000). Estima-se uma média de mais de 20 variantes de genes que estão relacionados à suscetibilidade à periodontite, variando de acordo com o grau da doença e com a etnia (LAINE et al., 2000).

2.3.1 Citocinas

As citocinas são proteínas biologicamente ativas, secretadas em cascata sequencial durante processos infecciosos e inflamatórios. Essas proteínas desempenham um papel importante na comunicação entre as células. A superfamília de citocinas inclui interleucinas (ILs), quimiocinas, fatores estimuladores de colônia, interferons (IFNs), fator de crescimento transformador e TNF. Diferentes grupos de citocinas são produzidos localmente nos tecidos do periodonto, e desequilíbrios nessas moléculas estão envolvidos na patogênese das doenças periodontais (DAMGAARD et al., 2017; DING et al., 2014).

Vários polimorfismos em genes de citocinas foram estudados como indicadores para predisposição a danos periodontais, evidenciando o papel da variabilidade individual na patogênese destas doenças (LI et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

2.3.1.1 Interleucina-1

O *IL-1* é uma citocina pró-inflamatória que possui uma ampla gama de atividades biológicas e atua diretamente na regulação de vários genes que são expressos durante o processo inflamatório (DINARELLO, 1996). Identificou-se que quando há uma deficiência de *IL-1* ocorre uma resposta inflamatória atenuada, trazendo maior suscetibilidade a infecções (LABOW et al., 1997). Com isso, demonstrou-se que, para proteger o hospedeiro da infecção, esta interleucina é de suma importância ao evitar a disseminação da infecção (GRAVES et al., 2000).

No periodonto, o *IL-1* é encontrada em níveis mais elevados quando há DP (GRAVES et al., 2003; KINANE et al., 1992). Apesar de divergências quanto à variante específica, há a possibilidade de polimorfismos do *IL-1* estarem relacionados à susceptibilidade à DP. Demonstrou-se que um polimorfismo na região promotora do *IL-1* ocasiona níveis de expressão mais altos desta interleucina em comparação com outras variantes (GRAVES et al., 2003). Outros autores demonstram que a identificação de polimorfismos no gene do *IL-1*, destacando o *IL1α* rs1800587 C/T, *IL1α* rs17561 G/T e *IL1β* rs1143634 C/T interfere diretamente na gravidade da DP (KARIMBUX et al., 2012) e da peri-implantite (LIAO et al., 2014). Além disto, pode interferir no processo de osseointegração dos implantes (SHIMPUKU et al., 2003; COSYN et al., 2014).

2.3.1.2 Interleucina-6

O *IL-6* é uma citocina pró-inflamatória, secretada pelas células do sistema imunológico, do tecido adiposo e dos músculos, sendo responsável pela regulação da reatividade imunológica e pela hemopoiese (RIDKER et al., 2000). Essa interleucina possui uma grande importância no processo inflamatório e tem sido frequentemente associada com a perda de inserção e destruição tecidual periodontal por seu efeito na diferenciação de osteoclastos (MCCAULEY & NOHUTCU, 2002; MOREIRA et al., 2007a; HUGHES et al., 2006; CHATZOPOULOS et al., 2018).

Evidências já mostraram que há presença aumentada de *IL-6* em células endoteliais, fibroblastos e macrófagos de indivíduos diagnosticados com periodontite (TAKAHASHI et al., 1994). O aumento do nível da produção do *IL-6* foi detectada após a ação de bactérias periodontopatogênicas, isto mostra que possivelmente há uma contribuição para o desenvolvimento de uma lesão inflamatória crônica, culminando na perda do ligamento periodontal e do osso alveolar (NIBALI et al., 2009; BELIBASAKIS et al., 2005; PATIL et al., 2006; ROGERS et al., 2007). Esse aumento nos níveis locais de *IL-6* também está relacionado com a presença de gengivite (BECERIK et al., 2010; JOHANNSEN et al., 2010).

A ação do *IL-6* acontece através da degradação no tecido conjuntivo e no osso, esse evento ocorre mediado por MMPs e osteoclastos, ativação de células T e aumento da cascata inflamatória, o que ocasiona danos aos tecidos (NIBALI et al., 2009).

2.3.1.3 Interleucina-8

O *IL-8* é um agente quimiotático responsável pela ativação dos neutrófilos em regiões onde há inflamação (BICKEL, 1993). Em estudos do *IL-8* no processo patológico periodontal, foram observados níveis significativamente maiores desta *IL* no fluido gengival de pacientes com DP, quando comparado com pacientes controles saudáveis (BICKEL, 1993).

Em outro estudo, foi visto a expressão gênica desta citocina no ligamento periodontal e nos fibroblastos gengivais (YAMAMOTO et al., 2006). Com isso, pode-se supor que seu papel na inflamação periodontal desencadeia reações que podem

resultar na destruição de tecidos periodontais (KIM et al., 2009). Com isso, sugere-se estudos de SNPs no rs4073 do gene de *IL-8*, pois o alelo A tem mostrado estar associado com maior produção de *IL-8* (HULL et al., 2000).

2.3.1.5 Fator de necrose tumoral-alfa

O TNF contribui tanto para processos fisiológicos como patológicos (CHU, 2013). Acredita-se que uma complexa rede de citocinas esteja envolvida na regulação da saúde do tecido periodontal. Neste contexto, o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, que exerce um papel importante na lesão tecidual periodontal e leva à reabsorção óssea (SCAPOLI et al., 2011; LAINE et al., 2013). Esta citocina desencadeia vários processos imunológicos e inflamatórios, atuando na ativação de células, na adesão de leucócitos polimorfonucleares às células endoteliais, na ativação de fagócitos e na expressão de molécula de adesão intercelular-1 (HOFFMANN et al., 2001).

Os patógenos bacterianos presentes na placa dentária estimulam a secreção de TNF- α , o que leva à diferenciação de osteoclastos para atuar na reabsorção óssea, além de causar a liberação de enzimas do tipo MMPs, que destroem a matriz extracelular do conjuntivo do tecido gengival e dá início à rápida progressão da doença (WEI et al., 2016). Análises genéticas demonstram grande número de SNP dentro do *locus* do *TNF- α* , que está relacionado à periodontite como os rs1799724, rs1800630 e rs1799964, rs1800629 (BRENNER et al., 1989; TAYLOR et al., 2004; WEI et al., 2016).

O gene *TNF- α* está localizado no braço curto (p) do cromossomo 6 na posição 21.3, codificando uma citocina pró-inflamatória multifuncional, que é secretada principalmente por macrófagos (COX et al., 1998). Estima-se que cerca de 50% das diferenças clínicas da DP resultam de polimorfismos que também podem causar uma mudança na expressão proteica (MICHALOWICZ et al., 2000). Esses polimorfismos também podem causar uma mudança na expressão proteica, resultando em possíveis desfechos clínicos desta doença, que determina a suscetibilidade à periodontite (MAJUMDER et al., 2018; LAINE et al., 2010).

Assim, a atividade do *IL-1* e do *TNF* deve ser regulada a fim de se evitar uma resposta inflamatória descontrolada e destruição excessiva dos tecidos. Isso é feito naturalmente pelas citocinas anti-inflamatórias, como *IL-10* e *IL-4*, ou antagonistas de citocinas. As citocinas anti-inflamatórias podem inibir a produção de *IL-1* e *TNF* (ESSNER et al., 1989, DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Antagonistas de citocinas como *IL-1ra* ou receptores de *TNF* solúveis podem inibir competitivamente o ligante de se ligar a seus receptores cognatos e prevenir a sinalização celular (DINARELLO, 1996; COLOTTA et al., 1993). A importância destes mediadores bloqueadores foi demonstrada experimentalmente. Quando os receptores solúveis para *IL-1* ou *TNF* são aplicados *in vivo*, vários processos patológicos são inibidos, incluindo artrite, choque séptico, inflamação dérmica e doença autoimune (WECKMANN & ALCOCER-VARELA, 1996; STEWART & MARSDEN, 1995; MULLARKEY et al., 1994).

Há grande interesse em investigar polimorfismos em genes candidatos para o desenvolvimento da DP (WANG & SADÉE, 2006). Vários estudos demonstraram que SNPs em genes de citocinas podem influenciar a suscetibilidade à doença e sua gravidade (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002; MOREIRA et al., 2007a; MOREIRA et al., 2007b; WAGNER et al., 2007).

Apesar da DP ser biofilme-dependente, é modulada por uma variedade de fatores, incluindo o perfil genético de cada indivíduo. Logo, há necessidade de estudos que auxiliem na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença. Isto se torna especialmente relevante quando se busca medidas de prevenção, evitando-se o estabelecimento de doença destrutiva. Além disto, pode-se, indiretamente, levar à prevenção de doenças e/ ou distúrbios sistêmicos, já que as DPs podem contribuir para o estabelecimento de uma variedade de doenças do metabolismo (OFFENBACHER & BECK, 2014; WILLIAMS & OFFENBACHER, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

A doença periodontal é complexa e multifatorial, com isso, o estudo das citocinas supracitadas podem contribuir fortemente para elucidação da etiopatogênese desta doença, contribuindo assim para uma possível prevenção e um possível diagnóstico de susceptibilidade, antes de que se estabeleça um quadro inflamatório no paciente, através da identificação de biomarcadores para doença periodontal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar a ocorrência de polimorfismos genéticos em mediadores inflamatórios em diferentes condições periodontais/ peri-implantares.

4.2 Objetivos específicos

- Recrutamento de pacientes
- Coleta de dados anamnésicos
- Coleta de dados clínicos
- Identificação de polimorfismos genéticos de interleucinas (*IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*) e de fator de necrose tumoral-alfa (*TNF- α*), de acordo com técnicas específicas para cada locus de estudo.
- Determinar e comparar as frequências genotípicas e alélicas entre os indivíduos com periodonto saudável, com gengivite/ mucosite peri-implantar e com periodontite/ peri-implantite.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 População de estudo

A população de estudo foi constituída por uma amostra de pacientes da Policlínica Odontológica do Curso de Odontologia da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), que aceitaram o convite de participação voluntária. Os pacientes selecionados foram informados sobre os detalhes do projeto. Mediante os recursos físicos e humanos disponíveis para este estudo, ao longo de um ano foram incluídos 111 pacientes divididos em 3 grupos: 1. indivíduos com periodonto saudável (Saúde periodontal; n = 36); 2. indivíduos com DP não destrutiva (Gengivite/ Mucosite; n = 40); e 3. indivíduos com DP destrutiva (Periodontite/ Peri-implantite; n = 35). Os pacientes que participaram do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), explicando a natureza do estudo (Anexo 1). Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio, sendo aprovado com parecer de número 2.235.756 (Anexo 2).

Critérios de inclusão: Para participar do estudo, os indivíduos deveriam ser adultos (>18 anos), ter pelo menos 14 dentes e/ ou implante(s) dentário(s) e ter no mínimo 3 anos de implantação (no caso de pacientes com implante).

Critérios de exclusão: Indivíduos com as seguintes condições não foram incluídos no estudo: periodontite agressiva; doenças conhecidas do sistema imunológico (ex.: HIV-positivo); diabetes; gravidez ou amamentação; necessitar de quimioprofilaxia para o atendimento odontológico; ser fumante; ter recebido tratamento periodontal no último ano.

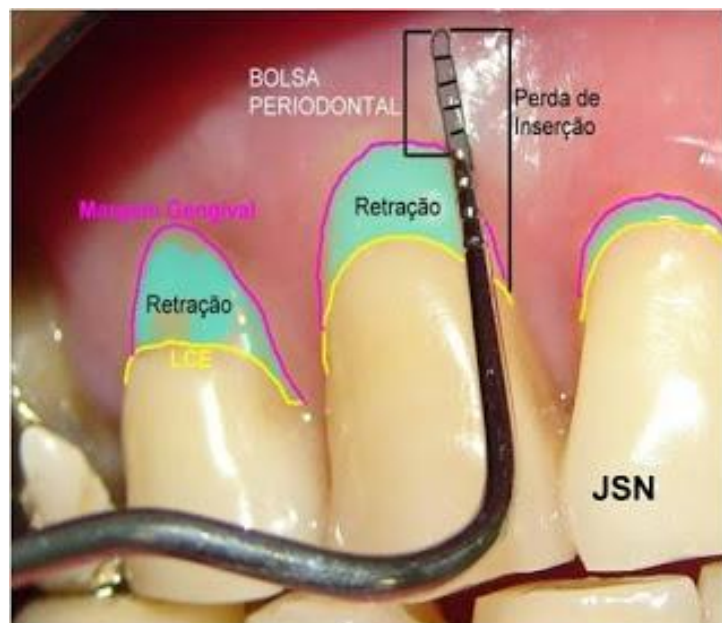
5.2 Dados anamnésicos

Foram registrados em questionário anamnésico o gênero, o nível de escolaridade, a ocupação, a raça, a renda familiar, dados de saúde geral e odontológica.

5.3 Avaliação Clínica

Os exames clínicos foram realizados por um examinador calibrado, e incluíram registros dicotomizados da presença de biofilme dental supragengival, do sangramento à sondagem e/ ou supuração à sondagem e mensuração da profundidade de sondagem (PS) e do nível clínico de inserção (NCI) em mm (figura 4). O exame clínico foi iniciado pelo registro de presença de BD, que é realizado através da visualização das superfícies dentárias/ implantares após secas com jato de ar em campo sob isolamento relativo. A seguir, foi realizada a sondagem periodontal/ peri- implantar em seis sítios por elemento/ implante dentário com sonda periodontal milimetrada da Carolina do Norte (Hu-Friedy; Chicago), sendo os sítios: ângulo disto- vestibular, face vestibular, ângulo méso-vestibular, ângulo méso-palatino ou méso-lingual, face palatina ou lingual e ângulo disto- palatino ou disto-lingual. Durante a sondagem periodontal foram registrados a PS para dentes e implantes e o NCI simultaneamente para os dentes. Nos implantes, a PS foi registrada e definida como a profundidade de penetração da sonda a partir da base do sulco do implante ao componente protético. Além disto, PS > 5 mm em implantes indicava a necessidade de exame radiográfico intraoral. Com base no exame clínico, os indivíduos foram diagnosticados para as condições periodontais/ peri-implantares citadas acima. Os terceiros molares foram excluídos da avaliação clínica. Os indivíduos diagnosticados como doentes foram encaminhados para tratamento na Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da UNIGRANRIO.

Figura 4- Avaliação clínica da medição dos sulcos.



5.4 Coleta da saliva

Durante a coleta de saliva os pacientes foram orientados a interromper a ingestão de líquidos ou alimentos uma hora antes do procedimento. No momento da coleta os pacientes foram solicitados a bochechar com 10 mL de soro fisiológico estéril por 1 min e, em seguida, cuspir em copo descartável estéril. As amostras de saliva foram transportadas em gelo para processamento. Em seguida, as amostras de saliva foram submetidas à extração de DNA genômico através de um kit, segundo instruções do fabricante (MasterPure™ DNA Purification Kit, Sinapse Biotecnologia Ltda).

5.4.1 Extração do DNA Genômico

A extração de DNA das amostras de saliva foi realizada pelo kit comercial MasterPure™ DNA Purification Kit, Sinapse Biotecnologia Ltda, segundo as recomendações do fabricante. Foi diluído 1 µL de Proteinase K em 150 µL de 2x T e C Lysis Solution (para cada amostra); em seguida, foram adicionados 150 µL de amostra ao tubo com Proteinase K e 2x T e C Lysis Solution; após, houve incubação a 65°C por 15 min e agitação com vortex a cada 5 min; as amostras foram resfriadas a 37° C e adicionado às mesmas 1 µL de RNase (5 µg/ µL); em seguida, nova incubação a 37°C por 5 min; após, as amostras eram colocadas em gelo por 3 a 5 min. A etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA, para tanto, foram adicionados 175 µL de MPC Protein Precipitation a 300 µL da amostra anteriormente lisada. Após, misturava-se no vortex por 10 s; o debris era precipitado por centrifugação a 4° C por 10 min a $\geq 10.000 \times g$; o sobrenadante era transferido para um microtubo limpo e o precipitado era descartado. A seguir, era adicionado 500 µL de isopropanol ao sobrenadante anteriormente recuperado e o tubo era invertido 30-40 vezes; o DNA era centrifugado a 4° C por 10 min; o isopropanol era dispensado com cuidado para não desalojar o pellet de DNA. Em seguida, lavava-se 2 vezes com etanol 70% com cuidado para não soltar o pellet e, para finalizar, o DNA era ressuspenso com 35 µL de tampão TE.

5.5 Análise genético-molecular de polimorfismos

As análises foram realizadas através de técnicas de Biologia Molecular, baseadas em Tempo Real (Real Time-PCR) e em PCR de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP).

Foram estudados os genes, *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* e *TNF- α* . Para o gene da *IL-1 β* : rs13032029; para *IL-6*: rs2069837; para *IL-8*: rs4073; e para *TNF- α* rs1799724 (CUI et al., 2012), rs1800630 (ASIFA et al., 2013) e rs1799964 (GHAZOUANI et al., 2009). As respectivas sequências estão apresentadas na Tabela 1 e os primers/ iniciadores para *TNF- α* apresentados na Tabela 2.

Tabela 1- Genes (*IL*) com sua respectiva variante (rs) e sondas empregadas no estudo.

Gene	SNP	Sonda
<i>IL-1β</i>	rs13032029	CCTCCTCTCCTATCCCACGCATCAA[C/T]CTTTCCTGTCTATTTGCAGTTCCTT
<i>IL-6</i>	rs2069837	TATCTACTGTGTGCCAGGCACTTTA[A/C/G]ATAAATATTGTGTCTAATCTTCAAA
<i>IL-8</i>	rs4073	TTATCTAGAAATAAAAAAGCATACA[A/T]TTGATAATTCACCAAATTGTGGAGC

Tabela 2- Gene (*TNF- α*) com sua respectiva variante primers/ iniciadores empregados no estudo.

Gene	SNP	Primer forward	Primer reverse	Referência
<i>TNF-α</i>	rs1799724	5'-CAGGGCTATGGAAGTCGAGTATG-3'	5'-CTCAGGGCCCCAGTGTGT-3'	Cui et al., 2012
<i>TNF-α</i>	rs1800630	5'-GGCTCTGAGGAATGGGTTAC-3'	5'-CTACATGGCCCTGTCTTCGTTACG-3'	Asifa et al, 2013
<i>TNF-α</i>	rs1799964	5'-TAT GTG ATG GAC TCACCA GGT-3'	5'-CCT CTA CAT GGCCCT GTC TT-3'	Ghazouani et al., 2009

5.5.1 PCR em tempo real

Para análise em Real Time-PCR, foram realizadas reações com o emprego de TaqMan Genotyping Master Mix® (2x), sonda TaqMan® (40x) específica para cada variante estudada, conforme exemplificado na Tabela 1, 10-30 ng de DNA genômico

e água estéril, conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Para este trabalho o protocolo estabelecido para todas as variantes (rs) estudadas consiste no uso de 5 µL de Master mix TaqMan®, 0,25 µL de sonda específica para cada variante, 2,75 µL de H₂O e 1 µL DNA em casa reação (Tabela 3). Para toda a reação foi incluído um controle negativo para garantir ausência de contaminação. A técnica de PCR em tempo real foi realizada no aparelho QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 3- Protocolo utilizado no PCR em tempo real.

Reagente	Volume
	1x
Master mix TaqMan®	5 µL
Sonda	0,25 µL
H ₂ O	2,75 µL
DNA	1,5 µL

A técnica da PCR em tempo real, assim como a convencional, compreende-se em 3 etapas: desnaturação, onde ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA; Anelamento, quando primers se ligam a fita de DNA que se pretende amplificar e serão responsáveis por identificar o trecho de interesse do DNA deverá ser copiado; e polimerização, quando depois de o ponto de partida estar identificado pelos primers, a Taq polimerase liga-se a fita sinalizada, complementando-a. Começa então a extensão do novo fragmento de DNA, formando novamente uma fita dupla de DNA. Na PCR em tempo real (qPCR), o resultado é visualizado imediatamente, não sendo necessário o uso da eletroforese para análise de resultados, isso, devido a adição de sondas fluorescentes às reações de PCR. A amplificação do DNA-alvo é monitorada durante o processo de qPCR. A medida que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente. Esse processo é feito em repetidos ciclos com objetivo de obter milhares de cópias da sequência molde de DNA. Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA, geram um sinal de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das fases, sendo representado graficamente (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5- Ciclagem padrão utilizada para o PCR em tempo real.

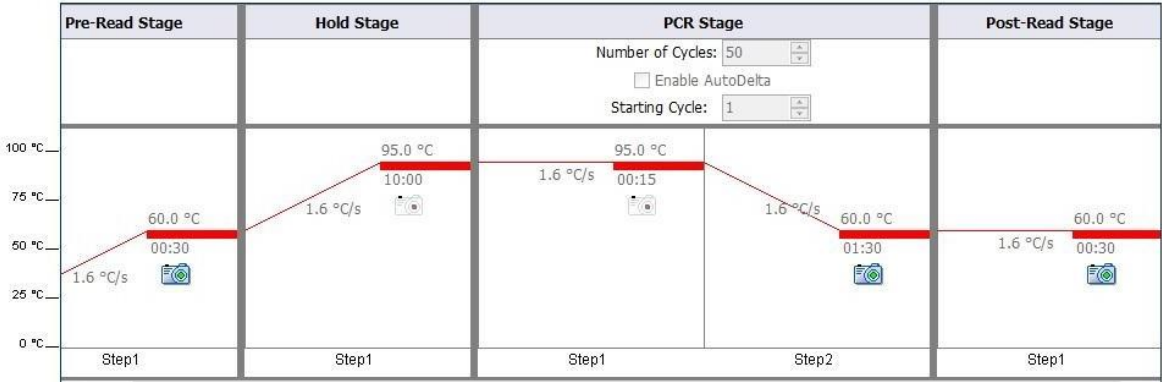


Figura 6- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do *IL-6* rs2069837 A/G que demonstra um resultado heterozigoto.

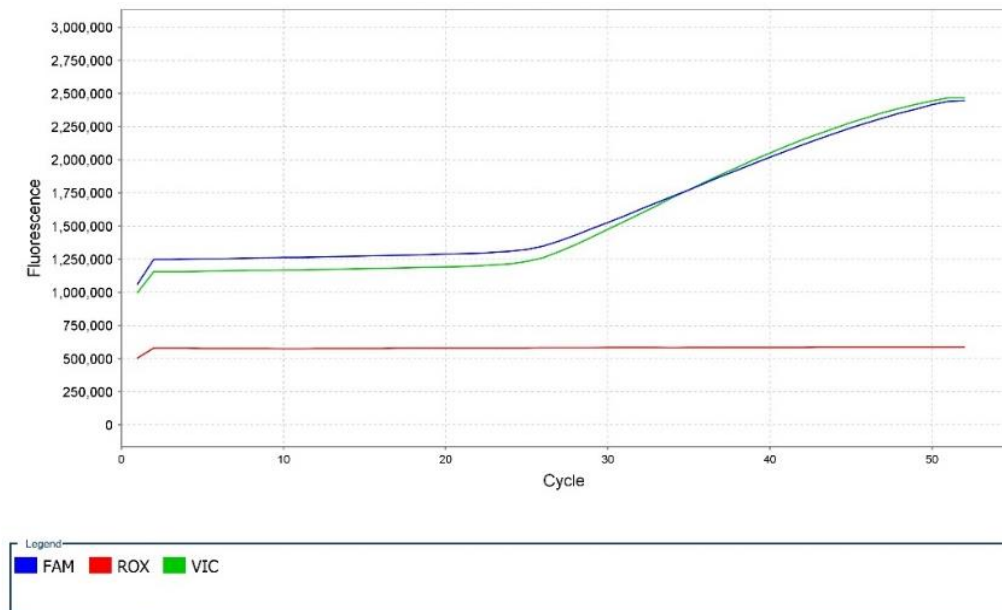


Figura 7- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do *IL-6* rs2069837 A/G que demonstra um resultado para homozigoto selvagem.

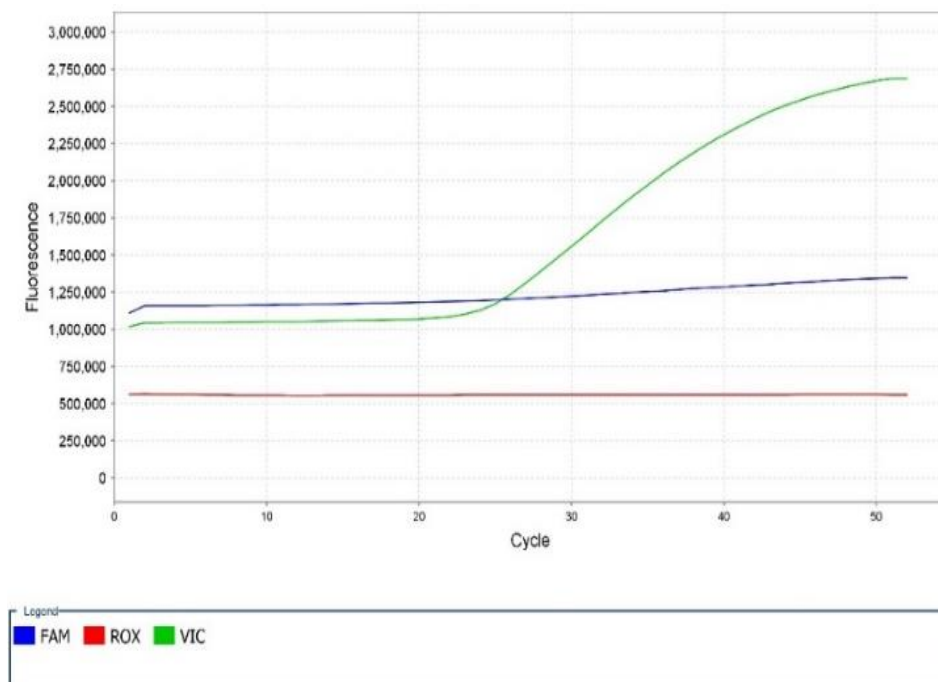
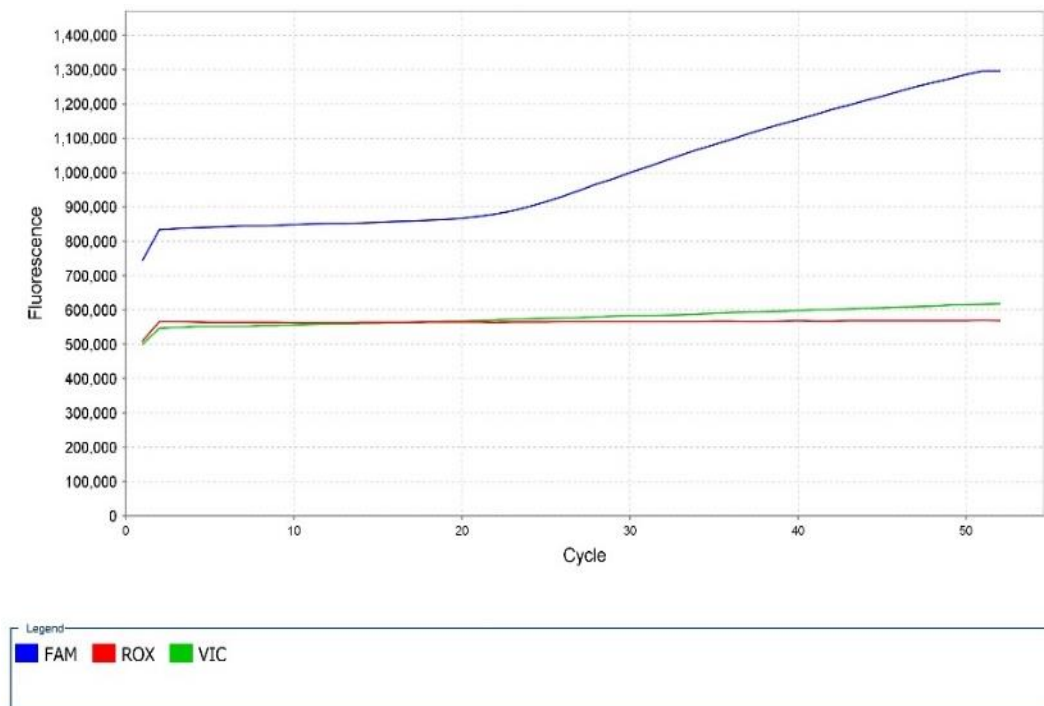
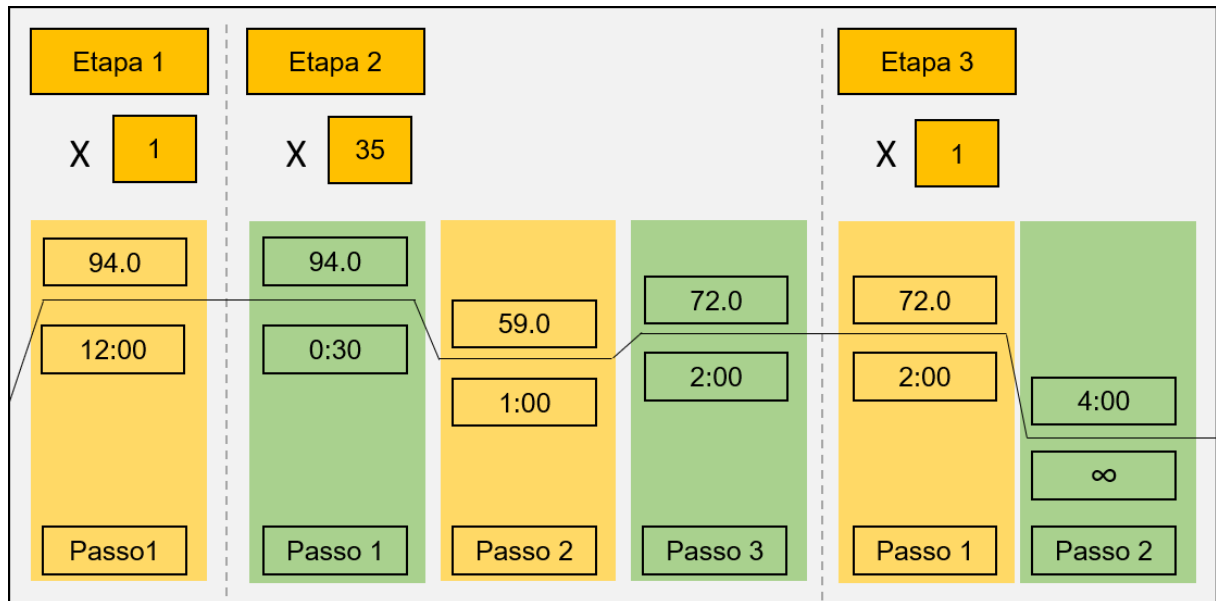
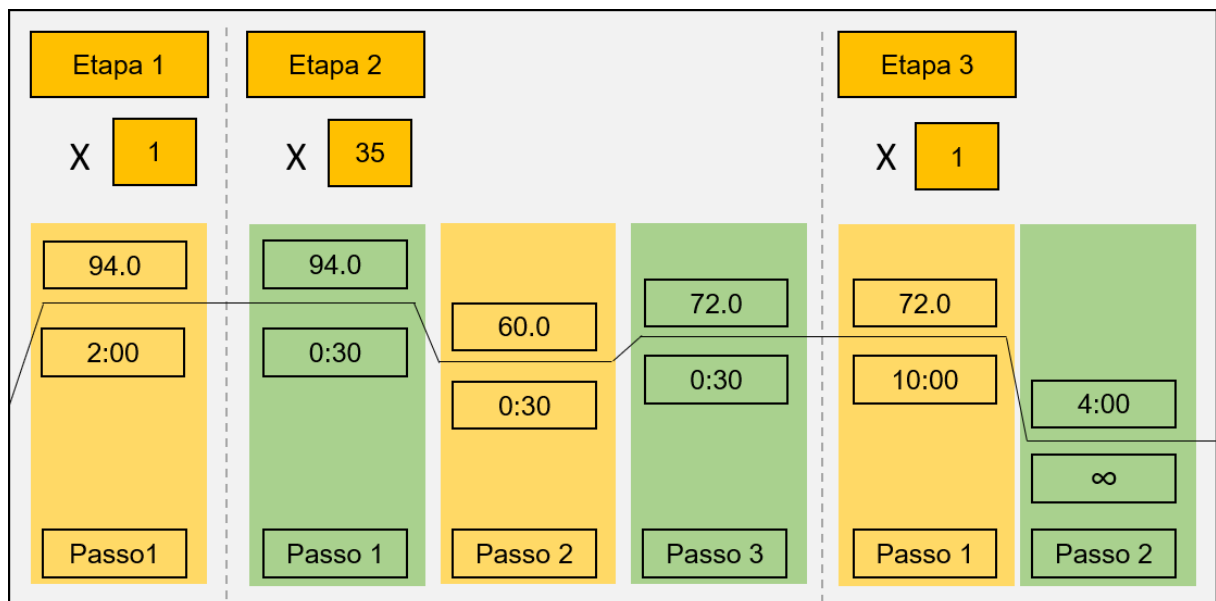


Figura 8- Imagem produzida a partir do PCR em Tempo Real do *IL-6* rs2069837 A/G que demonstra um resultado homozigoto mutado.



5.5.2 PCR - RFLP

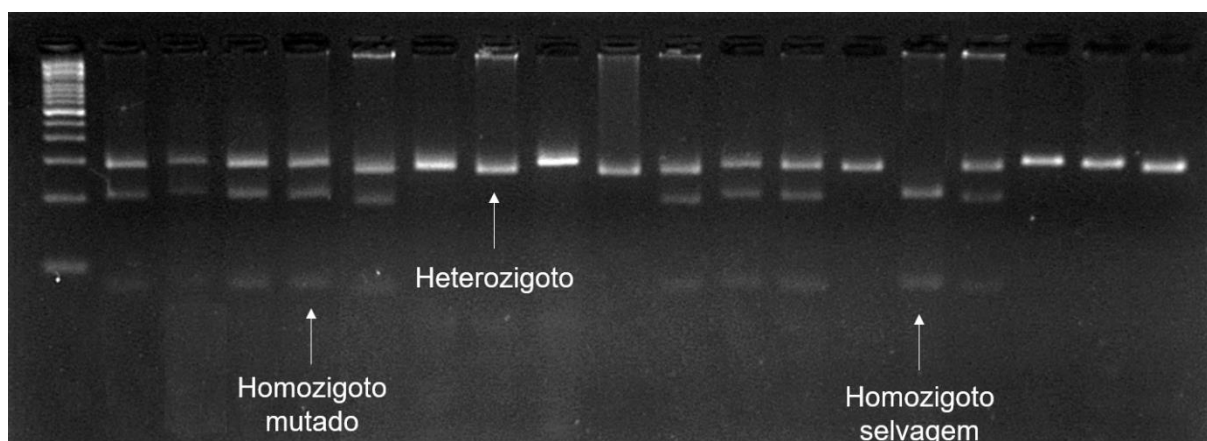
Para avaliação molecular do gene *TNF- α* , foram estudados os polimorfismos rs1799724 C/T, rs1800630 C/A e rs1799964 C/T, e utilizou-se os primers/ iniciadores descritos na Tabela 2. As amplificações das regiões foram realizadas em tubos de 0,2 mL em um volume total de 50 μ L de acordo com ASIFA et al., 2013. O mix de reação contendo 3 μ L de DNA genômico, 2,5 μ L de cada um dos primers (forward e reverse; 20 μ M), 5 μ L de tampão de PCR 10X (200 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 750 mM de Tris-HCl (pH 8,8), e Tween 20 a 0,1%), 4 μ L de MgCl_2 a 25mM, 1 μ L de dNTPs de 10 mM, e 0,5 μ L (5 U/ μ L) da enzima Taq DNA polimerase (Vivantis Technologies) em 31,5 μ L de água para PCR. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Therm - 1000/ Maxygene (Axygen®). A PCR foi realizada com as ciclagens apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 9- Ciclagem padrão para rs1799724.**Figura 10-** Ciclagem padrão para rs1800630 e rs1799964.

Os produtos da PCR foram analisados por um gel de agarose a 1% corado com GerRed™ (Biotium), corrido em uma eletroforese e visualizados em transluminador UV (Biometrix). Em seguida, foi feita a *Restriction Fragments Length Polymorphism* (RFLP) com a endonuclease de restrição BbsI (New England Biolabs) foi usada para a detecção de polimorfismo no gene *TNF-α* rs1799964 C/T; HincII (New England

Biolabs) para polimorfismo no gene *TNF-α* rs1799724 C/T; HpyCH4IV para polimorfismos no gene *TNF-α* rs1800630 C/A. A RFLP foi realizada em tubos de 0,5 mL em um volume total de 20 µL contendo 12 µL dos produtos amplificados, 2 µL de tampão G 10X (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM MgCl₂, 50 mM NaCl, e 0,1mg/mL BSA), 0,3 µL de enzima de restrição, e 5,7µL de água para PCR . Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 4%, corrido a 65v, corados com GerRed™ e visualizados em transluminador UV (Figura 10).

Figura 11- Gel de agarose *TNF-α* rs1799964



Gel de agarose 4% do gene *TNF-α* rs1799964 C/T para identificação dos genótipos com ladder de 100pb. Enzima BbsI, alelo C fragmentos 160 e 109 pb; alelo T fragmento 270 pb. CC homozigoto selvagem; TT heterozigoto; CT homozigoto mutado.

5.6 Fluxograma

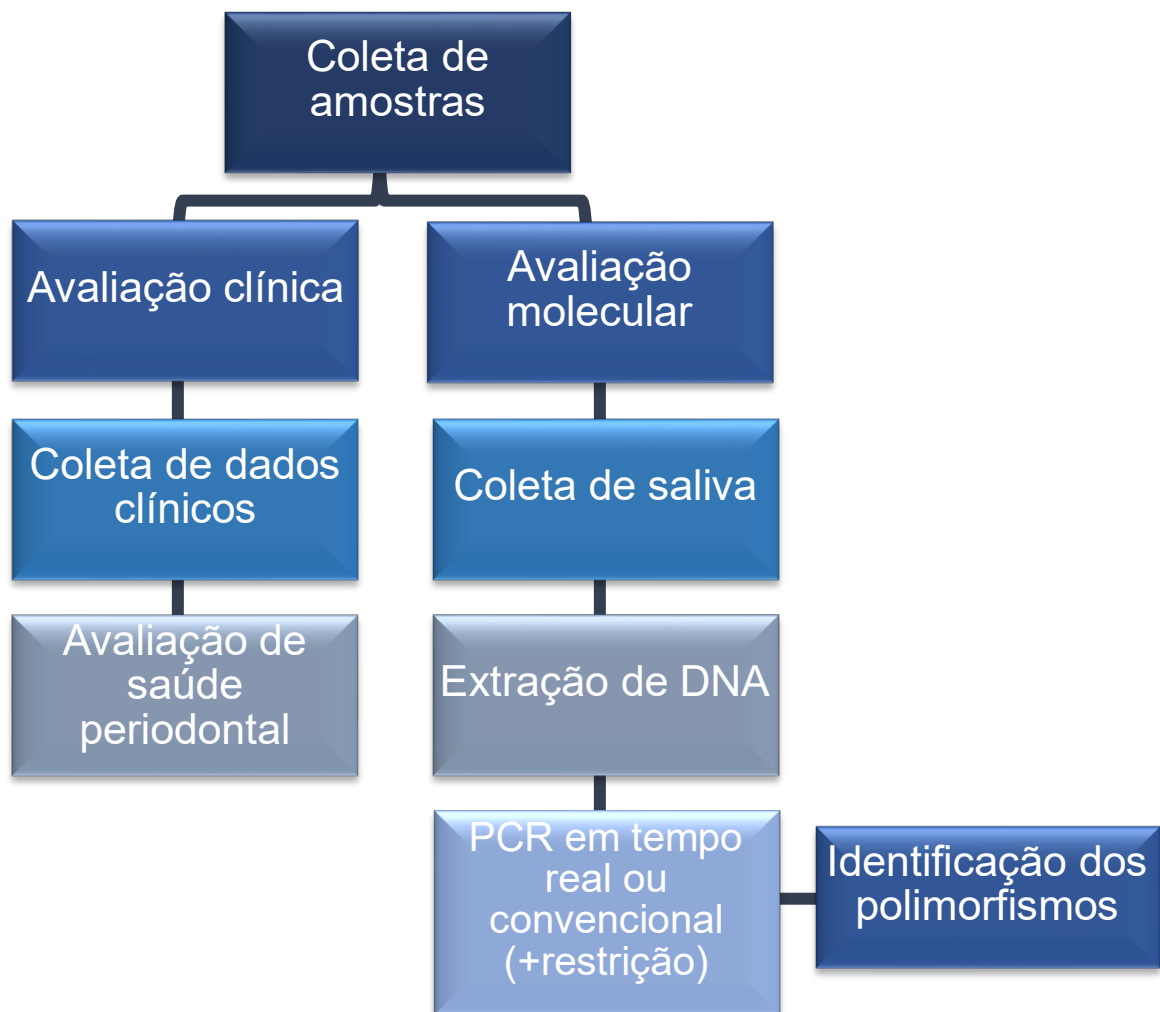
Para melhor compreensão das etapas metodológicas realizadas neste estudo, o esquema abaixo (Figura 11) exibe um resumo das etapas que foram desenvolvidas.

5.7 Análise estatística

Os dados clínicos e demográficos foram analisados pelo pacote estatístico IBM-SPSS (versão 22, IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Foi obtida a frequência de sítios

com sangramento e com biofilme dental, assim como a média da PS e do NCI de cada paciente, e posteriormente, para cada um dos grupos estudados. Foram também calculadas a média de idade e a frequência do sexo nos grupos estudados. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e sociodemográficos entre os grupos foram avaliadas pelos testes Kruskal- Wallis e Mann-Whitney. Os dados categóricos foram avaliados através do teste Qui-quadrado. Os polimorfismos estudados foram apresentados sob a forma de frequência de identificação na população estudada. Com o teste de Hardy-Weinberg foram verificadas a homogeneidade entre as amostras e diferenças alélicas significantes. Além disto, foi determinada a razão de chances (OR). O nível de significância utilizado foi de 5%.

Figura 12- Fluxograma com as etapas metodológicas.



6. RESULTADOS

6.1 Dados demográficos e clínicos

As características demográficas e clínicas estão apresentadas na Tabela 4. Pode-se observar que a idade média foi de $27 \pm 13,7$ anos no grupo Saúde, $26 \pm 9,2$ anos no grupo Gengivite/Mucosite e $49,8 \pm 15,3$ anos no grupo Periodontite/peri-implantite, com diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$; teste Kruskal-Wallis). Houve predomínio similar do sexo feminino nos 3 grupos ($p > 0,05$; teste do Qui-quadrado). Quanto aos dados clínicos, os grupos gengivite/mucosite e apresentaram significativamente piores resultados para biofilme dental (25,1% e 24,63% respectivamente), sangramento gengival 16,1% e 19,8% respectivamente), sangramento e sondagem (26,2% e 21,9% respectivamente), exceto para cálculo dental (10,6% e 20,1% respectivamente) e de supuração que obteve uma porcentagem significativamente maior no grupo de pacientes periodontite/peri-implantite (21,9%), que foram semelhantes entre os participantes.

Tabela 4- Dados demográficos e clínicos dos indivíduos estudados de acordo com o diagnóstico periodontal.

Variáveis	Saúde periodontal (n = 36)	Gengivite/ Mucosite (n = 40)	Periodontite/ peri-implantite (n = 35)	Valor de p*
Idade média (± desvio padrão)	27 (13,7)	26 (9,2)	49,8 (15,3)	<0,001
Gênero (% homens)	41,7	30	42,9	NS [†]
<i>Raça (%)</i>				
Branca	37,5	37,8	32,1	NS [†]
Preta	25	18,9	50	
Parda	37,5	43,2	17,9	
%cálculo dental (± desvio padrão)	8,6 (11,2)	10,2 (10,6)	11,6 (20,1)	NS
%biofilme dental (± desvio padrão)	16,9 (14,5)	29,5 (25,1)	23,1 (24,3)	0,043
%sangramento gengival (± desvio padrão)	3,8 (2,7)	26,2 (16,1)	26,1 (19,8)	<0,001
%sangramento à sondagem (± desvio padrão)	3,9 (2,7)	26,2 (16,2)	29,6 (21,9)	<0,001
%supuração (± desvio padrão)	0	0,3 (2,3)	5,6 (21,9)	NS
Média PS (± desvio padrão)	1,9 (0,3)	2,2 (0,4)	2,8 (0,9)	<0,001
Média NIC (± desvio padrão)	1,9 (0,1)	1,8 (0,5)	4,6 (2,3)	<0,001

*teste Kruskal-Wallis;†teste do Qui-quadrado; NS: não significante.

6.2 Análise genética

Com relação aos polimorfismos estudados, foram realizadas análises da distribuição alélica e genotípica para todos os polimorfismos descritos a seguir.

6.2 Interleucinas

6.2.1 IL-1 β rs13032029

Na análise genotípica e alélica em que pacientes com Periodontite/ Peri-implantite foram comparados ao grupo Saúde (Tabela 5), observou-se uma maior frequência do alelo C nos casos doentes. Além disto, foi observado que pacientes portadores do alelo C possuem uma chance 2 vezes maior de desenvolvimento da Periodontite/ Peri-implantite (OR = 2,24; IC 95%: 1,09-4,57).

Já na análise em que o grupo Periodontite/ Peri-implantite foi comparado à Gingivite/Mucosite (Tabela 6), foi detectada uma distribuição genotípica significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,05$). Além disto, houve indicação de chance quase 4 vezes maior de Periodontite/ Peri-implantite quando o indivíduo apresenta o genótipo selvagem CC (OR = 3,84; IC 95%: 1,5-9,9) comparado com os genótipos CT+TT. Na análise alélica, foi constatado que na presença do alelo C há chance maior de duas vezes de Periodontite/ Peri-implantite (OR = 2,45; IC 95%: 1,21-4,9).

Tabela 5- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs13032029 do gene *IL-1 β* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Saúde Periodontal	Total	<i>p</i> '	OR (95% IC)
		n (%)	n (%)			
<i>IL-1β rs13032029</i>	CC	20 (57,1)	13 (36,1)	33	> 0,05	-
	CT	14 (40,0)	17 (47,2)	31		
	TT	1 (2,9)	6 (16,7)	7		
	Total	35	36	71		
	<i>p</i> (H-W)	0,42	0,02			
	Alelos				<i>p</i> "	
	C	54 (77,2)	43 (59,7)	97	< 0,05	2,24 (1,09-4,57)
	T	16 (22,8)	29 (40,3)	45		
	Total	70	72	142		

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p*' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p*" é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 6- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs13032029 do gene *IL-1 β* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gingivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/	Gingivite/	Total	p'	OR (95% IC)
		Peri-Implantite n (%)	Mucosite n (%)			
<i>IL-1β</i> rs13032029	CC	20 (57,1)	10 (25)	30	> 0,05	-
	CT	14 (40)	26 (65)	40		
	TT	1 (2,9)	4 (10)	5		
	Total	35	40	75		
	p (H-W)	0,42	0,03			
	CC	20 (57,4)	10 (25)	30	< 0,05	3,84 (1,49-9,90)
	CT+TT	15 (42,8)	30 (75)	45		
	Total	35	40	75		
	Alelos				p''	
	C	54 (77,1)	46 (57,5)	100		
	T	16 (22,8)	34 (42,5)	50		
	Total	70	80	150		

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

6.2.2 IL-6 rs2069837

Na análise de polimorfismo do IL-6 (rs2069837), as distribuições genotípicas e alélicas não diferenciaram significativamente entre os grupos Periodontite/Peri-implantite comparado à Saúde periodontal (Tabela 7). Também não foram encontradas diferenças significantes quando se comparou o grupo Periodontite/ Peri-implantite com Gingivite/ Mucosite peri-implantar (Tabela 8).

Tabela 7- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs2069837 do gene *IL-6* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Saúde Periodontal	Total	<i>p'</i>
		n (%)	n (%)		
<i>IL6 - rs2069837</i>	AA	32 (91,4)	32 (88,9)	64	> 0,05
	AG	3 (8,6)	4 (11,1)	7	
	GG	0	0	0	
	Total	35	36	71	
	Alelos				<i>p''</i>
	A	67 (95,7)	68 (94,4)	135	> 0,05
	G	3 (4,3)	4 (5,6)	7	
	Total	70	72	142	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 8- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs2069837 do gene *IL-6* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Gengivite/ Mucosite	Total	<i>p'</i>
		n (%)	n (%)		
<i>IL6 - rs2069837</i>	AA	32 (91,4)	33 (82,5)	65	>0,05
	AG	3 (8,6)	6 (15,0)	9	
	GG	0	1 (2,5)	1	
	Total	35	40	75	
	Alelos				<i>p''</i>
	A	67 (95,7)	72 (90,0)	139	>0,05
	G	3 (4,3)	8 (10,0)	11	
	Total	70	80	150	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

6.2.3 IL-8 rs4073

Na análise do rs4073, quando os grupos Periodontite/ Peri-implantite e Saúde foram comparados, não foram observadas diferenças significativas nas análises genotípica e alélicas (Tabela 9). Entretanto, quando se comparou o grupo Periodontite/ Peri-implantite com Gingivite/ Mucosite, diferenças significativas foram encontradas na distribuição genotípica entre os grupos (Tabela 10). Além disto, foi observado que o genótipo selvagem AA leva a uma maior chance de periodontite (OR = 3,34; IC 95%: 1,03-10,76) em relação ao grupo Gingivite/ Mucosite.

Tabela 9- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs4073 do gene *IL-8* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SN	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite n (%)	Saúde Periodontal n (%)	Total	p'
IL-8 rs4073	AA	10 (28,6)	10 (27,8)	19	>0,05
	AT	11 (31,4)	15 (41,6)	26	
	TT	14 (40,0)	12 (33,3)	26	
	Total	35	36	71	
	p (H-W)	0,03	0,33		
	Alelos				p''
	A	31 (44,3)	33 (45,8)	64	>0,05
	T	39 (55,7)	39 (54,2)	78	
	Total	70	72	142	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 10- Análise da associação dos genótipos e alelos do polimorfismo rs4073 do gene *IL-8* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/	Gengivite/	Total	<i>p</i> '	OR (95% IC)
		Peri-Implantite n (%)	Mucosite n (%)			
<i>IL-8</i> rs4073	AA	10 (28,6)	4 (10,0)	14	> 0,05	-
	AT	11 (31,4)	18 (45,0)	29		
	TT	14 (40,0)	18 (45,0)	32		
	Total	35	40	75		
	<i>p</i> (H-W)	0,03	0,08			
	AA	10 (28,6)	4 (10,0)	14	<0,05	3,34 (1,03-10,76)
	AT+TT	25 (71,4)	36 (90,0)	61		
	Total	35	40	75		
	Alelos				<i>p</i>"	
	A	31 (44,3)	26 (32,5)	57		
	T	39 (55,7)	54 (67,5)	93		
	Total	70	80	150		

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p*' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p*" é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

6.3 Fator de necrose tumoral

6.3.1 TNF- α rs1799724

A variante rs1799724 não apresentou distribuição genotípica e alélicas diferentes entre os grupos Periodontite/Per-implantite e Saúde periodontal (Tabela 11) e entre Periodontite/ Per-implantite e Gengivite/Mucosite (Tabela 12).

Tabela 11- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799724 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Saúde Periodontal	Total	<i>p</i> '
		n (%)	n (%)		
<i>TNFα</i> rs1799724	CC	8 (22,2)	9 (24,3)	17	>0,05
	CT	25 (69,4)	26 (70,3)	51	
	TT	3 (8,3)	2 (5,4)	5	
	Total	36	37	73	
	<i>p</i> (H-W)	0,01	0,00		
	Alelos				<i>p</i>"
	C	41 (56,9)	44 (59,5)	85	>0,05
	T	31 (43,1)	30 (40,5)	61	
	Total	72	74	146	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p*' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p*" é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 12- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799724 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Gengivite/ Mucosite	Total	<i>p</i> '
		n (%)	n (%)		
<i>TNFα rs1799724</i>	CC	8 (22,2)	10 (21,7)	18	>0,05
	CT	25 (69,4)	32 (69,6)	57	
	TT	3 (8,3)	4 (8,7)	7	
	Total	36	46	82	
	<i>p</i> (H-W)	0,01	0,00		
	Alelos				<i>p</i>"
	C	41(56,9)	52 (56,5)	93	>0,05
	T	31 (43,1)	40 (43,5)	71	
	Total	72	92	164	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p*' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p*" é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

6.3.2 *TNF- α rs1799964*

As distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1799964 do gene *TNF- α* não foram significativamente diferentes entre os grupos com Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal (Tabela 13). Da mesma forma, na comparação do grupo Periodontite/ Peri-implantite com o grupo Gengivite/Mucosite, nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 14).

Tabela 13- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799964 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Saúde Periodontal		Total	<i>p'</i>
		Peri- implantite n (%)	n (%)		
<i>TNFα rs1799964</i>	CC	1 (2,7)	0	1	>0,05
	CT	22 (61,1)	19 (51,3)	41	
	TT	13 (36,1)	18 (48,7)	31	
	Total	36	37	73	
	<i>p</i> (H-W)	0,02	-		
	Alelos				<i>p''</i>
	C	24 (33,3)	19 (25,7)	43	>0,05
	T	48 (66,7)	55 (74,3)	103	
	Total	72	74	146	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 14- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799964 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gingivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SN P	Genótip o	Periodontite/ Gingivite/ Peri-implantite Mucosite		Total	<i>p'</i>
		n (%)	n (%)		
<i>TNFα rs1799964</i>	CC	1 (2,8)	0	1	>0,05
	CT	22 (61,1)	20 (43,5)	42	
	TT	13 (36,1)	26 (56,5)	39	
	Total	36	46	82	
	<i>p</i> (H-W)	0,02	-		
	Alelos				<i>p''</i>
	C	24 (33,3)	20 (21,7)	44	>0,05
	T	48 (66,7)	72 (78,3)	120	
	Total	72	92	164	

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

6.3.3 TNF- α rs1800630

Não foram observadas diferenças significativas nas distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1800630 na comparação entre os grupos Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal (Tabela 15). Na comparação entre os grupos Periodontite/ Peri-implantite e Gingivite/ Mucosite, também não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica. Entretanto, foi detectada uma diferença significativa na distribuição alélica entre estes dois grupos (Tabela 16), sendo demonstrado, ainda, que a presença do alelo C selvagem diminui a chance do indivíduo ser portador de Periodontite/ Peri-implantite (OR=0,40; IC 95%: 0,16-0,97).

Tabela 15- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800630 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Saúde periodontal.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Saúde Periodontal	n	Total	<i>p'</i>
		n (%)	(%)			
<i>TNFα rs1800630</i>	CC	0	2 (5,4)	2		
	CA	7 (19,4)	7 (18,9)	25		>0,05
	AA	29 (80,5)	28 (75,7)	56		
	Total	36	37	82		
	<i>p</i> (H-W)	0,81	0,12			
	Alelos					<i>p''</i>
	C	7 (9,7)	11 (11,9)	27		>0,05
	A	65 (92,3)	63 (85,1)	137		
	Total	72	74	164		

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p'* é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p''* é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

Tabela 16- Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1800630 do gene *TNF- α* na comparação entre Periodontite/ Peri-implantite e Gengivite/ Mucosite peri-implantar.

Gene/SNP	Genótipo	Periodontite/ Peri-implantite	Gengivite/ Mucosite	Total	<i>p</i> '	OR (95% IC)
		n (%)	n (%)			
<i>TNFα</i> rs1800630	CC	0	1 (2,2)	1	<0,05	-
	CA	7 (19,4)	18 (39,1)	14		
	AA	29 (80,5)	27 (58,7)	57		
	Total	36	46	73		
	<i>p</i> (H-W)	0,81	0,30			
	Alelos	<i>p</i>"				
	C	7 (9,7)	20 (21,7)	27	<0,05	0,40
	A	65 (92,3)	72 (78,3)	137		(0,16-0,97)
	Total	72	92	164		

O valor de *p* é referente ao nível de significância no teste de Hardy-Weinberg. *p*' é o valor da significância no teste de homogeneidade entre as amostras; *p*" é o valor da significância no teste das diferenças alélicas.

7. DISCUSSÃO

A identificação de possíveis biomarcadores genéticos para DP possibilitaria a seleção de casos através de diagnóstico precoce. Consequentemente, seria possível a redução e a chance de casos severos na população, o que leva a redução de morbidade e de custos em saúde. O polimorfismo analisado no gene *IL-1 β* variante rs13032029 a prevalência do alelo C é de 66% na população mundial, apresentando uma maior frequência na população africana (76%) e uma menor frequência na população leste asiática (55%). Em nosso estudo, a frequência do alelo C foi de 64%. A importância da regulação desta citocina é baseada no fato de que o *IL-1* atua como mediadora no recrutamento das células inflamatórias para os locais onde há infecção, e é responsável por promover a reabsorção óssea, pois estimula a produção de fibroblastos, induz a síntese de prostaglandina E2 por macrófagos e fibroblastos, estimula a produção de MMPs (MARIA DE FREITAS et al., 2007). Em estudos anteriores, foram apresentados resultados conflitantes quanto à relação entre o genótipo desses genes e a suscetibilidade à periodontite agressiva em diferentes populações. Um estudo de 2004 não detectou associação significativas dos genótipos e/ou alelos para a suscetibilidade à periodontite em uma população chinesa (LI et al., 2004). Entretanto, o estudo de KIANI et al. (2009) revelou uma significativa relação do alelo T no *IL-1 β* rs13032029 em grupos de pacientes portadores de periodontite agressiva. Foi demonstrado por outros pesquisadores que a combinação do alelo T, tanto do *IL-1 α* quanto do *IL-1 β* em pacientes com tecidos periodontais ou peri-implantares inflamados, aumenta o risco para maior destruição tecidual e pode prejudicar o resultado do tratamento da peri-implantite (HAMDY & EBRAHEM, 2011). Diferentemente dos estudos supracitados, no presente trabalho, foram encontradas correlações genotípicas e alélicas significativas, onde foi observado que em uma comparação entre os grupos de Periodontite/Peri-implantite e Saúde periodontal, indivíduos portadores do alelo C possuem um risco de 2,24 vezes a mais ao desenvolvimento de DP. Este dado também pode ser observado quando comparamos os grupos de DP destrutiva e não destrutiva (Periodontite/Peri-implantite e Gingivite/Mucosite) onde o alelo C se encontra em maior frequência quando comparado ao T alelo foi observado que o alelo C aumenta a chance de susceptibilidade em OR=2,45 mais chances.

Na variante analisada do gene IL-6 foi a rs2069837 (A/G). De acordo com o banco de dados Ensemble, a prevalência do alelo A é de 88% na população mundial, apresentando maior frequência em população americana (92%) e menor frequência em população sul asiática (84%). No presente estudo, a frequência alélica observada foi de 93%, sendo similar à frequência da população americana (92%). Isto pode ser explicado pela característica de colonização das américas, o que define um perfil genético semelhante entre os povos. Foi observado em estudos que os níveis do *IL-6* aumentam nos tecidos periodontais inflamados quando comparados com os saudáveis (TAKAHASHI et al., 1994). O IL-6 é expressa em situações que envolvem respostas imunes e reações inflamatórias, como infecção e trauma por macrófagos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (MATSUKI ET AL., 1992). Entretanto, alguns estudos indicam que não há associação entre o polimorfismo do *IL-6* e DP (FAN et al., 2011; HOLLA et al., 2004; LOO et al., 2012; WOHLFAHRT et al., 2006). Em FAN et al. (2011), observaram uma prevalência muito baixa do alelo G em um estudo em uma população chinesa, o que está parecido com o observado no presente estudo. Outro estudo realizado, não observou uma diferença significativa nos alelos entre pacientes com periodontite e controles saudáveis, quando avaliaram uma amostra da população caucasiana da República Tcheca (HOLLA et al., 2004). Outros estudos como LOO et al. (2012), WOHLFAHRT et al. (2006), também não mostraram associação entre polimorfismos genéticos nos genes IL6 rs2069837 e a DP em estudos realizado em população chinesa e Norte americana respectivamente. Em geral, estes dados estão em consonância como os achados do presente estudo, realizado em uma amostra mista da população brasileira, onde foi observada uma maior prevalência do alelo A e não se obteve significância estatística quando comparado os grupos Periodontite/Peri-implantite e Saúde periodontal, da mesma forma quando comparado os grupos de DP destrutiva e não destrutiva (Periodontite/Peri-implantite e Gengivite/Mucosite). Em contrapartida, um estudo realizado em 2009, em uma amostra da população idosas brasileira mostrou uma associação entre o genótipo GG e a periodontite crônica em caucasianos (COSTA et al., 2009). Outros estudos em populações homogêneas mostram uma diferença significativa na distribuição do genótipo entre casos e controles, demonstrando uma associação entre o polimorfismo do *IL-6* e a periodontite como KALBURGI et al., (2010) que realizou o estudo em uma população indiana, SCAPOLI et al., (2012) em população italiana. Os estudos feitos com o *IL-6* ainda são bem controversos. Nossos

resultados são compatíveis com a maioria achados em outras populações, com tudo, pode-se sugerir que outros fatores, especialmente étnicos e / ou demográficos, podem estar influenciando a relação entre genótipo e periodontite. Da mesma forma, tem-se observado que a variação genética também pode resultar em diferenças na expressão da citocina *IL-6* que pode culminar em alterações na resposta inflamatória individual (LAINE et al., 2010; Balcerzyk et al., 2012).

O polimorfismo rs4073 do *IL-8* afeta a função da região promotora e em casos que apresentam o genótipo AA produzem e liberam níveis mais altos do *IL-8*, quando comparados com indivíduos com o genótipo AT ou TT. Tendo-se isto em vista, esse polimorfismo pode ser considerado de interesse para se estudar o papel de fatores genéticos na incidência e gravidade de doenças inflamatórias (SAVAGE et al., 2006). De acordo com o banco de dados Ensemble, a frequência do alelo A para o polimorfismo rs4073 (A/T) do gene *IL-8* é de 52% na população mundial, apresentando maior frequência na população africana (84%) e uma menor frequência na população americana (39%). No presente estudo, a frequência observada foi de 79%, o que se aproxima mais da população africana, fato que pode ser explicado pela intensa contribuição africana na população brasileira altamente miscigenação, uma vez que os africanos foram trazidos para terras brasileiras para o trabalho escravo. Em 2011, demonstrou-se, em uma população mista brasileira, que o polimorfismo A/T do *IL-8* rs4073 estava associado a uma diminuição ao risco de DP. Outros estudos mostram que, na população brasileira, o alelo A ou o genótipo AA está associado com o aumento do risco para DP (KIM et al., 2009; SIPPERT et al., 2013). O que está de acordo com este estudo, que observou que há um aumento acima de três vezes na chance de que o indivíduo homozigoto selvagem tenha DP (OR = 3,34) quando comparado o grupo de DP não destrutiva (gengivite/mucosite). Diferentemente, outro estudo transversal não observou correlação significativa entre os diferentes genótipos do *IL-8* e a gravidade da condição periodontal (KHOSROPANAH et al., 2013). Essa diferença pode ser devido à população de estudo ser homogênea, diferente da população brasileira que é miscigenada. Deve-se considerar também que as associações podem variar de acordo com a grande diferença entre os ambientes e origens genéticas. Baseado no que foi supracitado, parece ser evidente que o alelo A está associado à maior expressão do *IL-8*. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar a associação entre SNP rs4073 e periodontite.

De acordo com o banco de dados Ensemble a frequência do alelo C no rs1799724 (C/T) do gene TNF- α é de 90% na população mundial, apresentando uma maior frequência na população africana (98%) e uma menor frequência na população americana (82%). Em nosso estudo, a frequência do alelo C foi de 57%, fato este que pode ser explicado pela intensa miscigenação, presente em nosso território. O SNP rs179964 do gene TNF- α foi também avaliado no presente trabalho e de acordo com o banco de dados Ensemble a prevalência do C para o polimorfismo rs179964 (T/C) é de 22% na população mundial, apresentando maior frequência na população sul asiática (35%) e uma menor frequência na população africana (15%). Em nosso estudo a frequência observada foi de 26%. O polimorfismo rs1800630 (C/A) também do gene TNF- α , foi analisado e de acordo com o banco de dados Ensemble a prevalência do alelo selvagem A é de 15% na população mundial, apresentando maior frequência na população sul asiática (24%) e uma menor frequência na população africana (10%). Em nosso estudo a frequência observada foi de 16%, em concordância com a frequência mundial. O TNF- α é considerado um mediador crucial durante o desenvolvimento da resposta inflamatória e a remodelação do tecido periodontal. Um grupo de pesquisa estudou a variante rs1800630 do gene TNF- α em indivíduos caucasianos (LAINE et al., 2013), enquanto outros cinco estudos estudaram populações asiáticas (SOGA et al., 2003, Kobayashi et al., 2009a, Kobayashi et al., 2009b, Li e Cao, 2009, Zhang et al. 2011b). Estes estudos demonstraram que indivíduos com genótipo AA tiveram mais do que o dobro de risco de desenvolver DP. Uma grande revisão realizada em 2014, que contou com 46 estudos de diferentes populações, sendo que 33 estudos utilizaram a mesma técnica do presente trabalho (PCR-RFLP) e demonstrou que genótipo AA pode ser mais um fator de risco importante em pacientes com DP (DING et al., 2014). Resultados semelhantes foram apresentados em outros estudos com asiáticos (SOGA et al., 2003; LI et al., 2009). O que está em acordo com este estudo, que observou que a presença do genótipo CC pode possuir um fator protetivo ao desenvolvimento da DP, ou seja, pacientes portadores do genótipo CC possuem chances relativamente menores de desenvolver um DP. Foi observado uma maior frequência do alelo A em pacientes portadores de DP. Com base nesse dado, pode-se inferir que a presença do genótipo AA pode ser um indicador de risco para o aumento da suscetibilidade a DP. Entretanto, resultados contrários são relatados, em que não há associação entre o polimorfismo rs1800630 (C/A) com suscetibilidade à DP (MAJUMDER et al., 2018).

Este mesmo estudo relatou que os genótipos rs1799724 (C/T) rs1799964 (T/C) foram significativamente maiores em pacientes com DP em comparação com controles saudáveis (MAJUMDER et al., 2018). Já em LAVU et al. (2016) não observaram associação significativa para o polimorfismo rs1799724 em uma amostra da população Sul indiana e a DP. No presente estudo, não foi observada nenhuma associação significativa para os polimorfismos rs1799724 e rs1799964 quando foram comparados os grupos de estudo. Para ambas as variantes, foi observado uma maior frequência de genótipos homozigotos sem diferenças significante entre os grupos. Embora os polimorfismos rs1799724, rs 1799964 e rs1800630 tenham mostrado uma associação com a DP em japoneses (SOGA et al., 2003), por exemplo, esse comportamento parece ser diferente entre populações.

Como a periodontite é de natureza multifatorial, envolvendo interações entre os genes, o ambiente e o estilo de vida, as avaliações dos genes de risco periodontal podem ser valiosas em estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas contra a incidência e progressão da DP. Pensa-se que uma complexa rede de citocinas esteja envolvida nessa doença inflamatória e desempenhe um papel crucial na regulação da saúde do tecido periodontal e diversos estudos têm sido feito com intuito de elucidar a doença periodontal. Contudo, observa-se que ainda existe muita controversa a respeito dos genes e sua susceptibilidade à DP. Estudos adicionais são necessários com populações étnicas diversificadas para validar possíveis variações de polimorfismo genérico no risco de periodontite.

8. CONCLUSÃO

Com base no estudo das variantes dos genes supracitados, conclui-se que na variante rs13032029 do gene IL-1 β do, foi encontrada uma correlação genotípicas e alélicas significativas, observou-se em comparação entre os grupos, indivíduos portadores do alelo C possuem um risco de duas vezes a mais ao desenvolvimento de DP.

Na variante rs2069837 analisada do gene IL-6 foi concluiu que uma maior prevalência do alelo A nos grupos, porem, não se obteve significância estatística quando comparado os grupos.

A variante rs4073 do IL-8 conclui-se que a presença do genótipo AA apresentam um risco de três vezes a mais no desenvolvimento de DP.

Baseando-se nos dados do gene TNF- α , a variante rs1800630 pode-se inferir que a presença do genótipo AA pode ser um indicador de risco para o aumento da suscetibilidade a DP. Não observada nenhuma associação significativa a DP para os polimorfismos rs1799724 e rs1799964

Existem bastantes controversas na literatura quanto a biomarcadores a suscetibilidade a doença periodontal devido a diversos fatores étnicos, diferença entre os ambientes, estilo de vida das populações, origens genéticas que podem estar influenciando a relação entre genótipo e periodontite. Com tudo, sugere-se que estudos adicionais sejam realizados em outras populações diversificadas para validar as possíveis variáveis como biomarcadores a DP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANDAR, JASIM M.; RAMS, THOMAS E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000, v. 29, n. 1, p. 7-10, 2002.
- AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.
- ASIFA GZ, LIAQUAT A, MURTAZA I, KAZMI SA, JAVED Q. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter region polymorphism and the risk of coronary heart disease. *The Scientific World Journal*, v. 2013.
- ATAIE-KACHOIE P, POURGHOLAMI MH, MORRIS DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 24, n. 2, p. 163-173, 2013.
- BABAY, N.; ALSHEHRI, F.; AL ROWIS, R. Majors highlights of the new 2017 classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *The Saudi dental journal*, v. 31, n. 3, p. 303, 2019.
- BABEL N., CHEREPNEV G., BABEL D., TROPMANN A., HAMMER M., VOLK H.-D., REINKE P. Analysis of tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , interleukin-10, IL-6, and interferon- γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 77, n. 12, p. 1978-1983, 2006.
- BARTOLD, P. MARK; VAN DYKE, THOMAS E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontology* 2000, v. 62, n. 1, p. 203-217, 2013.
- BECERIK S, OZÇAKA O, NALBANTSOY A *et al.* Effects of menstrual cycle on periodontal health and gingival crevicular fluid markers. *Journal of periodontology*, v. 81, n. 5, p. 673-681, 2010.
- BELIBASAKIS GN, JOHANSSON A, WANG Y *et al.* Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Cytokine*, v. 30, n. 2, p. 56-63, 2005.
- BERGSTRÖM, Jan. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, v. 92, n. 1, p. 1-8, 2004.
- BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology*, v. 64, n. 5 Suppl, p. 456-460, 1993.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of periodontal research*, v. 28, n. 7, p. 500-510, 1993.
- BORRELL, LUISA N.; PAPAPANOU, Panos N. Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 32, p. 132-158, 2005.
- BRENNER DA, O'HARA M, ANGEL P, CHOJKIER M, KARIN M. Prolonged activation

of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature*, v. 337, n. 6208, p. 661-663, 1989.

BRETT PM, ZYGOGIANNI P., GRIFFITHS GS, TOMAZ M., PARKAR M., D'AIUTO F., TONETTI M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of dental research*, v. 84, n. 12, p. 1149-1153, 2005.

BROTHWELL, Douglas J. Should the use of smoking cessation products be promoted by dental offices? An evidence-based report. *Journal-Canadian Dental Association*, v. 67, n. 3, p. 149-152, 2001.

CAMPA D, HUNG RJ, MATES D, ZARIDZE D, SZESZENIA-DABROWSKA N, *et al.* Lack of association between polymorphisms in inflammatory genes and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, v. 14, n. 2, p. 538-539, 2005.

CARRILLO-DE-ALBORNOZ, Ana *et al.* Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of clinical periodontology*, v. 37, n. 3, p. 230-240, 2010.

CASADO PL, VILLAS-BOAS R, DE MELLO W, DUARTE ME, GRANJEIRO JM. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 28, n. 1, 2013.

CHAMBRONE, Leandro; LIMA, Luiz APA; CHAMBRONE, Luiz Armando. Prevalência das Doenças Periodontais no Brasil. Parte II. 1993-2003. *Revista Odonto*. v. 16, n. 31, p. 69-76, 2008.

CHAMPAGNE CM, BUCHANAN W, REDDY MS, PREISSER JS, BECK JD, OFFENBACHER S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, v. 31, n. 1, p. 167-180, 2003.

CHATZOPOULOS, G., DOUFEXI, A. E., WOLFF, L., & KOUVATSI, A. Georgios *et al.* Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphisms and the risk of further periodontal disease progression. *Brazilian oral research*, v. 32, 2018.

CHATZOPOULOS, GEORGIOS S.; DOUFEXI, AIKATERINI-ELLISAVET; KOUVATSI, ANASTASIA. Clinical response to non-surgical periodontal treatment in patients with interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, v. 22, n. 4, p. e446, 2017.

CHEN XT, TAN JY, LEI LH, CHEN LL. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis. *American journal of dentistry*, v. 28, n. 1, p. 9-12, 2015.

CHU, WEN-MING. Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, v. 328, n. 2, p. 222-225, 2013.

COCHRAN, DAVID L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 79, p. 1569-1576, 2008. COLOTTA F, RE F, MUZIO M *et al.* Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*, v. 261, n. 5120, p. 472-475, 1993.

COSTA AM, GUIMARÃES MCM, ER SOUZA, NÓBREGA OT, BEZERRA ACB. Interleukin-6 (G-174C) and tumour necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis. *Gerodontology*, v. 27, n. 1, p. 70-75, 2010.

COSTA PP, TREVISAN GL, MACEDO GO *et al.* Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *Journal of periodontology*, v. 81, n. 3, p. 384-391, 2010.

COSYN J, CHRISTIAENS V, KONINGSVELD V *et al.* An exploratory case-control study on the impact of IL-1 gene polymorphisms on early implant failure. *Clinical implant dentistry and related research*, v. 18, n. 2, p. 234-240, 2016.

COX A, CAMP NJ, NICKLIN MJ, DI GIOVINE FS, DUFF GW. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. *The American Journal of Human Genetics*, v. 62, n. 5, p. 1180-1188, 1998.

COZIER, YVETTE C.; PALMER, JULIE R.; ROSENBERG, LYNN. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the Black Women's Health Study. *Annals of epidemiology*, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2004.

CUI G, WANG H, LI R, ZHANG L, LI Z, WANG Y, HUI R, DING H, WANG DW. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*, v. 9, n. 1, p. 235, 2012.

CULLINAN MP, WESTERMAN B, HAMLET SM *et al.* Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. *Journal of periodontal research*, v. 43, n. 3, p. 328-333, 2008.

DAALDEROP, L. A. *et al.* Periodontal disease and pregnancy outcomes: overview of systematic reviews. *JDR Clinical & Translational Research*, v. 3, n. 1, p. 10-27, 2018.

DAMGAARD C, KANTARCI A, HOLMSTRUP P, HASTURK H, NIELSEN CH, VAN DYKE TE. Porphyromonas gingivalis-induced production of reactive oxygen species, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, CXCL 8 and CCL 2 by neutrophils from localized aggressive periodontitis and healthy donors: modulating actions of red blood cells and resolvin E1. *Journal of periodontal research*, v. 52, n. 2, p. 246-254, 2017.

DE BRUYN H, VANDEWEGHE S, RUYFFELAERT C, COSYN J, SENNERBY L. Radiographic evaluation of modern oral implants with emphasis on crestal bone level and relevance to peri-implant health. *Periodontology 2000*, v. 62, n. 1, p. 256-270, 2013.

DE SOUZA, RODRIGO C.; COLOMBO, ANA PAULA V. Distribution of Fc γ R1a and Fc γ R1b genotypes in patients with generalized aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 77, n. 7, p. 1120-1128, 2006.

DE WAAL MALEFYT R, HAANEN J, SPITS H *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the

antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine*, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DINARELLO, CHARLES A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. 1996. DING C, JI X, CHEN X, XU Y, ZHONG L. TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of clinical periodontology*, v. 41, n. 8, p. 748-759, 2014.

DING, CHENG *et al.* TNF- α gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of clinical periodontology*, v. 41, n. 8, p. 748-759, 2014.

DOUGLASS, Chester W. Risk assessment and management of periodontal disease. *The Journal of the American Dental Association*, v. 137, p. S27-S32, 2006.

ELEMEK, E.; ALMAS, K. Peri-implantitis: Etiology, diagnosis and treatment: an update: P0443. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 39, p. 210-211, 2012.

ESSNER R, RHOADES K, MCBRIDE WH, MORTON DL, ECONOMOU JS. IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *The Journal of Immunology*, v. 142, n. 11, p. 3857-3861, 1989.

FAN WH, LIU DL, XIAO LM, XIE CJ, SUN SY, ZHANG JC. Coronary heart disease and chronic periodontitis: is polymorphism of interleukin-6 gene the common risk factor in a Chinese population?. *Oral diseases*, v. 17, n. 3, p. 270-276, 2011

FERREIRA SD, SILVA GL, CORTELLI JR, COSTA JE, COSTA FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *Journal of clinical periodontology*, v. 33, n. 12, p. 929-935, 2006.

FRANCH-CHILLIDA F., NIBALI L., MADDEN I., DONOS N., BRETT P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *Journal of clinical periodontology*, v. 37, n. 2, p. 137-144, 2010.

GEIVELIS M, TURNER DW, PEDERSON ED, LAMBERTS BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 64, n. 10, p. 980-983, 1993.

GEMMELL, Erica; MARSHALL, Roderick I.; SEYMOUR, Gregory J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, v. 14, n. 1, p. 112-143, 1997.

Ghazouani L, Khalifa SB, Abboud N *et al.* -308G> A and -1031T> C tumor necrosis factor gene polymorphisms in Tunisian patients with coronary artery disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, v. 47, n. 10, p. 1247-1251, 2009.

GOTSMAN I, LOTAN C, SOSKOLNE WA *et al.* Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*, v. 78, n. 5, p. 849-858, 2007.

GRANT, M. M. What do'omic technologies have to offer periodontal clinical practice in

the future?. Journal of periodontal research, v. 47, n. 1, p. 2-14, 2012.

GRAVES DT, CHEN CP, DOUVILLE C, JIANG Y. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. Infection and immunity, v. 68, n. 8, p. 4746-4751, 2000.

GRAVES DT, COCHRAN D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. Journal of periodontology, v. 74, n. 3, p. 391-401, 2003.

GRIGORIADOU, Marianna E. et al. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. Quintessence international, v. 41, p. 517-25, 2010.

GRODSTEIN, Francine; COLDITZ, GRAHAM A.; STAMPFER, Meir J. Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. The Journal of the American Dental Association, v. 127, n. 3, p. 370-377, 1996.

HAAK-FRENDSCHO M, MARSTERS SA, MORDENTI J *et al.* Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody. The Journal of Immunology, v. 152, n. 3, p. 1347-1353, 1994.

HAMDY, AHMED ABD EL-MEGUID MOSTAFA; EBRAHEM, MOHAMED ABD EL-MONIEM. The Effect of Interleukin-1 Allele 2 Genotype (IL-1a- 889 and IL-1b+ 3954) on the Individual's Susceptibility to Peri-Implantitis: Case-Control Study. Journal of Oral Implantology, v. 37, n. 3, p. 325-334, 2011.

HILGERS, K. K.; KINANE, D. F. Smoking, periodontal disease and the role of the dental profession. International journal of dental hygiene, v. 2, n. 2, p. 56-63, 2004.

HIRANO T, MATSUDA T, TURNER M, MIYASAKA N, BUCHAN G, TANG B, *et al.* Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. European journal of immunology, v. 18, n. 11, p. 1797-1802, 1988.

HIRANO T, YASUKAWA K, HARADA H, TAGA T, WATANABE Y, MATSUDA T, *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature, v. 324, n. 6092, p. 73-76, 1986

HODGE, P. J.; RIGGIO, M. P.; KINANE, D. F. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. Journal of clinical periodontology, v. 28, n. 5, p. 430-436, 2001.

HOFFMANN SC, STANLEY EM, DARRIN COX E *et al.* Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-cd3/cd28-stimulated peripheral blood lymphocytes1. Transplantation, v. 72, n. 8, p. 1444-1450, 2001.

HOLLA LI, FASSMANN A., STEJSKALOVA A., ZNOJIL V., VANČEK J., VACHA J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. Journal of periodontology, v. 75, n. 1, p. 30-36, 2004.

HUGHES FJ, TURNER W, BELIBASAKIS G, MARTUSCELLI G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontology 2000, v. 41, n. 1, p.

48-72, 2006.

HULL J, THOMSON A, KWIATKOWSKI D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*, v. 55, n. 12, p. 1023-1027, 2000.

IRWIN CR, MYRILLAS TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral diseases*, v. 4, n. 1, p. 43-47, 1998.

JOHANNSEN A, BJURSHAMMAR N, GUSTAFSSON A. The influence of academic stress on gingival inflammation. *International journal of dental hygiene*, v. 8, n. 1, p. 22-27, 2010

KACIŃSKI, MAREK; WENDORFF, JANUSZ; ŽAK, IWONA. Impact of the -174G/C interleukin-6 (IL-6) gene polymorphism on the risk of paediatric ischemic stroke, its symptoms and outcome. *Folia neuropathologica*, v. 50, n. 2, p. 147-151, 2012.

KALBURGI NB, BHATIA A., BILICHODMATH S., PATIL SR, MANGALEKAR SB, BHAT K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *Journal of oral science*, v. 52, n. 3, p. 431-437, 2010.

KARIMBUX NY, SARAIYA VM, ELANGO VAN S *et al.* Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*, v. 83, n. 11, p. 1407-1419, 2012.

KHADER YS, DAUOD AS, EL-QADERI SS, ALKAFAJEI A, BATAYHA WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications*, v. 20, n. 1, p. 59-68, 2006

KHOSROPANAH, H., SARVESTANI, E. K., MAHMOODI, A., & GOLSHAH, M. Association of IL-8 (-251 A/T) gene polymorphism with clinical parameters and chronic periodontitis. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, v. 10, n. 4, p. 312, 2013.

KIANI Z, TAVAKKOL-AFSHARI J, HOJJAT H, HR ÁRABE, RADVAR M, SADEGHIZADEH M, *et al.* Polymorphism of IL-1 α (-889) Gene and Its Association with. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, p. 95-98, 2009.

KIM YJ, VIANA AC, CURTIS KM, ORRICO SR, CIRELLI JA, SCAREL-CAMINAGA RM. Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA and Cell Biology*, v. 28, n. 4, p. 185-190, 2009.

KIM YJ, VIANA AC, CURTIS KM, ORRICO SR, CIRELLI JA, SCAREL-CAMINAGA RM. Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA and Cell Biology*, v. 28, n. 4, p. 185-190, 2009.

KIM, Yeon J. *et al.* Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA and Cell Biology*, v. 28, n. 4, p. 185-190, 2009.

KINANE DF, HODGE P, ESKDALE J, ELLIS R, GALLAGHER G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *Journal of periodontal research*, v. 34, n. 7, p. 379-386, 1999.

KINANE DF, PETERSON M, STATHOPOULOU PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology* 2000, v. 40, n. 1, p. 107-119, 2006.

KINANE DF, WINSTANLEY FP, ADONOGIANAKI E, MOUGHAL NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archives of oral biology*, v. 37, n. 2, p. 153-156, 1992.

KINANE, DENIS F.; SHIBA, HIDEKI; HART, THOMAS C. The genetic basis of periodontitis. *Periodontology* 2000, v. 39, n. 1, p. 91-117, 2005.

KINANE, DENIS F.; STATHOPOULOU, PANAGIOTA G.; PAPAPANOU, PANOS N. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.

KOBAYASHI, T., MURASAWA, A., ITO, S., YAMAMOTO, K., KOMATSU, Y., ABE, A., SUMIDA, T. & YOSHIE, H. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol.* v 80, p 792-799, 2009a.

KOBAYASHI, T., NAGATA, T., MURAKAMI, S., TAKASHIBA, S., KURIHARA, H., IZUMI, Y., NUMABE, Y., WATANABE, H., KATAOKA, M., NAGAI, A., HAYASHI, J., OHYAMA, H., OKAMATSU, Y., INAGAKI, Y., TAI, H. & YOSHIE, H. Genetic risk factors for periodontitis in a Japanese population. *J Dent Res.* v 88, p 1137-1141, 2009b.

KORNMAN KS, CRANE A, WANG HY, DI GIOVINE FS, NEWMAN MG, PIRK FW., *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, v. 24, n. 1, p. 72-77, 1997.

KORNMAN KS, PAGE RC, TONETTI MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000, v. 14, n. 1, p. 33-53, 1997.

LABOW M, SHUSTER D, ZETTERSTROM M, NUNES P, TERRY R, CULLINAN EB, BARTFAI T, SOLORZANO C, MOLDAWER LL, CHIZZONITE R, MCINTYRE KW. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *The Journal of Immunology*, v. 159, n. 5, p. 2452-2461, 1997.

LAINE ML, LOOS BG, CRIELAARD W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *International journal of dentistry*, v. 2010, 2010.

LAINE ML, MOUSTAKIS V, KOUMAKIS L, POTAMIAS G, LOOS BG. Modeling susceptibility to periodontitis. *Journal of Dental Research*, v. 92, n. 1, p. 45-50, 2013.

LAINE, MARJA L.; CRIELAARD, WIM; LOOS, BRUNO G. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology* 2000, v. 58, n. 1, p. 37-68, 2012.

LALLA, EVANTHIA; PAPAPANOU, PANOS N. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 7, n. 12, p. 738, 2011. ROSEN, PAUL *et al.* Peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *Journal of periodontology*, v. 84, n. 4, p. 436-443, 2013.

LAVU, VAMSI *et al.* Polymorphic Regions in Fc Gamma Receptor and Tumor Necrosis Factor- α Genes and Susceptibility to Chronic Periodontitis in a Cohort From South India. *Journal of periodontology*, v. 87, n. 8, p. 914-922, 2016.

LI G, YUE Y, TIAN Y, LI JL, WANG M, LIANG H, LIAO P, LOO WT, CHEUNG MN, CHOW LW. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*, v. 60, n. 2, p. 552-560, 2012.

LI QY, ZHAO HS, MENG HX, ZHANG L., XU L. CHEN ZB, *et al.* Association analysis between interleukin-1 family polymorphisms and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *Journal of periodontology*, v. 75, n. 12, p. 1627-1635, 2004.

LI, L. M. & CAO, Z. Z. Association of TNF - A - 863 and CGRP979 gene polymorphisms with susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese Han nationality. *Academic Journal of Second Military Medical University*. v 30, p 541-544, 2009.

LIAO J, LI C, WANG Y, TEN M, SUN X, TIAN A, ZHANG Q, LIANG X. Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Molecular biology reports*, v. 41, n. 5, p. 2789-2798, 2014.

LINDROTH AM, PARK YJ. Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis. *Journal of periodontal & implant science*, v. 43, n. 3, p. 111-120, 2013.

LOO WTY, FAN C.-B., BAI L.-J., YUE Y., DOU Y.-D., WANG M., LIANG H., CHEIANG MNB, CHEUNG MNB, CHOW LWC, LI J.-L. , TIAN Y., QING L. Gene polymorphism and protein of human pro-and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. In: *Journal of translational medicine*. BioMed Central, p. S8. 2012.

LOOS BG, CRAANDIJK J, HOEK FJ, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER VELDEN U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of periodontology*, v. 71, n. 10, p. 1528-1534, 2000.

LÓPEZ, Néstor J.; JARA, Lilian; VALENZUELA, Carlos Y. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, v. 76, n. 2, p. 234-243, 2005.

MAJUMDER P, THOU K, BHATTACHARYA M, NAIR V, GHOSH S, DEY SK. Association of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene promoter polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the eastern Indian population. *Bioscience reports*, v. 38, n. 4, 2018.

MAJUMDER, POULAMI *et al.* Association of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene promoter polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the eastern Indian population. *Bioscience reports*, v. 38, n. 4, 2018.

MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

MARIA DE FREITAS N, IMBRONITO AV, NEVES AC, NUNES FD, PUSTIGLIONI FE, LOTUFO RF. Analysis of IL-1A (-889) and TNFA (-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *European cytokine network*, v. 18, n. 3, p. 25-30, 2007.

MATSUKI, Y.; YAMAMOTO, THARAK; HARA, K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, v. 76, n. 1, p. 42, 1992.

MCCAULEY LK, NOHUTCU RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of periodontology*, v. 73, n. 11, p. 1377-1391, 2002.

MELGAR-RODRÍGUEZ S, DÍAZ-ZÚÑIGA J, ALVAREZ C *et al*. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular oral microbiology*, v. 31, n. 2, p. 162-174, 2016.

MICHALOWICZ BS, DIEHL SR, GUNSOLLEY JC *et al*. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 71, n. 11, p. 1699-1707, 2000.

MILLS, KINGSTON HG. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 11, p. 841-855, 2004.

MOHLER KM, TORRANCE DS, SMITH CA *et al*. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 3, p. 1548-1561, 1993.

MOMBELLI A, MÜLLER N, CIONCA N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clinical oral implants research*, v. 23, p. 67-76, 2012.

MOREIRA PR, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. The IL1A (- 889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Journal of periodontal research*, v. 42, n. 1, p. 23-30, 2007.

MOREIRA PR, LIMA PM, SATHLER KO *et al*. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 148, n. 1, p. 119-126, 2007

MORELAND LW, BAUMGARTNER SW, SCHIFF MH *et al*. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *New England Journal of Medicine*, v. 337, n. 3, p. 141-147, 1997.

MULLARKEY MF, LEIFERMAN KM, PETERS MS *et al*. Human cutaneous allergic late-phase response is inhibited by soluble IL-1 receptor. *The Journal of Immunology*, v. 152, n. 4, p. 2033-2041, 1994.

NAZIR, Muhammad Ashraf. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, v. 11, n. 2, p. 72, 2017.

NIBALI, Luigi; DONOS, Nikos; HENDERSON, Brian. Periodontal infectogenomics. *Journal of medical microbiology*, v. 58, n. 10, p. 1269-1274, 2009.

NOCITI JR, FRANCISCO H.; CASATI, MARCIO Z.; DUARTE, POLIANA MENDES. Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*, v. 67, n. 1, p. 187-210, 2015.

NUNN, MARTHA E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology 2000*, v. 32, n. 1, p. 11-23, 2003.

OFFENBACHER, STEVEN; BECK, JAMES D. Commentary: changing paradigms in the oral disease–systemic disease relationship. *Journal of periodontology*, v. 85, n. 6, p. 761-764, 2014.

O'GARRA A, VIEIRA PL, VIEIRA P, GOLDFELD AE. IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *The Journal of clinical investigation*, v. 114, n. 10, p. 1372-1378, 2004.

PAGE, ROY C.; KORNMAN, KENNETH S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, v. 14, n. 1, p. 9-11, 1997.

OKADA H, MURAKAMI S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 9, n. 3, p. 248-266, 1998.

PATIL C, ROSSA C JR, KIRKWOOD KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral microbiology and immunology*, v. 21, n. 6, p. 392-398, 2006.

PERSSON, Goesta Rutger. Periodontal complications with age. *Periodontology 2000*, v. 78, n. 1, p. 185-194, 2018.

QUIRYNEN M, DE SOETE M, VAN STEENBERGHE D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical Oral Implants Research: Review article*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2002.

QUIRYNEN M, VOGELS R, PEETERS W, VAN STEENBERGHE D, NAERT I, HAFFAJEE A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine'peri-implant pockets. *Clinical oral implants research*, v. 17, n. 1, p. 25-37, 2006.

RAMSEIER CA, KINNEY JS, HERR AE *et al*. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 80, n. 3, p. 436-446, 2009.

RENVERT S, ROOS-JANSÅKER AM, LINDAHL C, RENVERT H, RUTGER PERSSON G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical oral implants research*, v. 18, n. 4, p. 509-516, 2007.

RHEU, Gun-Bak *et al*. Risk assessment for clinical attachment loss of periodontal tissue in Korean adults. *The journal of advanced prosthodontics*, v. 3, n. 1, p. 25-32, 2011.

RIDKER PM, RIFAI N, STAMPFER MJ, HENNEKENS CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, v. 101, n. 15, p. 1767-1772, 2000.

RISCH, NEIL J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, v. 405, n. 6788, p. 847-856, 2000.

ROGERS JE, LI F, COATNEY DD, ROSSA C *et al.* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 78, n. 3, p. 550-558, 2007.

SAKAGUCHI, SHIMON. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 22, p. 531-562, 2004.

SANDERS AE, SOFER T, WONG Q *et al.* Chronic periodontitis genome-wide association study in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Journal of dental research*, v. 96, n. 1, p. 64-72, 2017.

SAVAGE SA, HOU L, LISSOWSKA J, CHOW WH, ZATONSKI W, CHANOCK SJ, *et al.* Interleukin-8 polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in a Polish population. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, v. 15, n. 3, p. 589-591, 2006.

SCAPOLI C, MAMOLINI E, CARRIERI A *et al.* Gene–gene interaction among cytokine polymorphisms influence susceptibility to aggressive periodontitis. *Genes & Immunity*, v. 12, n. 6, p. 473-480, 2011.

SCAREL-CAMINAGA RM, TREVILATTO PC, SOUZA AP, BRITO RB, CAMARGO LE, LINE SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 31, n. 6, p. 443-448, 2004.

SCAPOLI L., GIRARDI A., PALMIERI A., *et al.* IL6 and IL10 are genetic susceptibility factors of periodontal disease. *Dental research journal*, v. 9, n. Suppl 2, p. S197, 2012.

SCAREL-CAMINAGA RM, TREVILATTO PC, SOUZA AP, BRITO RB, LINE SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 29, n. 7, p. 587-591, 2002.

SCHAEFER AS, RICHTER GM, NOTHNAGEL M *et al.* A genome-wide association study identifies *GLT6D1* as a susceptibility locus for periodontitis. *Human Molecular Genetics*, v. 19, n. 3, p. 553-562, 2010.

SHIMADA Y, KOMATSU Y, IKEZAWA-SUZUKI I, TAI H, SUGITA N, YOSHIE H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Journal of periodontology*, v. 81, n. 8, p. 1118-1123, 2010.

SHIMPUKU H, NOSAKA Y, KAWAMURA T, TACHI Y, SHINOHARA M, OHURA K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 4, p. 423-429, 2003.

SILVA GLM, FERREIRA SD, ZENÓBIO EG, SOARES RV, COSTA FO. Mucosite periimplantar e periimplantite: prevalência e indicadores de risco em indivíduos parcialmente edêntulos. *Periodontia*, p. 90-97, 2007.

SILVA-BOGHOSSIAN CM, COLOMBO AP, TANAKA M, RAYO C, XIAO Y, SIQUEIRA WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PloS one*, v. 8, n. 10, 2013.

SOCRANSKY, SIGMUND S.; HAFFAJEE, ANNE D. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, v. 38, n. 1, p. 135-187, 2005..

SOCRANSKY, SIGMUND S.; HAFFAJEE, ANNE D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of periodontology*, v. 63, p. 322-331, 1992.

SOGA Y, NISHIMURA F, OHYAMA H, MAEDA H, TAKASHIBA S, MURAYAMA Y. Tumor necrosis factor- α gene (TNF- α) – 1031/– 863, – 857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of clinical periodontology*, v. 30, n. 6, p. 524-531, 2003.

STEWART, ROBERT J.; MARSDEN, PHILIP A. Biologic control of the tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *American journal of kidney diseases*, v. 25, n. 6, p. 954-966, 1995.

STRIMBU, KYLE; TAVEL, JORGE A. What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

TAKAHASHI K, TAKASHIBA S, NAGAI A *et al.* Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 65, n. 2, p. 147-153, 1994

TABOR, HOLLY K.; RISCH, NEIL J.; MYERS, RICHARD M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 5, p. 391-397, 2002.

TAKAHASHI K, TAKASHIBA S, NAGAI A, TAKIGAWA M, MYOUKAI F, KURIHARA H., *et al.* Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology*, v. 65, n. 2, p. 147-153, 1994.

TAYLOR, PETER C.; WILLIAMS, RICHARD O.; FELDMANN, MARC. Tumour necrosis factor α as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Current opinion in biotechnology*, v. 15, n. 6, p. 557-563, 2004..

TE VELDE AA *et al.* Embracing complexity beyond systems medicine: a new approach to chronic immune disorders. *Frontiers in immunology*, v. 7, p. 587, 2016.

TELES R, TELES F, FRIAS-LOPEZ J, PASTER B, HAFFAJEE A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, v. 62, n. 1, p. 95-162, 2013.

THOMADAKI, K., HELMERHORST, E. J., TIAN, N., SUN, X., SIQUEIRA, W. L., WALT, D. R., & OPPENHEIM, F. G. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary

diagnostics. *Journal of dental research*, v. 90, n. 11, p. 1325-1330, 2011.

THOMAS, M. V.; PULEO, D. A. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *Journal of dental research*, v. 90, n. 9, p. 1052-1061, 2011.

TODESCAN, Sylvia; NIZAR, Reem. Managing patients with necrotizing ulcerative periodontitis. *Journal (Canadian Dental Association)*, v. 79, p. d44-d44, 2013.

TONETTI, MAURIZIO S.; MOMBELLI, ANDREA. Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology*, v. 4, n. 1, p. 39-52, 1999.

TREVILATTO PC, SCAREL-CAMINAGA RM, BRITO RB, JR., SOUZA AP, LINHA SR. Polymorphism at position- 174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of clinical periodontology*, v. 30, n. 5, p. 438-442, 2003.

UWITONZE, Anne Marie et al. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Is there a role for vitamin D?. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 180, p. 65-72, 2018.

WAGNER J, KAMINSKI WE, ASLANIDIS C MODER, D., HILLER, K. A., CHRISTGAU, M., ... & SCHMALZ. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 34, n. 10, p. 823-827, 2007.

WANG, DANXIN; SADÉE, WOLFGANG. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *The AAPS journal*, v. 8, n. 3, p. E515-E520, 2006.

WECKMANN, ANA LUISA; ALCOCER-VARELA, JORGE. Cytokine inhibitors in autoimmune disease. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders. p. 539-557, 1996.

WEI XM, CHEN YJ, WU L, CUI LJ, HU DW, ZENG XT. Tumor necrosis factor- α G-308A (rs1800629) polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: a meta-analysis of 16 case-control studies. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

WILLIAMS RC, OFFENBACHER S. Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontology 2000*, v. 23, n. 1, p. 9-12, 2000.

WOHLFAHRT JC, WU T., HODGES JS, HINRICHS JE, MICHALOWICZ BS No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, v. 77, n. 3, p. 426-436, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. 1993. Site: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>

WU YY, CAO HH, KANG N, GONG P, OU GM. Expression of cellular fibronectin mRNA in adult periodontitis and peri-implantitis: a real-time polymerase chain reaction study. *International journal of oral science*, v. 5, n. 4, p. 212-216, 2013.

WU YY, XIAO E, GRAVES DT. Diabetes mellitus related bone metabolism and

periodontal disease. International journal of oral science, v. 7, n. 2, p. 63-72, 2015.

WU, Min; CHEN, Shao-Wu; JIANG, Shao-Yun. Relationship between gingival inflammation and pregnancy. Mediators of inflammation, v. 2015, 2015.

YAMAMOTO T, KITA M, OSEKO F, NAKAMURA T, IMANISHI J, KANAMURA N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with Porphyromonas gingivalis. Journal of periodontal research, v. 41, n. 6, p. 554-559, 2006.

YOSHIE H, KOBAYASHI T, TAI H, GALICIA JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. Periodontology 2000, v. 43, n. 1, p. 102-132, 2007.

ZHANG HY, FENG L, WU H, XIE XD. The association of *IL-6* and *IL-6R* gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. Oral diseases, v. 20, n. 1, p. 69-75, 2014.

ZHANG, L., ZHONG, L. J., ZHANG, Q., SUN, D. L. & ZHANG, Y. M. Research of association between tumor necrosis factor A -863C/A genotype and chronic periodontitis and coronary heart disease. Stomatology. v 31, p 261-264, 2011b.

ANEXOS

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa *“Perfil genético e epigenético de mediadores inflamatórios em saliva, gengiva e fluido gengival de indivíduos com Periodontite e Peri-implantite”*. Você foi selecionado por ordem de atendimento e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição Unigranrio. O objetivo do presente projeto é determinar a presença de polimorfismos genéticos e o perfil de microRNAs para mediadores inflamatórios na saliva, nos tecidos gengivais e no fluido gengival em indivíduos com Doença Periodontal e Peri-implantar. Sua participação consistirá no fornecimento de uma amostra de saliva, de tecido gengival e fluido gengival durante o procedimento diagnóstico nas Clínicas de Implantodontia e Periodontia. Os riscos relacionados com sua participação são pequenos, porque todos os procedimentos realizados são rotineiros e seguem rigorosamente os protocolos de biossegurança. Ou seja, utilizamos materiais descartáveis e instrumentais esterilizados. Caso você seja diagnosticado com Doença Periodontal ou Peri-implantar você receberá tratamento gratuito. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Todas as amostras coletadas serão codificadas e os pesquisadores manterão sigilo sobre seus dados pessoais. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Carina Maciel da Silva Boghossian (e-mail: carinabogho@yahoo.com.br; telefone: 21-97200-9913), Cláudia Maria Pereira (e-mail: claudemarie_br@yahoo.com.br; telefone: 21-99911-3269) e Plínio Mendes Senna; e das alunas a Dayany Pereira Sehnem (e-

mail:dayany_sehnem@hotmail.com ; telefone 21-97967-4801) e Juliana Rosa (anarosaferreirado@gmail.com)

Cláudia Maria Pereira

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na R. Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733, ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal

ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: *„Perfil genético e epigenético de mediadores inflamatórios em saliva, gengiva e fluido gengival de indivíduos com Periodontite e Peri-implantite„*

Pesquisador: Cláudia Maria Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70121817.3.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.235.756

Apresentação do Projeto:

Trata-se um estudo voltado para a descrição simultânea de eventos genéticos e epigenéticos em Peri-implantite. Espera-se com esta pesquisa, a identificação de uma assinatura que permita selecionar indivíduos mais susceptíveis à Doença Periodontal e Peri-implantar, podendo assim estabelecermos medidas preventivas voltadas para a redução da morbidade provocada por estas doenças.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo do presente projeto é determinar a presença de polimorfismos genéticos e o perfil de microRNAs para mediadores inflamatórios na saliva, nos tecidos gengivais e no fluido gengival em indivíduos com Doenças Periodontais e Peri-implantares.

Objetivo Secundário:

- Determinar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de Doença Periodontal e Peri-implantite;
- Avaliar a presença de polimorfismos genéticos nos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 em amostras de saliva;
- Determinar o perfil de microRNAs relacionados

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 2.235.756

com os marcadores inflamatórios acima citados em amostras de gengiva e fluido gengival;• Correlacionar os dados sócio demográficos e clínicos com os dados moleculares

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos relacionados a este projeto serão aqueles relacionados à obtenção de amostras teciduais gengivais, porém são os mesmos observados em qualquer procedimento cirúrgico odontológico. Entretanto, tais abordagens já são muito bem estabelecidos na rotina odontológica, de modo que os riscos são bastante reduzidos.

Benefícios:

Os benefícios consistirão no tratamento periodontal gratuito para aqueles indivíduos diagnosticados com Periodontite ou Peri-implantite.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nas informações básicas do projeto foi inserida a informação que o método de coleta de tecidos está detalhado no projeto.

No projeto completo foi inserido um parágrafo no item 4.4. "Coleta de fluido gengival e tecido gengival para análise de miRNAs", esclarecendo os questionamentos realizados no parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A questão da assinatura dos termos de apresentação obrigatória foram discutidas na última reunião do conselho e as modificações pertinentes foram realizadas.

Recomendações:

Recomendo a aprovação do projeto e início da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de ética em Pesquisa da Unigranrio atendendo o previsto na Resolução nº 466/12 do CNS/MS aprovou o referido projeto na reunião ocorrida em 23 de agosto de 2017. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa será necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 2.235.756

Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,
CEP/Unigranrio.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_876104.pdf	10/07/2017 21:11:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Perimplantite.pdf	10/07/2017 20:00:01	Cláudia Maria Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoprotecao.pdf	10/07/2017 13:48:20	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Cronograma	Cronograma_Perimplantite.pdf	19/08/2017 17:32:13	Cláudia Maria Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_perimplantite.pdf	19/08/2017 17:31:46	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Outros	Utiliz_imagens.pdf	19/08/2017 16:12:11	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Orçamento	Orcamento_perimplant.pdf	19/08/2017 16:10:35	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia.pdf	19/08/2017 16:10:07	Cláudia Maria Pereira	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	12/08/2017 13:03:07	Cláudia Maria Pereira	Aceito

Situação do
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 2.235.756

DUQUE DE CAXIAS, 23 de Agosto de 2017

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: csp@unigranrio.com.br