



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RICHELLE SOARES RODRIGUES

**ANÁLISE DE GENÓTIPOS *fimA* DE *Porphyromonas gingivalis* E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE**

FORTALEZA

2019

RICHELLE SOARES RODRIGUES

ANÁLISE DE GENÓTIPOS *fimA* DE *Porphyromonas gingivalis* E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S856a Soares Rodrigues, Richelle.
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DE GENÓTIPOS fimA DE
Porphyromonas gingivalis EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE / Richelle Soares
Rodrigues. – 2019.
47 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia
e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo.

1. Periodontite. 2. Porphyromonas gingivalis. 3. Polimorfismos genéticos. I. Título.

CDD 617.6

RICHELLE SOARES RODRIGUES

ANÁLISE DE GENÓTIPOS *fimA* DE *Porphyromonas gingivalis* E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.
Área de concentração: Clínica odontológica.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr^a. Virgínia Régia Souza da Silveira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr^a. Iracema Matos de Melo
Universidade Federal do Ceará – UFC

Danilo Lopes Ferreira Lima
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr^a. Juliana Ximenes Damasceno
Universidade Christus – UNICHRISTUS

Aos meus pais, pelo apoio e amor constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo, pelo estímulo e por acreditar na minha capacidade desde a especialização. Seus ensinamentos, apoio e compreensão tornaram a minha jornada até aqui mais agradável e possível. Tenho carinho, admiração, gratidão e respeito não só pelo excelente professor, mas sobretudo pela boa pessoa que é.

À professora Virgínia Régia Silveira, pelo apoio desde o princípio dos experimentos, pelo empenho em ajudar, pelos ensinamentos passados e pelo tempo doado. Muito obrigada por toda colaboração e amizade. Também a admiro e respeito profundamente.

À professora Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga, da UNESP-Araraquara, e sua aluna Bárbara Roque, pela parceria, disponibilidade e apoio para tornar parte desta tese possível.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, na pessoa da sua diretora Prof.^a Lidianny Karla Azevedo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará e ao seu coordenador Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia, pelo empenho e dedicação ao programa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao técnico do laboratório de pesquisa do PPGO-UFC, David Queiroz, por ser sempre muito solícito e cordial. Sou muito grata por sua ajuda e seu bom humor no laboratório.

Aos colegas de doutorado do PPGO-UFC, pelo companheirismo ao longo desta jornada.

A todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

Aos meus pais, Roberto Alves Rodrigues e Fátima Soares Rodrigues, por serem parte essencial de toda a minha jornada acadêmica. Sem seus apoio, incentivo e exemplo não seria possível chegar até aqui. Pessoas por quem meu amor e admiração são imensuráveis.

Ao meu marido, Felipe Fernandes Moreira, pelo apoio e ajuda quando preciso, pelo exemplo acadêmico e pelos momentos de leveza em meio às tensões durante experimentos, análise estatística e escrita. A vida ao seu lado é muito melhor.

A todos os meus familiares e amigos que tornam minha vida mais tranquila e feliz em todos os momentos.

RESUMO

A destruição periodontal é relacionada ao envolvimento de uma microbiota periodontopatogênica e à susceptibilidade do paciente para a doença. Os objetivos desta tese foram: avaliar a presença do periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* e seus genótipos *fimA* em biofilme subgingival de pacientes com periodontite em suas formas mais avançadas (capítulo 1), e avaliar a presença de polimorfismos nos genes CDKN2B(rs3217992) e GLT6D1(rs1537415) nesses pacientes (capítulo 2). Para isso, foram avaliados 100 pacientes com periodontite estágios III e IV graus B e C e 61 pacientes saudáveis. O exame clínico realizado incluiu índice gengival, índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, avaliação de mobilidade e lesão de furca. Amostras de biofilme subgingival foram coletadas dos sítios interproximais com maior perda de inserção para análise microbiológica e foram avaliadas através de PCR. Para análise dos polimorfismos genéticos, amostras de células bucais foram analisadas por PCR-RT. *P. gingivalis* mostrou-se presente em 61,96% das amostras. A prevalência de *P. gingivalis* foi maior nos pacientes com periodontite grau C ($p=0.048$), nos pacientes com maior média de perda de inserção clínica ($p<0.001$), profundidade de sondagem ($p<0.001$) e sangramento a sondagem ($p=0.01$) e nos sítios com maior destruição periodontal ($p=0.01$). O genótipo *fimA* II foi mais prevalente nos pacientes com maior média de profundidade de sondagem ($p=0.04$) e maior proporção de sítios sangrantes ($p=0.006$). Em relação aos polimorfismos genéticos estudados, não foram encontradas associações significativas com as amostras de pacientes com doença quando comparados a pacientes saudáveis, nem entre os graus B e C. Como conclusão, na amostra de brasileiros com periodontite estágios III e IV graus B e C estudada, a prevalência de *P. gingivalis* foi maior nos pacientes grau C e naqueles com sítios com maior destruição periodontal. A presença do seu genótipo *fimA* II foi maior naqueles com maior média de profundidade de sondagem e maior proporção de sítios sangrantes, porém não houve associação com os polimorfismos genéticos nos genes CDKN2BAS e GLT6D1 com a doença periodontal na amostra brasileira estudada.

Palavras-chave: Periodontite. *Porphyromonas gingivalis*. Polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Periodontal destruction is related to the presence of periodontopathogenic microbiota and to the susceptibility of the patient to the disease. The objective of this study was to assess the presence of the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* and its *fimA* genotypes in subgingival biofilm of patients with periodontitis in its most advanced forms, as well as the presence of genetic polymorphisms in CDKN2BAS and GLT6D1 genes. One hundred patients with periodontitis stages III and IV grades B and C and 61 healthy patients were evaluated. Clinical examination included gingival index, bleeding at probing, depth of catheterization and level of clinical insertion. Subgingival biofilm samples were evaluated through PCR for microbiological analysis and saliva samples were analyzed by RT-PCR for detection of the genetic polymorphisms. The prevalence of *P. gingivalis* was 61.96% and it was more prevalent in grade C periodontitis patients ($p=0.048$), in patients with greater probing depth ($p<0.001$), clinical attachment level ($p<0.001$) and bleeding on probing ($p=0.01$), and in sites with greater periodontal destruction ($p=0.01$). *FimA* II genotype was more prevalent in patients with greater mean probing depth ($p=0.04$) and greater proportion of bleeding sites ($p=0.006$). None of the genetic polymorphisms studied showed a significant association to periodontitis patients when compared to healthy subjects, nor when compared to grades B and C periodontitis patients. In conclusion, in the sample of Brazilians with periodontitis stages III and IV grades B and C, the prevalence of *P. gingivalis* was higher in grade C patients and in those with sites with greater periodontal destruction, the presence of its *fimA* II genotype was higher in those with greater mean probing depth and proportion of bleeding sites, but they were not associated with polymorphisms in the CDKN2BAS and GLT6D1 genes in the Brazilian population studied.

Keywords: Periodontitis. *Porphyromonas gingivalis*. Genetic polymorphisms.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	10
2.	PROPOSIÇÃO	12
3.	CAPÍTULOS	13
3.1	CAPÍTULO 1	14
	ANÁLISE DE GENÓTIPOS FIMA DE <i>Porphyromonas gingivalis</i> EM PACIENTES COM PERIODONTITE	
3.2	CAPÍTULO 2.....	30
	ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES GLT6D1 E CDKN2BAS EM PACIENTES COM PERIODONTITE	
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	44
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	45
	ANEXO A	47
	ANEXO B	48
	APÊNDICE 1	49
	APÊNDICE 2	51
	APÊNDICE 3	55
	APÊNDICE 4	56
	APÊNDICE 5	58
	APÊNDICE 6	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

Doenças periodontais são patologias inflamatórias causadas primariamente pela presença de placa bacteriana no ambiente crevicular gengival, que induz a uma série de respostas imunoinflamatórias do hospedeiro^{1,2}. A inflamação mediada pela presença da placa bacteriana pode ser limitada aos tecidos gengivais. Entretanto, em hospedeiros susceptíveis, pode levar à destruição progressiva dos tecidos periodontais de suporte, resultado em periodontite, cujas consequências podem incluir desde perda de inserção periodontal e mobilidade até perda dentária^{3,4}.

A periodontite é uma doença imunoinflamatória que resulta em inflamação dos tecidos de suporte do dente e em perda progressiva de inserção⁴. Essa patologia depende da ocorrência simultânea de vários fatores⁵. O ambiente local deve conter espécies bacterianas relacionadas à destruição periodontal e deve ser favorável à expressão de fatores de virulência pelos patógenos⁵. Além da presença de periodontopatógenos, é necessário a susceptibilidade do hospedeiro, que se encontra influenciada por fatores ambientais, como o hábito de fumar, por fatores sistêmicos, como a presença de diabetes, assim como por fatores genéticos².

Até 2018, as duas principais formas de doença periodontal induzida por placa bacteriana eram a periodontite crônica e a periodontite agressiva⁴. Após o *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*, a periodontite passou a não mais ser subdividida em crônica e agressiva, mas classificada em estágios e graus que descrevem sua apresentação utilizando parâmetros clínicos e outros elementos que afetam seu manejo clínico e prognóstico, sendo os estágios III e IV e o grau C as formas mais severas da doença^{6,7}.

Entre os patógenos estudados, a *Porphyromonas gingivalis* tem demonstrado associação significativa à destruição periodontal em diferentes populações⁸⁻¹⁰. As fímbrias estão entre os principais fatores de virulência da *P. gingivalis*^{11,12}. A fímbria principal é codificada pelo gene *fimA* e está relacionada ao potencial patogênico da bactéria^{10,13}.

Além do fator microbiológico, a ocorrência e a progressão das doenças periodontais está relacionadas a fatores inerentes ao hospedeiro^{2,14}. Existe um crescente corpo de evidências que suporta o componente genético do indivíduo como um importante fator para a ocorrência e a progressão da periodontite¹⁴⁻¹⁶. Indivíduos

podem responder de forma diferente a desafios bacterianos e ambientais comuns, sendo essa resposta influenciada pelo seu perfil genético(15). Diversas pesquisas têm associado variações genéticas, como polimorfismos, ao aumento da susceptibilidade ou severidade da doença periodontal(16).

Tendo em vista a importância do correto entendimento sobre a etiopatogênese da periodontite, possibilitando a identificação de indivíduos de risco e o seu diagnóstico e tratamento precoce e preciso, o objetivo da presente tese foi avaliar aspectos microbiológicos e genéticos dessa patologia, através da identificação do periodontopatógeno *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* e da identificação dos polimorfismos do gene gliceriltransferase e CDKN2BAS em pacientes com periodontite.

2 PROPOSIÇÃO

Esta tese de doutorado é apresentada em capítulos, tendo como objetivos:

Capítulo 1. Avaliar a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* e seus genótipos *fimA* em paciente com periodontite estágios III e IV graus B e C e relacioná-las aos dados clínicos periodontais.

Capítulo 2. Investigar os polimorfismos nos genes GLT6D1 e CDKN2B em indivíduos com periodontite estágios III e IV graus B e C, comparando-os entre si e com pacientes periodontalmente saudáveis.

3 CAPÍTULOS

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado, e permite a inserção de artigos científicos de autoria e coautoria do candidato. Por serem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa referente a este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 098/11 (anexo A) e nº 20/08 (anexo B). Assim sendo, esta tese de Doutorado é composta por capítulos, contendo artigos a serem submetidos para publicação em revistas científicas, conforme descrito na sequência.

CAPÍTULO 1 “ANÁLISE DE GENÓTIPOS *fimA* DE *Porphyromonas gingivalis* EM PACIENTES COM PERIODONTITE”. Richelle Soares RODRIGUES, Virginia Régia Souza da SILVEIRA, Rodrigo Otávio César RÊGO. Esse artigo será submetido à publicação no periódico Brazilian Oral Research.

CAPÍTULO 2 “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES GLT6D1 E CDKN2BAS EM PACIENTES COM PERIODONTITE”. Richelle Soares RODRIGUES, Virginia Régia Souza da SILVEIRA, Raquel Mantuaneli SCAREL-CAMINAGA, Rodrigo Otávio Rêgo. Esse artigo será submetido à publicação no periódico Brazilian Oral Research.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DE GENÓTIPOS *fimA* DE *Porphyromonas gingivalis* EM PACIENTES COM PERIODONTITE

Especialidade: Periodontia

Autores:

Richelle Soares Rodrigues

richellerodrigues@gmail.com; (85) 988116351

Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza

Virgínia Régia Silveira

virginia50@gmail.com; (85) 999950066

Universidade Federal do Ceará(UFC) - Sobral

Rodrigo Otávio Citó César Rêgo*

rodrigorego@yahoo.com; (88) 36132803

Universidade Federal do Ceará(UFC) - Sobral

*Autor de correspondência: Rodrigo Otávio César Citó Rêgo

rodrigorego@yahoo.com; (88) 36132803

Rua Estanislau Frota s/n

Cep: 62011-000 ,Sobral, CE – Brasil

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e seu genótipos *fimA* I, Ib, II, III, IV e V em uma amostra de pacientes brasileiros com periodontite estágios III ou IV graus B e C; comparar a prevalência entre os pacientes com periodontite graus B e C; e relacionar a presença desses microorganismos aos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes estudados. Para isso, duas amostras de biofilme subgengival de 94 pacientes, sendo 40 pacientes grau B e 54 grau C, foram coletadas dos sítios interproximais com maior perda de inserção para, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), avaliar a presença de Pg e do genótipos *fimA*. Os parâmetros clínicos periodontais avaliados incluíram índice gengival, índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica. *P. gingivalis* mostrou-se presente em 61,96% das amostras. A prevalência de *P. gingivalis* foi maior nos pacientes com periodontite grau C ($p=0.048$), nos pacientes com maior média de perda de inserção clínica ($p<0.001$), profundidade de sondagem ($p<0.001$) e sangramento a sondagem ($p=0.01$) e nos sítios com maior destruição periodontal ($p=0.01$). O genótipo *fimA* II foi mais prevalente nos pacientes com maior média de profundidade de sondagem ($p=0.04$) e maior proporção de sítios sangrantes($p=0.006$). Dessa forma, na população brasileira estudada, a prevalência de *P. gingivalis* foi maior em pacientes com periodontite grau C e com maior destruição periodontal, assim como o genótipo *fimA* II parece estar relacionado à doença, observado através de maiores valores de profundidade de sondagem e sangramento à sondagem.

Palavras-chave: Periodontite. *Porphyromonas gingivalis*. Fímbrias bacterianas.

Introdução

Periodontite é uma patologia multifatorial associada à disbiose da placa bacteriana no ambiente subgingival e às respostas imunoinflamatórias do paciente¹⁻³. Atualmente, a periodontite é classificada em quatro estágios, I, II, III e IV, relacionados à gravidade da apresentação e à complexidade do tratamento da doença. Estágios III e IV são os casos mais graves. Além disso, pode ser classificada em graus A, B e C de acordo com a taxa de progressão da doença e a presença de fatores de risco³.

Diversos patógenos têm sido associados à destruição periodontal. *Porphyromonas gingivalis* é um periodontopatógeno do complexo vermelho descrito por Socransky⁴ comumente encontrado em bolsas periodontais de pacientes com periodontite⁵⁻¹⁰, mas também presente em alguns indivíduos periodontalmente saudáveis^{9,11,12}. Esse microorganismo exibe grande diversidade genotípica e fenotípica, resultando em variações na virulência e capacidade de induzir destruição periodontal¹¹.

Dentre os fatores de virulência de *P. gingivalis*, as fímbrias são as principais estruturas responsáveis por sua aderência a células epiteliais, fibroblastos, componentes salivares e colágeno, desempenhando um importante papel na colonização e invasão dos tecidos periodontais¹³. A fímbria principal é codificada pelo gene *fimA*, cujas variações alélicas estão relacionadas ao seu potencial patogênico e a diferentes condições periodontais^{9,11}.

De acordo com a sequência de nucleotídeos, são conhecidos seis genótipos do gene *fimA*: *fimA* I, Ib, II, III, IV e V^{14,15}. Diversos estudos relacionaram uma maior prevalência do genótipo *fimA* II, seguido pelos genótipos IV e Ib em pacientes com periodontite^{9,11,16,17}. Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes com peri-implantite, nos quais o genótipo *fimA* II foi o mais prevalente e o genótipo *fimA* Ib foi associado a uma maior profundidade de sondagem peri-implantar¹⁸. Além disso, um aumento na prevalência de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* II e IV foi observado com um aumento no índice gengival três meses após a colocação do aparelho ortodôntico em adolescentes¹⁹. Por outro lado, uma maior prevalência do genótipo *fimA* I foi encontrada em pacientes com gengivite crônica sem progressão para periodontite, sugerindo uma menor virulência desse genótipo²⁰.

Tendo em vista que a avaliação da presença de periodontopatógenos e sua relação com a apresentação clínica da doença podem contribuir para a identificação

de indivíduos em risco para o desenvolvimento e a progressão da periodontite, e que a distribuição de patógenos e seus genótipos podem ser influenciadas por localização geográfica e características étnicas de diferentes populações, o objetivo deste estudo foi: avaliar a prevalência de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* I, Ib, II, III, IV e V em pacientes brasileiros com periodontite estágios III ou IV graus B e C; comparar a prevalência de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* entre os pacientes com periodontite graus B e C; e relacionar a presença desses microorganismos aos parâmetros clínicos periodontais dos pacientes estudados.

Metodologia

Este estudo transversal foi realizado em 94 pacientes selecionados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética 20/08 (Anexo 1). Todos os participantes ou responsáveis foram informados sobre o objetivo do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

Os pacientes foram inicialmente divididos em pacientes com periodontite crônica ou com periodontite agressiva²⁸. No entanto, após a publicação dos novos critérios de classificação de periodontite em 2018³, foram reclassificados nos estágios I, II, III ou IV e graus A, B e C, de acordo com os dados registrados no exame clínico (Apêndice 2), como perda de inserção clínica, profundidade de sondagem, mobilidade dentária, envolvimento de furca, número de dentes remanescentes e perda óssea radiográfica. Além disso, padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ou doença de início precoce e a relação entre depósitos de placa e destruição periodontal foram usados para classificação nos graus A, B e C. Todos os pacientes apresentavam apenas estágios III e IV e graus B e C. Assim, foram divididos em dois grupos: periodontite estágio III ou IV grau B (grupo B) e periodontite estágio III ou IV grau C (grupo C). Os critérios de exclusão incluíram tratamento periodontal nos últimos seis meses, antibioticoterapia nos últimos três meses, tabagismo e alterações sistêmicas capazes de interferir na saúde periodontal.

Parâmetros clínicos

Todos os dentes permanentes totalmente erupcionados, exceto os terceiros molares, foram avaliados por meio de uma sonda periodontal (PCP-UNC 15, Trinity, São Paulo, SP, Brasil). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

índice de placa (IP)²¹, índice gengival (IG)²¹, profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (PIC), mobilidade dentária e envolvimento de furca. PS e PIC foram avaliadas em seis locais por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual). Um único examinador avaliou todos os parâmetros clínicos e a reprodutibilidade da medida foi calculada usando o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) para PS e PIC. A concordância entre as medidas replicadas foi alta (ICC > 0,80) (Apêndice 3).

Avaliação microbiológica

Placa supragengival foi removida com curetas ou pelotas de algodão estéreis e a área foi isolada com rolos de algodão estéreis. Amostras de placa subgengival foram coletadas em dois sítios não contíguos por paciente por meio da inserção de dois cones de papel estéreis (Dentsply Maillefer 35, Dentsply, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em cada sítio selecionado por 20 segundos. Foram selecionados os sítios proximais com maior PS e PIC de molares ou incisivos de cada paciente. As amostras foram imersas separadamente em microtubos contendo 1 mL de solução estéril de Ringer (8.6 g NaCl, 0.3 g KCl, 0.33 g CaCl₂.2H₂O em 1000 mL H₂O) e armazenadas a 80 °C negativos até serem processadas.

Cada amostra foi processada separadamente. As amostras foram descongeladas em gelo e as células bacterianas foram dispersas em vórtex e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min. O DNA genômico foi extraído do pellet de acordo com as instruções do fabricante (InstaGene Matrix, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante resultante foi adicionada a 30 µL de MIX de reação contendo 25 µM de tampão de PCR (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 25 µM de MgCl₂ (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 0.2 µM de mistura de dNTP (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 1.25 U de Taq polimerase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e 100 ng de cada primer (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), resultando em um volume final de 50 µL²². Controles positivos e negativos foram incluídos em cada reação (Tabela 1).

Inicialmente, foi realizada PCR com primers universais²³ para DNA ribossomal 16S (16S rADN) para confirmar a presença de DNA bacteriano na amostra. Posteriormente, as amostras foram avaliadas por PCR com primers específicos para a presença de *P. gingivalis*²⁴ e dos genótipos *fimA* I¹⁴, Ib¹⁵, II¹⁴, III²⁵, IV²⁵ e V²⁶. A amplificação foi realizada em termociclador Biocycler (Biosystems, Curitiba, PR, Brasil) e os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Os géis

foram corados com SYBR® Safe (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e fotografados (Canon Powershot A640, Canon, EUA) sob luz ultravioleta (LTA / LTB GE, Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). A PCR foi repetida três vezes para cada amostra e para cada genótipo.

Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Comparações de idade e dados clínicos entre os grupos B e C e entre pacientes positivos ou negativos para *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* foram analisadas pelo teste *t* para amostras independentes ou o teste de *Mann-Whitney*. O teste do qui-quadrado de Pearson foi realizado para comparar a prevalência dos genótipos de *P. gingivalis* e *fimA* entre os grupos B e C. O nível de significância foi determinado em 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA).

Resultados

Cinquenta pacientes foram classificados com periodontite estágio III e 44 pacientes foram classificados como estágio IV. Destes, 40 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau B e 54 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau C. Amostras de dois pacientes com periodontite grau B não amplificaram. Assim, o grupo B consistiu em 38 pacientes e o grupo C em 54 pacientes. A Tabela 2 mostra os dados demográficos e clínicos dos grupos B e C. Os pacientes do grupo C eram significativamente mais jovens e apresentavam maior número de dentes, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem que aqueles do grupo B.

P. gingivalis foi identificada em 61,96% do total de pacientes estudados. *P. gingivalis* mostrou-se significativamente mais prevalente no grupo C que no grupo B ($p=0.048$) e as diferenças entre os grupos na prevalência dos genótipos da *fimA* não mostram significância estatística (Tabela 3).

Os pacientes positivos para *P. gingivalis* apresentaram médias significativamente maiores de profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, perda de inserção clínica interproximal, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem e perda de inserção clínica nos sítios coletados que os pacientes negativos para *P. gingivalis*. Além disso, os pacientes que apresentaram genótipo *fimA* II apresentaram maiores médias de profundidade de sondagem e sangramento à

sondagem. Observou-se, ainda, que entre os pacientes positivos para *P. gingivalis*, a proporção de sítios selecionados para a coleta de placa subgengival com PS maior ou igual a 7 e a 8 mm e PIC maior ou igual a 8 mm foi significativamente maior que naqueles que não apresentaram *P. gingivalis* (Tabela 4). Para os demais genótipos *fimA*, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação aos dados clínicos (dados não apresentados).

Discussão

Este estudo foi previamente desenhado para comparar genótipos *fimA* de *P. gingivalis* entre pacientes com periodontite crônica e agressiva. No entanto, em 2018, o *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions* sugeriu que as evidências atuais são insuficientes para considerar periodontite agressiva e crônica como duas doenças fisiopatologicamente distintas^{3,27}. De acordo com o novo sistema de classificação, a periodontite não é mais subdividida em crônica e agressiva, mas é classificada em estágios e graus que descrevem sua apresentação utilizando parâmetros clínicos específicos e outros elementos que afetam o manejo clínico, prognóstico e possíveis influências na saúde bucal e sistêmica^{3,27}.

Todos os indivíduos foram reclassificados como periodontite estágio III ou IV, pois todos apresentavam perda de inserção interproximal ≥ 5 mm e profundidade de sondagem ≥ 6 mm. Grau de mobilidade dentária ≥ 2 , envolvimento de furca classe II ou III, número de dentes remanescentes e perda óssea radiográfica também foram analisados para classificar esses pacientes em estágio III ou IV^{3,27}.

Este é um estudo transversal, portanto não dispomos de dados de evidência direta sobre progressão da doença. No entanto, evidências indiretas de progressão foram utilizadas para classificação nos graus A, B e C. Tabagismo e doenças sistêmicas não foram utilizados por serem critérios de exclusão do estudo. Como nenhum paciente apresentou grandes depósitos de biofilme dentário com baixos níveis de destruição periodontal, os pacientes foram classificados apenas em graus B e C. Quando observada grande destruição periodontal com baixos índices de placa e padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão ou início precoce, como padrão incisivo/molar, os pacientes foram classificados como grau C. Já quando a destruição periodontal era compatível com a presença de biofilme dentário e não havia evidência específica para os graus A ou C, foram classificados

como grau B³.

Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o grau, pois enquanto os estágios dependem da gravidade e extensão da doença no momento do exame, os graus fornecem informações sobre características biológicas da doença distintas entre os pacientes, analisando, entre outros fatores, padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ou doença de início precoce, bem como a relação entre depósitos de placa e destruição periodontal^{3,27}, similarmente ao que antes era associado à periodontite agressiva^{28,29}.

O grupo B apresentou média de idade maior e número médio de dentes menor que o grupo C. Apesar da menor média de idade, o grupo C apresentou maior média de sangramento à sondagem, sugerindo uma doença mais grave nesses pacientes. Esse achado pode estar relacionado ao fato de que o grupo C era composto por pacientes com padrões de destruição mais graves e sugestivos de períodos de progressão rápida e doença de início precoce, principalmente pacientes diagnosticados anteriormente com periodontite agressiva.

Nossos resultados mostram uma alta prevalência de *P. gingivalis* associada à periodontite nos estágios III e IV, especialmente em pacientes grau C. Existe uma grande variabilidade na prevalência de *P. gingivalis* entre os estudos já publicados em diferentes populações^{7,11,17,30}. No entanto, nossos resultados mostraram-se similares ao resultado de uma metanálise de 42 estudos de caso-controle publicada recentemente, que evidenciou uma prevalência de 78,7% de *P. gingivalis* na doença periodontal³¹. Ao se comparar os grupos B e C, observamos uma prevalência estatisticamente maior de *P. gingivalis* no grupo C. Devido à atual classificação da periodontite em estágios e graus ser bastante recente, não encontramos dados específicos para comparação. Entretanto, a presença de *P. gingivalis* tem sido correlacionada com maiores profundidade de sondagem e destruição periodontal^{17,32}. Tal fato corrobora com o nosso achado, uma vez que o grupo C apresentou profundidade de sondagem média superior ao do grupo B, assim como foi observado maior proporção de sítios coletados com PS e PIC superior ou igual a 8 mm nos pacientes que apresentaram *P. gingivalis*.

Entre as amostras com presença de *P. gingivalis*, o genótipo *fimA* II foi o mais prevalente tanto no grupo B (84.2%) quanto no grupo C (92.1%). Essa alta prevalência foi similar ao resultado encontrado anteriormente em população brasileira similar com periodontite agressiva⁵. No entanto, mostrou-se superior a diversos outros

estudos em pacientes com periodontite crônica e agressiva em diversas populações, como japoneses^{9,25}, alemães¹⁷ e mesmo brasileiros¹¹. Quando avaliados apenas pacientes com periodontite agressiva, com características semelhantes ao grupo C, a prevalência do genótipo *fimA* II mostrou-se também bastante superior ao encontrado em indivíduos japoneses⁷ e chineses³⁰. Esses resultados sugerem uma maior presença e importância do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* para o desenvolvimento de periodontite em suas formas mais avançadas na população brasileira miscigenada estudada.

Apesar de ser observada uma maior prevalência do genótipo *fimA* II e menor prevalência do *fimA* I no grupo C que no grupo B, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Essa tendência é evidenciada em diversos outros estudos, em que o genótipo *fimA* II é constantemente associado ao aumento da virulência e maior destruição periodontal^{5,7,9,11,17,30}, enquanto o genótipo *fimA* I é mais associado a uma menor virulência e a pacientes saudáveis^{9,30}. Tendo em vista que o grupo C é composto principalmente por pacientes anteriormente diagnosticados com periodontite agressiva, nossos resultados corroboram com achados encontrados em japoneses e chineses com periodontite agressiva^{7,30}. A ausência de diferença estatística em relação aos genótipos entre os grupos pode dever-se ao fato de que ambos apresentam doença periodontal avançada estágios III e IV e à ausência de um grupo de pacientes saudáveis. Além da alta prevalência de *P. gingivalis* e do genótipo *fimA* II, também foram observados parâmetros clínicos periodontais mais graves, incluindo valores mais elevados de média profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, nos pacientes que apresentam essa bactéria e o seu genótipo *fimA* II.

O genótipo *fimA* II está relacionado com evolução da doença periodontal³³. Esse genótipo apresenta maior capacidade de aderir e invadir células epiteliais humanas que os demais¹³ e maior capacidade de indução de resposta inflamatória³⁴⁻³⁶. Sugere-se, assim, que o genótipo *fimA* II é um importante fator relacionado à virulência de *P. gingivalis* nos tecidos periodontais³³⁻³⁶. A avaliação da presença desse genótipo pode ser utilizada para a identificação de indivíduos de risco, para escolha de planos de tratamento e para avaliação do prognóstico da doença. A partir desse conhecimento, pode-se ainda sugerir novas estratégias de tratamento, como proposto por Hijiya e colaboradores, que desenvolveram um método de imunização passiva através de anticorpo monoclonal em ratos a partir de cepas de *P. gingivalis fimA* II³⁷.

Como conclusão deste trabalho, temos que, na presente amostra de

pacientes brasileiros com periodontite estágios III e IV, a prevalência de *P. gingivalis* foi maior nos pacientes que apresentavam grau C e naqueles com sítios com maior destruição periodontal avaliado por perda de inserção clínica, profundidade de sondagem e sangramento a sondagem. Já a presença do seu genótipo *fimA* II foi maior naqueles com maior média de profundidade de sondagem e maior proporção de sítios sangrantes.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq (478161/2007-7) e pela CAPES (PROCAD NF 2313/2008). Os autores gostariam de agradecer ao grupo de Microbiologia Oral do Centro Acadêmico de Odontologia de Amsterdã (ACTA) pelo fornecimento de cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

Referências

1. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40(1):144–63.
2. Kinane, D.F.; Shiba HHTC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;39:91–117.
3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis : Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Março):162–70.
4. Socransky SS, Haffajee a D, Cugini M a, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
5. Rodrigues RS, Tahim CM, Silveira VR, Nogueira NAP, Rego RO. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* II genotype in generalized aggressive periodontitis patients. *Brazilian J Oral Sci*. 2016;15(3):176–80.
6. Casarin RC V, Del Peloso Ribeiro E, Mariano FS, Nociti FH, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2010;45(5):635–42.
7. Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2005;40(2):147–52.

8. Da Silva-Boghossian CM, Do Souto RM, Luiz RR, Colombo APV. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 2011;56(9):899–906.
9. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. *J Dent Res.* 2000;79(9):1664–8.
10. Fabrizi S, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Variability of the fimA gene in *porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(1): 100-5.
11. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MPA. Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(4):224–9.
12. Zhao L, Wu YF, Meng S, Yang H, OuYang YL, Zhou XD. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. *J Periodontal Res.* 2007;42(6):511–7.
13. S. Hamada, A. Amano, S. Kimura, I. Nakagawa, S. Kawabata IM. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13:129–38.
14. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fim A genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1426–30.
15. Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, et al. Identification of a new variant of fimA gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2002;37(6):425–32.
16. Tamura K, Nakano K, Nomura R, Miyake S, Nakagawa I, Amano A, Ooshima T. Distribution of. *Microbiology.* 2005;61(11):4128–30.
17. Beikler T, Peters U, Prajaneh S, Prior K, Ehmke B FT. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Caucasians. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:390–4.
18. Kim SG, Hong JY, Shin S II, Moon JH, Lee JY, Herr Y. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fima genotypes in periimplant sulcus of koreans using new primer. *J Periodontal Implant Sci.* 2016;46(1):35–45.
19. Pan S, Liu Y, Si Y, Zhang Q, Wang L, Liu J, et al. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in adolescent orthodontic patients. *PLoS One.* 2017;12(11):1–11.
20. Krishnan M, Krishnan P, Chandrasekaran SC. Detection of *Porphyromonas gingivalis* fimA type I genotype in gingivitis by real-time PCR-A pilot study. *J Clin*

Diagnostic Res. 2016;10(6):ZC32-ZC35.

21. Ainamo J BI, The. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229–35.
22. Régia V, Silveira S, Mantuaneli R. Analysis of polymorphisms in Interleukin 10, NOS2A and ESR2 genes in chronic and aggressive periodontitis. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1–11.
23. Wilsonl KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1942–6.
24. Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2674–8.
25. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Strains with *fimA* Genotypes in Periodontitis Patients. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1426–30.
26. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK. Distribution and Molecular Characterization of *Porphyromonas gingivalis* Carrying a New Type of *fimA* Gene Distribution and Molecular Characterization of *Porphyromonas gingivalis* Carrying a New Type of *fimA* Gene. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1909–14.
27. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis : Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20-s):149–61.
28. American Academy of Periodontology. Parameter on Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2000;71(5-s):867–9.
29. Brito LF, Taboza ZA, Silveira VR, Furlaneto FA, Rosing CK, Rego RO. Aggressive periodontitis presents a higher degree of bilateral symmetry in comparison with chronic periodontitis. *J Oral Sci.* 2018;60(1):97–104.
30. Feng XH, Zhang L, Xu L, Meng HX, Lu RF, Chen ZB, et al. Detection of Eight Periodontal Microorganisms and Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* Genotypes in Chinese Patients With Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2014;85(1):150–9.
31. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri K, Sayehmiri F, Tavirani M, Dousti M. Prevalence of Anaerobic Bacteria (*P. gingivalis*) as Major Microbial Agent in the Incidence Periodontal Diseases by Meta-analysis. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* 2018;19(3):232–42.
32. Chigasaki O, Takeuchi Y, Aoki A, Sasaki Y, Mizutani K, Aoyama N, et al. A cross-sectional study on the periodontal status and prevalence of red complex

periodontal pathogens in a Japanese population. *J Oral Sci.* 2018;60(2):293–303.

33. Puig-Silla M, Montiel-Company JM, Dasí-Fernandez F, Almerich-Silla JM. Prevalence of periodontal pathogens as predictor of the evolution of periodontal status. *Odontology.* 2016;105(4):467–76.

34. Nakano K, Kuboniwa M, Nakagawa I, Yamamura T, Nomura R, Okahashi N. Comparison of inflammatory changes caused by *Porphyromonas gingivalis* with distinct fimA genotypes in a mouse abscess model. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:205-9.

35. Gao L, Xu Y, Meng S, Wu Y, Huang H, Su R, et al. Identification of the Putative Specific Pathogenic Genes of *Porphyromonas gingivalis* with Type II Fimbriae. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):1027–37.

36. Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, et al. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell Microbiol.* 2007;9(3):753–65.

37. Hijjiya T, Shibata Y, Hayakawa M, Abiko Y. A Monoclonal Antibody Against FimA Type II *Porphyromonas gingivalis* Inhibits IL-8 Production. *Hibrydoma.* 2010;29(3):201–4.

Tabelas

Tabela 1. Referência de cepas utilizadas como grupo controle positivo.

Tipo Clonal	Cepa
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277
<i>fim A</i> – Tipo I	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277
<i>fim A</i> – Tipo Ib	<i>P. gingivalis</i> HG1691
<i>fim A</i> – Tipo II	<i>P. gingivalis</i> HW24D-1
<i>fim A</i> – Tipo III	<i>P. gingivalis</i> 6/26
<i>fim A</i> – Tipo IV	<i>P. gingivalis</i> HG564
<i>fim A</i> – Tipo V	<i>P. gingivalis</i> HNA99

Tabela 2. Dados demográficos e parâmetros clínicos dos pacientes.

	Grupo B	Grupo C	Valor p
N	38	54	-
Idade (anos; média ± DP)	41.82 ± 8.49	27.94 ± 6.15	<0.001*
Homem/ Mulher	16/ 22	20/ 34	0.62
Branco/ Negro+mulato/ Pardo	11/ 0/ 27	11/ 06/ 37	0.85
Número de dentes (média ± DP)	23.32 ± 3.17	25.94 ± 1.89	<0.001*
PS (mm; média ± DP)	2.90 ± 0.64	3.42 ± 0.68	<0.001*
PIC (mm; média ± DP)	3.54 ± 1.04	3.81 ± 0.89	0.17
SS (% sítios; média ± DP)	33.46 ± 17.07	45.00 ± 16.67	0.02*
PS (SC 1) (mm; média ± DP)	7.71 ± 2.09	8.42 ± 2.18	0.12
PIC (SC 1) (mm; média ± DP)	8.79 ± 2.41	9.31 ± 2.48	0.31
PS (SC 2) (mm; média ± DP)	6.60 ± 1.53	7.28 ± 2.06	0.09
PIC (SC 2) (mm; média ± DP)	7.31 ± 1.72	8.02 ± 2.54	0.14

PS: profundidade de sondagem; PIC: perda de inserção clínica; SS: sangramento à sondagem; SC: sítio coletado.

Tabela 3. Prevalência de *P. gingivalis* e seus genótipos *fimA* nos grupos B e C.

	Grupo B	Grupo C	p
Pg	19 (50.0%)	38 (70.4%)	0.048*
FimA I	6 (31.6%)	6 (15.8%)	0.17
FimA Ib	6 (31.6%)	7 (18.4%)	0.26
FimA II	16 (84.2%)	35 (92.1%)	0.36
FimA III	1 (5.3%)	1 (2.6%)	0.61
FimA IV	1 (5.3%)	0 (0.0%)	0.15
FimA V	0 (0.0%)	1 (2.6%)	0.48

Tabela 4. Dados clínicos relacionados à presença ou ausência de *P. gingivalis* e genótipo *fimA II*.

	<i>Pg</i> +	<i>Pg</i> -	p	<i>fimA II</i> +	<i>fimA II</i> -	p
N	57	35		51	6	
Idade (anos; média ± DP)	33.93 ± 9.50	33.25 ± 10.70	0.67 ^B	33.50 ± 9.15	37.70 ± 12.51	0.31 ^B
PS (mm; média ± DP)	3.40 ± 0.69	2.89 ± 0.65	<0.001 ^{*A}	3.47 ± 0.67	2.72 ± 0.46	0.04 ^{*A}
PIC (mm; média ± DP)	4.00 ± 0.98	3.21 ± 0.70	<0.001 ^{*A}	4.04 ± 0.97	3.70 ± 0.12	0.36 ^A
PIC interproximal (mm; média ± DP)	4.63 ± 1.22	3.64 ± 0.87	<0.001 ^{*A}	4.62 ± 1.15	4.80 ± 1.87	0.83 ^A
PS SC (mm; média ± DP)	8.03 ± 1.96	6.81 ± 1.34	0.01 ^{*A}	8.16 ± 2.00	6.92 ± 1.16	0.14 ^B
PIC SC (mm; média ± DP)	8.98 ± 2.15	7.48 ± 1.65	0.01 ^{*B}	9.04 ± 2.21	8.50 ± 1.52	0.57 ^B
SS (% sítios; média ± DP)	44.65 ± 16.83	32.30 ± 16.61	0.01 ^{*A}	46.80 ± 16.47	27.10 ± 6.40	0.006 [*]
Proporção PS SC ≥ 7 mm	67.2%	44.4%	0.029 ^{*C}	67.3%	66.7%	0.975 ^C
Proporção PIC SC ≥ 7 mm	77.6%	63.9%	0.149 ^C	76.9%	83.3%	0.721 ^C
Proporção PS SC ≥ 8 mm	50.0%	27.8%	0.034 ^{*C}	51.9%	33.3%	0.389 ^C
Proporção PIC SC ≥ 8 mm	69.0%	41.7%	0.009 ^{*C}	69.2%	66.7%	0.898 ^C

PS: profundidade de sondagem; PIC: perda de inserção clínica; SS: sangramento à sondagem; SC: sítio coletado; *Pg* +: presença de *Porphyromonas gingivalis*; *Pg* -: ausência de *Porphyromonas gingivalis*; *fimAII* +: presença do genótipo *fimA II*; *fimA II* -: ausência do genótipo *fimA II*.

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$)

^A Teste *Mann-Whitney*

^B Teste *t*

^C Teste qui-quadrado

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES GLT6D1 E CDKN2BAS EM PACIENTES COM PERIODONTITE

Especialidade: Periodontia

Autores:

Richelle Soares Rodrigues

richellerodrigues@gmail.com; (85) 988116351

Universidade Federal do Ceará(UFC) – Fortaleza

Virgínia Régia Silveira

virginia50@gmail.com; (85) 999950066

Universidade Federal do Ceará (UFC) - Sobral

Raquel Mantuaneli SCAREL-CAMINAGA

scarelcaminaga@gmail.com; (16) 997050235

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Araraquara

Rodrigo Otávio Citó César Rêgo*

rodrigorego@yahoo.com; (88) 36132803

Universidade Federal do Ceará(UFC) - Sobral

*Autor de correspondência: Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

rodrigorego@yahoo.com; (88) 36132803

Rua Estanislau Frota s/n

Cep: 62011-000, Sobral, CE – Brasil

Resumo

Polimorfismos genéticos podem modificar a doença periodontal. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) rs153745 (GLT6D1) e rs3217992 (CDKN2BAS) foram associadas a formas agressivas de doença periodontal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença dos SNPs nos genes GLT6D1 e CDKN2BAS em pacientes brasileiros com as formas mais avançadas de periodontite, incluindo estágios III e IV e graus B e C, e comparar suas frequências com indivíduos saudáveis. Amostras de DNA foram obtidas a partir de células epiteliais bucais para a análise dos polimorfismos genéticos utilizando reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Foram avaliados SNPs nos genes GLT6D1 (rs1537415) e CDKN2BAS (rs3217992). Cinquenta e um pacientes foram classificados com periodontite estágio III e 49 pacientes foram classificados como estágio IV, totalizando 100 paciente com doença periodontal(Grupo BC). Destes, 52 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau B(Grupo B) e 48 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau C(Grupo C). O grupo Controle foi composto de 61 pacientes saudáveis. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência dos polimorfismos encontrada entre o grupo Controle e os grupos BC, B e C, nem entre os grupos B e C. Dessa forma, sugere-se que os polimorfismos analisados não apresentam relação com a doença periodontal na população brasileira estudada.

Palavras-chave: Periodontite. Polimorfismo genético. Polimorfismo de nucleotídeo único.

Introdução

Periodontite é uma doença inflamatória associada a presença de patógenos¹, cujo fenótipo se encontra determinado tanto pela composição genética do indivíduo como por influências ambientais². Atualmente, é classificada em 4 estágios, que estão relacionados à severidade de apresentação e à complexidade de tratamento da doença, e em graus A, B e C, de acordo com a taxa de progressão da doença e a presença de fatores de risco¹.

A destruição dos tecidos periodontais encontra-se relacionada com uma cascata de eventos biológicos que incluem a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas³, que podem ser influenciados por fatores ambientais, como o hábito de fumar, por fatores sistêmicos, como a presença de diabetes, assim como por fatores genéticos⁴. Estudos com humanos e animais indicam que fatores genéticos que prejudicam respostas imunes e inflamatórias podem modificar a experiência de doenças periodontais⁴.

Polimorfismos genéticos são pequenas variações normais na sequência de nucleotídeos que podem ocorrer dentro ou fora de um gene e encontram-se espalhados no genoma⁴. As variações mais comuns envolvem uma única base no DNA e são chamadas SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo único), que podem ou não apresentar efeito no fenótipo expresso^{4,5}. Durante uma resposta inflamatória a um determinado agente, certos polimorfismos podem aumentar ou diminuir o risco de uma pessoa para um fenótipo de uma determinada doença⁴. Os fatores genéticos associados à periodontite ainda não estão completamente elucidados, entretanto diversos genes tem sido relacionados com formas agressivas de periodontite através de estudos de GWAS (Estudo de associação do genoma inteiro, do inglês Genome Wide Association Studies), um método com grande poder de identificação de variantes genéticas associadas a um risco elevado de desenvolvimento de uma determinada doença, assim como através de estudos de gene candidato⁶⁻¹¹.

Há um crescente corpo de evidências de associação entre polimorfismos nos genes CDKN2BAS⁶⁻⁹ e GLT6D1^{10,11} e a doença periodontal em algumas populações, no entanto maiores evidências são necessárias, bem como estudos na população brasileira.

Tendo em vista a importância do entendimento sobre a etiopatogênese da periodontite, possibilitando a identificação de indivíduos de risco e seu diagnóstico

precoce, e a possibilidade de variação de distribuição de genótipos entre populações, nos propomos, neste trabalho, a avaliar a presença dos polimorfismos dos genes GLT6D1 e CDKN2BAS em pacientes com as formas mais avançadas de periodontite, incluindo estágios III e IV e graus B e C, e comparar suas frequências com indivíduos saudáveis.

Metodologia

Este estudo transversal foi realizado em 161 pacientes selecionados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (Anexo 2). Todos os participantes ou responsáveis foram informados sobre o objetivo do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

População do estudo

Os sujeitos da pesquisa com doença periodontal foram inicialmente divididos em pacientes com periodontite crônica ou com periodontite agressiva¹⁶. No entanto, após a publicação dos novos critérios de classificação de periodontite em 2018¹, foram reclassificados nos estágios I, II, III ou IV e graus A, B e C, de acordo com os dados registrados no exame clínico (Apêndice 2), como perda de inserção clínica, profundidade de sondagem, mobilidade dentária, envolvimento de furca, número de dentes remanescentes e perda óssea radiográfica. Além disso, padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ou doença de início precoce e a relação entre depósitos de placa e destruição periodontal foram usados para classificação nos graus A, B e C. Todos os pacientes apresentavam apenas estágios III ou IV e graus B e C. Assim, foram divididos em três grupos: periodontite estágio III ou IV com grau B (grupo B), periodontite estágio III ou IV com grau C (grupo C) e periodontite estágio III ou IV grau B ou C (grupo BC).

O grupo de pacientes saudáveis (grupo Controle) incluiu indivíduos com pelo menos 24 dentes na cavidade bucal, exceto terceiros molares, ausência de sítios com profundidade de sondagem e perda de inserção clínica maior ou igual a 3 mm e presença de índice gengival¹² menor que 10%.

Os critérios de exclusão incluíram tratamento periodontal nos últimos 6 meses, antibioticoterapia nos últimos 3 meses, tabagismo e alterações sistêmicas capazes de interferir na saúde periodontal.

Exame clínico periodontal

Todos os dentes permanentes completamente erupcionados, exceto os terceiros molares, foram avaliados por meio de uma sonda periodontal (PCP-UNC 15, Trinity, São Paulo, SP, Brasil). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa (IP)¹², índice gengival (IG)¹², profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (PIC), mobilidade dentária e envolvimento de furca. PS e PIC foram avaliadas em seis locais por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual). Um único examinador avaliou todos os parâmetros clínicos e a reprodutibilidade da medida foi calculada usando o coeficiente de correlação intraclasses (ICC) para PS e PIC. A concordância entre as medidas replicadas foi alta (ICC > 0,80) (Apêndice 3).

Coleta de DNA e análise de polimorfismo genético

DNA foi obtido a partir de células epiteliais bucais com bochecho de solução de glicose 3%¹³ (Apêndice 4) e extraído com acetato de amônio¹⁴ (Apêndice 5). A concentração de DNA foi determinada com auxílio de um espectrofotômetro - Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, DE, EUA), com pureza estimada pela razão OD 260/280 e diluída para 10ng/μl. A análise dos polimorfismos genéticos foi realizada utilizando reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Os SNPs no gene GLT6D1 (rs1537415) e CDKN2BAS (rs3217992) foram genotipados utilizando ensaios de genotipagem TaqMan SNP pré-concebidos (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A amplificação do DNA foi realizada em um volume de 13 μl contendo 1μL de DNA genômico (10ng/μl), 6,25μL de Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0,63μL 20x TaqMan Assay Mix (Applied Biosystems) e 4,63μL de água livre de RNA/DNase (Applied Biosystems) (Apêndice 6).

As amplificações foram realizadas em um sistema de PCR em tempo real StepOne (Applied Biosystems) em placas de 96 poços. A distinção entre os diferentes genótipos foi determinada pela sua fluorescência particular. A análise dos polimorfismos foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP-SP.

Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Comparações de idade entre os grupos foram analisadas pelos teste Anova e teste pos-hoc de *Tukey*. Os dados clínicos foram avaliados pelo teste *t* para amostras independentes ou pelo teste de *Mann-Whitney*. O teste do qui-quadrado foi

utilizado para análise dos dados categóricos. A distribuição de cada polimorfismo em cada grupo foi testada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as diferenças nas frequências de alelos e genótipos dos polimorfismos genéticos foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. A análise estatística foi realizada com a utilização do software SPSS 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). O nível de significância foi determinado em 5%.

Resultados

Cinquenta e um pacientes foram classificados com periodontite estágio III e 49 pacientes foram classificados como estágio IV, totalizando 100 paciente com doença periodontal (Grupo BC). Destes, 52 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau B e 48 indivíduos foram classificados como pacientes com periodontite grau C. Amostras de 3 pacientes de cada grupo não amplificaram para análise do SNP rs3217992 e 1 amostra de cada grupo não amplificou para o SNP RS1537415. O grupo Controle foi composto de 61 pacientes saudáveis, porém 7 amostras não amplificaram para o SNP rs3217992. A tabela 1 apresenta os dados demográficos e clínicos dos grupos. Foi observado que os pacientes do grupo Controle apresentaram média de idade similar aos pacientes do grupo C, porém ambos significativamente menor que os do grupo B. Além disso, o grupo C apresentou maior média de profundidade de sondagem, de perda de inserção clínica nos sítios interproximais, de sangramento a sondagem e de dentes com perda de inserção maior ou igual a 5 mm que o grupo B. Estes resultados são similares para os dois genes investigados.

A frequência de alelos e genótipos dos polimorfismos estudados nos genes GLT6D1 e CDKN2BAS estão expostos da tabela 2. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência encontrada entre os grupos que apresentavam doença periodontal e o grupo Controle (Tabela 2), nem entre os grupos B e C(Tabela 3).

Discussão

Este estudo foi originalmente realizado para comparar a presença de polimorfismos nos genes GTL6D1 (rs1537415) e CDKN2BAS (rs3217992) entre pacientes com periodontite crônica e agressiva. No entanto, após publicação de um novo sistema de classificação em 2018, a periodontite passou a não ser mais

subdividida em crônica e agressiva, mas classificada em estágios e graus que descrevem sua apresentação utilizando parâmetros clínicos específicos e outros elementos que afetam o manejo clínico, prognóstico e possíveis influências na saúde bucal e sistêmica^{1,15}.

Todos os indivíduos foram reclassificados como periodontite estágio III ou IV, pois todos apresentavam perda de inserção interproximal ≥ 5 mm e profundidade de sondagem ≥ 6 mm. Grau de mobilidade dentária ≥ 2 , envolvimento de furca classe II ou III, número de dentes remanescentes e perda óssea radiográfica também foram analisados para classificar esses pacientes em estágio III ou IV^{1,15}.

Não dispomos de dados de evidência direta sobre progressão da doença devido a ser este um estudo transversal, porém evidências indiretas de progressão foram utilizadas para classificação nos graus A, B e C. Tabagismo e doenças sistêmicas não foram utilizados por serem critérios de exclusão do estudo. Como nenhum paciente apresentou grandes depósitos de biofilme dentário com baixos níveis de destruição periodontal, os pacientes foram classificados apenas em graus B e C. Quando observada grande destruição periodontal com baixos índices de placa e padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão ou início precoce, como padrão incisivo/molar, os pacientes foram classificados como grau C. Já quando a destruição periodontal era compatível com a presença de biofilme dentário e não havia evidência específica para os graus A ou C, foram classificados como grau B¹.

A divisão dos grupos do estudo por graus deveu-se ao fato de, enquanto os estágios dependem da gravidade e extensão da doença no momento do exame clínico, os graus fornecem informações sobre características biológicas da doença analisando, entre outros fatores, padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ou doença de início precoce e a relação entre depósitos de placa e destruição periodontal^{1,15}, similarmente ao que anteriormente era associado à periodontite agressiva, em cujo foco este estudo se concentrava^{16,17}.

De acordo com as características apresentadas por pacientes com periodontite grau C, assim como aquelas anteriormente relacionadas à periodontite agressiva, parece haver uma resposta imunoinflamatória mais destrutiva em resposta aos patógenos periodontais nesses pacientes^{1,18,19}. Há evidências de que polimorfismos genéticos em genes envolvidos nas respostas imunoinflamatórias podem modificar a experiência de doenças periodontais^{2,4,20}.

A escolha dos genes GLT6D1 e CDKN2BAS deveu-se à demonstrada associação de polimorfismos nesses genes com a periodontite agressiva em estudos prévios em outras populações^{6,9-11}. Polimorfismo genético localizado no gene glicosiltransferase(GLT6D1) exibiu forte associação com a periodontite agressiva em GWAS a partir da análise de 1758 alemães e holandeses¹⁰. Esse estudo sugeriu que a variante rara do SNP rs1537415 pode estar associada à periodontite agressiva por levar a redução da afinidade de ligação do GATA-3, importante para o desenvolvimento, homeostase, ativação, proliferação e função de células T¹⁰. Similarmente, através de estudo de gene, foi encontrada associação entre a variante genética do gene GLT6D1 e a periodontite agressiva ao se avaliar 132 pacientes com a doença e 136 sem a doença em uma população sudanesa¹¹. Em contrapartida, em estudo com 200 brasileiros com periodontite agressiva e 190 com periodontite crônica, o SNP rs1537415 não apresentou significância estatística²¹. Esse resultado corrobora com os apresentados neste artigo e sugere que esse SNP, diferentemente do observado em outras populações, pode não ser relacionado à ocorrência de periodontite na população brasileira.

A escolha do gene CDKN2BAS como candidato para estudos com periodontite deve-se à confirmada associação de polimorfismos genéticos nesta região e doença cardíaca coronariana²². Diversas pesquisas tem associado doença periodontal a doenças cardiovasculares²³. Ambas são doenças complexas caracterizadas por desequilíbrio na resposta imunoinflamatória do indivíduo e podem compartilhar fatores de riscos ambientais e genéticos²³. CDKN2BAS é um gene de RNA não codificante cujas ações não estão completamente elucidadas²⁴. Há evidências de efeitos regulatórios a longa distância em genes importantes no metabolismo de glicose e ácidos graxos e na resposta imune (CAMTA1/VAMP3 locus, ADIPOR1 and C11ORF10)²⁴.

Estudo de Schaefer *et al*, em 2009⁶, foi o primeiro a relacionar polimorfismos no gene CDKN2BAS a periodontite agressiva, tanto na sua forma generalizada como localizada, em indivíduos alemães. Esse achado foi replicado para periodontite agressiva e crônica em outras populações europeias⁷. Foram identificados 51 SNPs no gene CDKN2BAS em amostras de população alemã e holandesa, tendo sido observada associação com os SNPs rs3217992, rs518394 e rs1360590, sendo o maior valor de significância encontrado para o SNP rs3217992⁷. Esses resultados foram replicados também em caucasianos da Alemanha e Irlanda

do Norte⁸, assim como em indivíduos turcos⁹, com associação significativa para SNP rs1333048, suportando a hipótese da associação entre polimorfismos no gene CDKN2BAS e a periodontite agressiva em diferentes populações, apesar de o variante causal e os mecanismos que regulam essa associação ainda não estarem bem esclarecidos. De forma contrastante, nossos resultados não encontraram associação estatisticamente significativa entre o SNP rs3217992 e a doença periodontal estágios III e IV graus B e C, nem separadamente entre graus B e C. Assim como o estudo em uma população brasileira publicado recentemente também não observou associação estatisticamente significativa entre esse polimorfismo e a periodontite agressiva²¹. Dessa forma, parece não haver associação entre o SNP rs3217992 do gene CDKN2BAS e a presença de doença periodontal avançada na população brasileira estudada.

A ausência de resultado estatisticamente significativo no presente estudo pode estar relacionada ao tamanho amostral. Entretanto, apesar de a quantidade de amostras avaliadas ser relativamente pequena para estudo genético, a escolha criteriosa da amostra, neste caso bem classificada clinicamente e englobando pacientes com fenótipos mais graves e doença de início precoce, pode aumentar o poder estatístico do estudo².

Assim, conclui-se que, na amostra brasileira estudada, os polimorfismos nos genes GLT6D1 (rs1537415) e CDKN2BAS (rs3217992) não apresentaram associação significativa com a periodontite estágios III e IV graus B e C quando comparados a pacientes saudáveis, nem apresentaram diferenças significativas entre os graus B e C.

Referências

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis : Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 2018;45:162–70.
2. Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: Relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. J Periodontal Res. 2014;49(6):683–95.
3. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE,

et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71:1699–707.

4. Kinane, D.F.; Shiba HHTC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;39:91–117.

5. Kinane DF, Hart TC. Genes and Gene Polymorphisms Associated with Periodontal Disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(6):430–49.

6. Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari NE, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet*. 2009;5(2):1–8.

7. Schaefer AS, Richter GM, Dommisch H, Reinartz M, Nothnagel M, Noack B, et al. CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. *J Med Genet*. 2011;48(1):38–47.

8. Ernst FD, Linden GJ, Homuth G, Kocher T. Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC Med Genet*. 2010;11:119.

9. Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, et al. Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(6):563–72.

10. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, et al. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet*. 2010;19(3):553–62.

11. Hashim NT, Linden GJ, Ibrahim ME, Gismalla BG, Lundy FT, Hughes FJ, et al. Replication of the association of GLT6D1 with aggressive periodontitis in a Sudanese population. *J Clin Periodontol*. 2015;42(4):319–24.

12. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975;25(4):229–35.

13. Trevilatto, PC; Line S. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J forensic odonto-stomatology*. 2000;18(1):6–9.

14. Aidar M, Line SRP. A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from Buccal Epithelial Cells. 2007;18:148–52.

15. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Pedriodontol*. 2018;45:149–61.

16. American Academy of Periodontology. Parameter on Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(5-s):867–9.

17. Brito LF, Taboza ZA, Silveira VR, Furlaneto FA, Rosing CK, Rego RO.

Aggressive periodontitis presents a higher degree of bilateral symmetry in comparison with chronic periodontitis. *J Oral Sci.* 2018;60(1):97–104.

18. Nibali L. Aggressive Periodontitis : microbes and host response, who to blame? *Virulence.* 2015;6(3):223–8.

19. Nibali L, Donos N, Henderson B. Periodontal infectogenomics. *J Med Microbiol.* 2009;58(10):1269–74.

20. Régia V, Silveira S, Mantuanelli R. Analysis of polymorphisms in Interleukin 10, NOS2A , and ESR2 genes in chronic and aggressive periodontitis. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1–11.

21. Taiete T, Casati MZ, Stolf CS, Coletta RD, Sallum EA, Corrêa R, et al. Validation of Reported GLT6D1 (rs1537415), IL10 (rs6667202), and ANRIL (rs1333048) single nucleotide polymorphisms for aggressive periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2019;90:44–51.

22. Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation.* 2008;117(13):1675–84.

23. Blaizot A, Vergnes JN, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M. Periodontal diseases and cardiovascular events: metaanalysis of observational studies. *Int Dent J.* 2009;59:197–209.

24. Bochenek G, Häsler R, Mokhtari NE El, König IR, Loos BG, Jepsen S, et al. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet.* 2013;22(22):4516–27.

Tabelas

Tabela 1. Dados demográficos e parâmetros clínicos.

	Controle	Grupo B	Grupo C
Gene GLT6D1 (SNP rs1537415)	N= 61	N=51	N=47
Idade (anos; média± DP)	28.1±10.0	43.2±9.1 ^{AB}	27.8±6.1
Sexo feminino proporção (%)	70.5	56.9	65.9
Número de dentes (média ± DP)	NA	22±5.1	26.0±1.9 ^B
IG (% sítios; média ± DP)	NA	35.5±14.9	33.2±12.1
IP (% sítios; média ± DP)	NA	18.1±9.6	16.3±8.7
PS (mm; média ± DP)	NA	2.9±0.7	3.4±0.7 ^B
PIC (mm; média ± DP)	NA	3.6±1.1	3.8±0.9
PIC interproximal (mm; média ± DP)	NA	3.8±1.0	4.4±1.2 ^B
Proporção de dentes PIC ≥ 5 mm (média %)	NA	51.5	60.1
Proporção de sítios PS ≥ 5 mm (média %)	NA	15.7	24.6 ^B
Proporção de sítios PS ≥ 6 mm (média %)	NA	7.6	11.8 ^B
Proporção de sítios PS ≥ 7 mm (média %)	NA	4.4	7.1 ^B
Proporção de sítios PIC ≥ 5 mm (média %)	NA	32.7	30.6
Proporção de sítios PIC ≥ 6 mm (média %)	NA	14.6	18.9 ^B
Proporção de sítios PIC ≥ 7 mm (média %)	NA	10.7	13.2
SS (% sítios; média ± DP)	NA	31.4±15.5	43.8±16.0 ^B
Gene CDKN2BAS (SNP rs3217992)	N= 54	N=49	N=45
Idade (anos; média± DP)	27.6±1.0	43.5±9.0 ^{AB}	27.1±6.0
Sexo feminino proporção (%)	68.5	59.2	66.7
Número de dentes (média ± DP)	NA	22.0±5.2	26.1±1.9 ^B
IG (% sítios; média ± DP)	NA	35.4±14.6	32.0±12.2
IP (% sítios; média ± DP)	NA	17.7±9.4	16.5±8.9
PS (mm; média ± DP)	NA	2.8±0.7	3.3±0.6 ^B
PIC (mm; média ± DP)	NA	3.5±1.0	3.6±0.8
PIC interproximal (mm; média ± DP)	NA	3.8±1.0	4.4±1.2 ^B
Proporção de dentes PIC ≥ 5 mm (média %)	NA	50.5	59.2
Proporção de sítios PS ≥ 5 mm (média %)	NA	15.3	24.1 ^B
Proporção de sítios PS ≥ 6 mm (média %)	NA	7.5	11.8 ^B
Proporção de sítios PS ≥ 7 mm (média %)	NA	4.6	7.2
Proporção de sítios PIC ≥ 5 mm (média %)	NA	31.2	29.5
Proporção de sítios PIC ≥ 6 mm (média %)	NA	14.1	18.2 ^B
Proporção de sítios PIC ≥ 7 mm (média %)	NA	10.4	12.6
SS (% sítios; média ± DP)	NA	30.7±15.4	43.1±15.5 ^B

NA: não avaliado; PS: profundidade de sondagem; PIC: perda de inserção clínica;

SS: sangramento à sondagem; IP: índice de placa(31); IG: índice gengival(31).

^A p< 0.05 grupo B x grupo Controle

^B p< 0.05 grupo B x grupo C

Tabela 2. Frequência de alelos e genótipos polimorfismos nos genes GLT6D1 e CDKN2BAS. Comparação entre grupos doentes e Controle.

	Controle	%	B	%	p	C	%	p	BC	%	p
Gene GLT6D1 (rs1537415)	N= 61		N= 51			N= 47			N= 98		
Alelos											
C	46	37,7	34	33,3	0.5892	35	37,2	0.9435	69	35,20	0.7404
G	76	62,3	68	66,7		59	62,8		127	64,80	
Genótipos											
GG	22	36,1	21	41,2	0.7198	20	42,6	0.6265	41	41,84	0.8617
CG	32	52,4	26	51	0.8761	19	40,4	0.2467	45	45,92	0.4158
CC	7	11,5	4	7,8	0.7515	8	17	0.4179	12	12,24	0.6843
Hardy-Weinberg p	0,362		0,2936			0,4297			0.9487		
Gene CDKN2BAS (rs3217992)	N= 54		N= 49			N= 45			N= 94		
Alelos											
C	64	59,3	58	59,2	0.9912	61	67,8	0,2761	119	63,30	0.6187
T	44	44,7	40	40,8		29	32,2		69	36,70	
Genótipos											
CC	17	31,5	14	28,6	0.8310	17	37,8	0.5313	31	32,98	0.9933
CT	30	55,5	30	61,2	0.6894	27	60	0.6875	57	60,64	0.7383
TT	7	13	5	10,2	0.7638	1	2,2	0.0682	6	6,38	0.3820
Hardy-Weinberg p	0,2685		0,0614			0.0122*			0.0031*		

Tabela 3. Comparação da frequência de alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes GLT6D1 e CDKN2BAS entre grupos B e C.

Gene GLT6D1 (SNP)	B	C	p
GLT6D1 (rs1537415) alelos			
C	34	35	0.6734
G	68	59	
GLT6D1 (rs1537415) genótipos			
GG	21	20	0.8902
CG	26	19	0.3174
CC	4	8	0.2216
Hardy-Weinberg p	0.2936	0.3543	
CDKN2BAS (rs3217992) alelos			
C	58	61	0.2847
T	40	29	
CDKN2BAS (rs3217992) genótipos			
CC	14	17	0.3851
CT	30	27	1.0000
TT	5	1	0.2061
Hardy-Weinberg p	0.0614	0.0122	

4 CONCLUSÃO GERAL

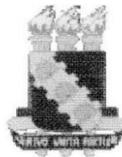
Na amostra estudada, a prevalência de *P. gingivalis* foi maior nos pacientes que apresentavam periodontite grau C que periodontite grau B, e nos sítios com maior destruição periodontal. O genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* foi mais prevalente nos pacientes com maior média de profundidade de sondagem e maior proporção de sítios sangrantes. Em relação aos polimorfismos nos genes GLT6D1 e CDKN2BAS, os SNPs rs1537415 e rs3217992 não apresentaram associação significativa aos grupos de pacientes com periodontite estágios III e IV graus B e C quando comparados entre si, nem quando comparados a pacientes periodontalmente saudáveis.

REFERÊNCIAS GERAIS

1. KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 40, p. 144–63, 2006.
2. KINANE, D. F.; SHIBA, H.; THOMAS, C. H. The genetic basis of periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 39, p. 91–117, 2005.
3. FLEMMING, T. F. Periodontitis. **Ann Periodontol**, v. 4, p. 32–7, 1999.
4. ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 9–21, 2004.
5. HAJAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 5, p. 78–111, 1994.
6. PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D. H.; et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. **J Clin Periodontol**, v. 45, p. 162–70, 2018.
7. TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **J Clin Periodontol**, v. 45, p. 149–61, 2018.
8. RAFIEI, M.; KIANI, F.; SAYEHMIRI, K.; SAYEHMIRI, F.; TAVIRANI, M.; DOUSTI, M. Prevalence of Anaerobic Bacteria (*P. gingivalis*,) as Major Microbial Agent in the Incidence Periodontal Diseases by Meta-analysis. **J Dent Shiraz Univ Med Sci**, v. 19, p. 232–42, 2018.
9. FENG, X. H.; ZHANG, L.; XU, L.; MENG, H. X.; LU, R. F.; CHEN, Z. B.; et al. Detection of Eight Periodontal Microorganisms and Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA Genotypes in Chinese Patients With Aggressive Periodontitis. **J Periodontol**, v. 85, p.150–9, 2014.
10. MISSAILIDIS, C. G.; UMEDA, J. E.; OTA-TSUZUKI, C.; ANZAI, D.; MAYER, M. P. A. Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 224–9, 2004.
11. AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; KATAOKA, K.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Strains with fimA Genotypes in Periodontitis Patients. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1426–30, 1999.
12. NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Functional Differences among FimA Variants of *Porphyromonas gingivalis* and Their Effects on Adhesion to and Invasion of Human Epithelial Cells. **Infect Immun**, v. 70, p. 277–85, 2002.

13. AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; AKIYAMA, S.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. **J Dent Res**, v. 79, p. 1664–8, 2000.
14. MICHALOWICZ, B. S.; DIEHL, S. R.; GUNSOLLEY, J. C.; SPARKS, B. S.; BROOKS, C.N.; KOERTGE, T.E.; et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 71, p. 1699–707, 2000.
15. KINANE, D. F.; HART, T. C. GENES AND GENE POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASE. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, p. 430–49, 2003.
16. VAITHILINGAM, R. D.; SAFII, S. H.; BAHARUDDIN, N. A.; NG, C. C.; CHEONG, S. C.; BARTOLD, P. M., et al. Moving into a new era of periodontal genetic studies: Relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. **J Periodontal Res.**, v. 49, p. 683–95, 2014.

ANEXO A – PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA ARTIGO 1



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 133/08

Fortaleza, 14 de março de 2008

Protocolo COMEPE nº 20/ 08

Pesquisador responsável: Virginia Régia Souza da Silveira

Deptº./Serviço: Departamento de Odontologia/ UFC

Título do Projeto: “Avaliação da presença de fatores de virulência de *aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes portadores de periodontite agressiva e seus familiares”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 13 de março de 2008.

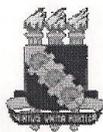
Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B – PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA ARTIGO 2



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 118/11

Fortaleza, 24 de Maio de 2011

Protocolo COMEPE nº 098/11

Pesquisador responsável: Virginia Régia Souza da Silveira.

Título do Projeto: “Análise de polimorfismo genético no promotor do gene interleucina-8 em portadores de periodontite crônica e agressiva”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 19 de maio de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,


Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

APÊNDICE 1 - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, _____ brasileiro(a), nascido(a) em ___/___/___, portador do RG nº _____ residente à _____, na cidade de _____, concordo com a minha participação voluntária, na pesquisa intitulada **“ANÁLISE DE POLIMORFISMO GENÉTICO NO PROMOTOR DO GENE *INTERLEUCINA-8* EM PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA E AGRESSIVA”** e declaro que fui informado e entendi, sem dúvida alguma, sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Esta pesquisa terá como objetivo estudar alguns polimorfismos genéticos (alterações em alguns pontos do DNA, que é a molécula que guarda nossas informações dentro da célula), ligados a doença periodontal, doença esta que causa alterações em gengiva e osso, e que podem levar à perda dos dentes.

- 2- Serei submetido a um exame clínico odontológico e radiográfico para verificar se possuo doença periodontal. Esses exames são necessários para auxiliar na classificação do tipo de doença periodontal que possuo e para futuras observações. Procedimentos que podem causar certo desconforto, mas não prejudiciais à minha saúde. Fui esclarecido que a realização da pesquisa não implica em risco algum para os participantes, pois o exame clínico a que serei submetido é um exame odontológico realizado com instrumentos devidamente esterilizados.

Telefones e endereço para qualquer esclarecimento:
Virginia Régia Souza da Silveira: (85) 3217-1392/9995-0066
FFOE-UFC / Rua Monsenhor Furtado s/n
Comitê de Ética FMUFC: (85) 3366 8338

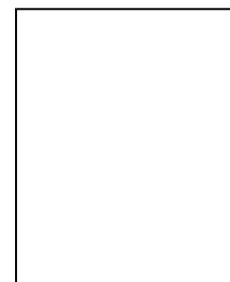
- 3- Serão coletadas células da parte interna da bochecha através de um bochecho com solução de glicose a 3% (um tipo de açúcar) autoclavada (solução estéril). Este procedimento também não gera risco ou desconforto à saúde do paciente.
- 4- Este tipo de pesquisa é importante porque contribuirá para avanços no conhecimento da história da doença periodontal que poderão contribuir para avanços futuros no tratamento desta doença.
- 5- Apresenta ainda como benefícios a detecção de doença periodontal e o encaminhamento para tratamento se for detectada doença, para a clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.
- 6- Estou ciente de que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas a esta e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização ou prejuízo no atendimento clínico.
- 7- Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de identidade, assegurando a privacidade.
- 8- Estou ciente que a participação na pesquisa não acarretará em nenhum gasto, a não ser aqueles de deslocamento até a Faculdade, uma vez que todo material utilizado será fornecido pelo pesquisador.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Consentimento do paciente

Virgínia Régia Souza da Silveira
Pesquisador responsável



APÊNDICE 2 – FICHA CLÍNICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**

Número: _____

Nome: _____

Cor: _____

Sexo: M F

Data de nascimento: _____ Idade: _____ Profissão: _____

Residência: _____

Cidade: _____ Fone: _____

Estado Civil _____ Data do Exame: _____

Responsável: _____

HISTÓRICO GERALEstá em tratamento médico? SIM NÃO Motivo: _____

Doenças sistêmicas _____

Usa ou usou medicamentos recentemente? SIM NÃOSensibilidade a medicamentos? SIM NÃO

Gravidez / lactação: _____

Fuma? SIM NÃO ex-fumante _____OBSERVAÇÕES:

HISTÓRICO BUCAL

Já fez tratamento periodontal: SIM NÃO Quando: _____

Como escova os dentes? _____ Freqüência: _____

Tipo de escova: _____ Tipo de dentifrício: _____

Usa fio dental? SIM NÃO Freqüência: _____

Meios auxiliares de higiene oral? _____

Antisséptico bucal? SIM NÃO _____

DIAGNÓSTICO:**OBSERVAÇÕES:**

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IP:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IG:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

.....

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IP:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IG:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

.....

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IP:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

.....
18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28
☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

DATA: / /

☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒ ☒

IG:

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

APÊNDICE 3 - CALIBRAÇÃO

Foram realizados dois momentos de calibração, um antes do início do estudo e outro durante. Para tanto em cada momento seis pacientes apresentando quadro de periodontite crônica e agressiva foram submetidos a dois exames clínicos periodontais, em intervalo de três dias, sendo analisados a profundidade de sondagem e o nível de inserção clínico. Os dados estão dispostos na tabela abaixo:

Tabela 8 – Valores de correlação intraclasse de profundidade de sondagem (PS) e de nível de inserção clínico (NIC) entre os dois exames.

n	Dentes (média)	CCIC PS	CCIC NIC
6	20,8	0,80*	0,88*
6	20,5	0,86*	0,90*

**p < 0,0001*

CCIC- Coeficiente de correlação intraclasse

PS – Profundidade de sondagem

NIC – Nível de inserção clínico

APÊNDICE 4 – COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – COLETA DE SALIVA

No momento da coleta da saliva o coletor deve trajar luvas e máscara, para garantir o não contato das próprias células com o material do paciente. Deve pedir ao paciente para bochechar o conteúdo do tubo de falcon (3 ml de solução de glicose a 3%, autoclavada) com vigor por 2 minutos, esfregando a língua na mucosa para ajudar a desprender células do epitélio intra-bucal. Ele deve cuspir em um copinho de café descartável (o máximo possível). Delicadamente formar um “biquinho” no copinho de café e introduzir o líquido bochechado dentro do tubo de falcon. Fechar bem e anotar o nome do paciente ou os dados que o identificam no tubo.

Repetir o mesmo procedimento com outro tubo de falcon. Assim o paciente fará 2 bochechos. Recomendo passar filme de PVC em cada tubo de forma a não contaminá-lo com outros tubos. Levar os tubos com saliva para o laboratório. Pode-se manter os tubos dentro da geladeira, sem congelar, por no máximo 48 horas.

Antes de levar os tubos para a centrífuga, deve-se observar se os tubos estão com volume igual ou semelhante. Se houver muita diferença completar o volume com solução de glicose a 3% estéril (fazer de preferência em câmara de fluxo). Ajustar a centrífuga para 3000 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação despreza-se o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet de células. Verter os tubos sobre um guardanapo de papel, para escorrer o resto do sobrenadante (observar se o pellet não está escorrendo). Não misturar guardanapos de pacientes diferentes (os 2 tubos do mesmo paciente em um guardanapo).

Ao pellet de células contido no tubo de Falcon, acrescentar 500 µL de solução tampão de extração (fazer em câmara de fluxo, tomar cuidado para não deixar as coletas em contato com a luz UV). Cuidadosamente homogeneizar o conteúdo do tubo de falcon num agitador de tubos. Verter o pellet + a solução para um micro tubo (ependorf) de 1,5mL. Identificar o microtubo com os dados do paciente. Um microtubo para cada bochecho (para cada paciente 2 microtubos). Armazenar os microtubos a – 20 °C até o momento da extração de DNA.

Armazenar a solução de glicose e o tampão de extração (Tris 10 mM, EDTA

0,1M + SDS a 0,5% - pH = 8.0) em geladeira. A solução tampão de extração ficará turva na geladeira. Esperar esfriar em temperatura ambiente ou colocar por uns 10 a 30 segundos no microondas, evitando aquecer a solução, antes de utilizar. Evitar ao máximo a contaminação ou misturar tampas e conteúdo dos pacientes. Sempre trocar as luvas em caso de dúvida na contaminação.

APÊNDICE 5 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA COM ACETATO DE AMÔNIO

Protocolo para extração de DNA com Acetato de Amônia a partir de células da mucosa oral (bochecho)

1. Coletar um bochecho de 3 ml de dextrose a 3 % (pedir para o paciente esfregar a língua na mucosa oral para descamação eficiente das células epiteliais).
2. Centrifugar 3000 rpm por 10 min.
3. Jogar fora sobrenadante e colocar 500 μ L de solução de extração de DNA (Tris, SDS, EDTA).
4. Transferir para um microtubo de 2 ml e adicionar 5 μ L de proteinase K (20 mg/ml, solução mãe).
5. Vortexar por ~5s (velocidade moderada) para desmanchar o precipitado e incubar a 55 °C por 2 h ou overnight. (caso incubado por 2 h, inverter levemente os tubos em intervalos de tempo)
6. Adicionar 500 μ L de acetato de amônio 7,5 M (ou 8M + 1mM EDTA) e vortexar por ~5 seg (velocidade alta). Obs: EDTA deve estar conservado em geladeira mas deverá ser utilizado em temperatura ambiente.
7. Centrifugar 14.000 rpm por 10 min.
8. Transferir o sobrenadante de \pm 900 μ L para 2 microtubos (\pm 450 μ L em cada um). Caso sobre algum sobrenadante restante distribuir igualmente nos microtubos e adicionar em cada microtubo 540 μ L isopropanol (gelado).
9. Inverter os tubos ~20X (deve dar para ver a nuvem de DNA) e centrifugar 14.000 rpm por 5 min.
10. Verter o sobrenadante, ficando com o pellet (pode secar rapidamente em papel, tomando o cuidado para não contaminar as amostras) e adicionar 1.000 μ L etanol 70% para remover o isopropanol (preparar o etanol [álcool isopropílico] na hora de acordo com a quantidade a ser utilizada).
11. Vortexar por ~5 seg (velocidade moderada) para desmanchar o precipitado (pellet). Pode não dissolver completamente.
12. Centrifugar 14.000 rpm por 5 min.

13. Verter o tubo cuidadosamente para não perder o precipitado (geralmente não está firmemente aderido ao fundo do tubo. Melhor remover o sobrenadante cuidadosamente com uma pipeta, deixando o pellet).
14. Deixar secar ~1 h a temperatura ambiente (pode precisar de um tempo maior) com a tampa do microtubo aberta e após adicionar 50 μ L de TE em cada microtubo. Ao colocar o TE pode verter o líquido umas 4 vezes com a pipeta (ependal) cuidadosamente para homogeneizar melhor. Unir o conteúdo dos 2 microtubos em um só. Pode homogeneizar vertendo levemente com a pipeta ou dar leves batidinhas no microtubo.
15. Deixar em uma estante à temperatura ambiente. Pode acrescentar um pouco mais de TE e aguardar (por estarem turvas pode haver uma concentração maior de DNA). Ainda pode ser utilizado o banho-maria a 50 °C, deixando os microtubos por \pm 4 min.
16. Leitura da concentração de DNA no aparelho espectrofotômetro NanoView, com a pureza estimada pela razão OD 260/280.
17. Diluir para obter a concentração de 10 ng/ μ L e armazenar sob a temperatura de - 20 °C até preparo para a reação de PCR em tempo real.

APÊNDICE 6 – PROTOCOLO DE GENOTIPAGEM

Protocolo para Genotipagem utilizando o kit da Applied Biosystems

Diluição do DNA

- Padronizar a concentração das amostras de DNA para 10 ng/μl. Se necessário diluir as amostras com água DNA/RNase free.

ci= Concentração inicial de DNA obtida no espectrofotômetro

vi= volume que será obtido

cf= Concentração final de DNA (10 ng/ul)

vf = volume final da alíquota de DNA

ci.vi=cf.vf

Exemplo: []= 250.5 ng/ul

$250.5 \cdot x = 10 \cdot 100$

X=3.99 de DNA

H2O= $100 - 3.99 = 96$ ul de h2O

Diluição do Taqman Assay Mix

- O volume total de taqman 40x fornecido pela empresa é de 187.5 ul, entretanto diluiremos o taqman utilizando T.E para obter uma concentração de 20x. Dessa forma o volume total desse reagente será de 375 ul.

- Com o objetivo de evitar o descongelamento desnecessário do volume total do reagente iremos dividi-lo em alíquotas. Para isso será padronizado que em cada reação (poço) utilizaremos 0.63ul de taqman, ou seja, com o volume total de 375 ul serão feitas 592.2 reações. Como em cada placa temos 96 poços, podemos fazer 6 placas. Portanto, faremos 6 alíquotas de taqman 40x, em que cada alíquota teremos 31.25 ul.

- Confecção da Placa

Em cada poço utiliza-se:

- Master Mix (2X) -> 6.25 ul
- 20 x taqman assay mix -> 0.63 ul
- h2O -> 4.63 ul
- Volume total: 11.5 ul + 1ul de DNA

Para 96 amostras

- Master Mix (2X) -> 600 ul
- 20 x taqman assay mix -> 60.48 ul
- h2O -> 444.48 ul

- Devemos colocar dois controles negativos (Água RNA/DNAase free) no centro da placa e 3 controles positivos (uma amostra de cada genótipo).