

Achados clínicos, genéticos e microbiológicos de uma família com Periodontite Agressiva em Maceió

Patrícia Mayumi SOGUMO^a, Lícia Bezerra CAVALCANTE^{a,b}, Livia Sertori FINOTTI^{a,c},
Denise Madalena Palomari SPOLIDÓRIO^d, Amaro CARLOS JR^e, Eneida LIPINSKI-FIGUEIREDO^f,
Juliana Rico PIRES^g, Raquel Mantuaneli SCAREL-CAMINAGA^a

^aDepartamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^bDepartamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^cDepartamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^dDepartamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia,
UNESP – Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^eFaculdade de Odontologia, UFAL – Universidade Federal de Alagoas,
57020-700 Maceió - AL, Brasil

^fDepartamento de Genética, Faculdade de Odontologia,
UFAL – Universidade Federal de Alagoas, 57020-700 Maceió - AL, Brasil

^gDepartamento de Periodontia e Implantodontia, Centro Universitário,
UNIFEB – Fundação Educacional de Barretos, 14783-226 Barretos - SP, Brasil

Sogumo PM, Cavalcante LB, Finoti LS, Spolidório DMP, Carlos Jr A, Lipinski-Figueiredo E, Pires JR, Scarel-Caminaga RM. Clinical, microbiological and genetics findings of a family with Aggressive Periodontitis from Maceio. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(6): 323-331.

Resumo

O presente estudo relata achados clínicos, genéticos e microbiológicos de indivíduos de uma família com periodontite agressiva (PA) residente em Maceió - AL, Brasil. Quatorze membros da família foram submetidos a exames clínicos periodontais, coleta de células da mucosa oral para extração de DNA e coleta de fluido subgengival para detecção de cinco espécies de periodontopatógenos por meio da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Polimorfismos nos genes Interleucina 4 e 10 (*IL4* e *IL10*) foram investigados em cada indivíduo por meio da PCR-RFLP (Polimorfismo por Comprimento de Fragmento de Restrição). Seis membros da família apresentaram PA generalizada e oito foram considerados não afetados pela PA. Não houve associação de alelos, genótipos e haplótipos nos genes *IL10* e *IL4* com a presença de PA na família estudada. *Treponema denticola* (*T.d.*) foi o patógeno prevalente, seguido por *Tannerella forsythia* (*T.f.*). Houve correlação dos parâmetros clínicos investigados (perda de inserção clínica, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem) com a presença de *T.d.*, enquanto que para *T.f.* houve associação deste com o sangramento à sondagem. Conclui-se que, apesar de os polimorfismos investigados não terem relação com a suscetibilidade à PA, a presença de periodontopatógenos está associada a piores índices clínicos periodontais.

Palavras-chave: Periodontite; microbiologia; genética; citocinas.

Abstract

The present study reports clinical, microbiological and genetic findings in members of a family with Aggressive Periodontitis (AgP) from Maceió - AL, Brazil. After periodontal exams in fourteen members of the family, DNA was obtained from epithelial buccal cells and microbiological samples were collected from subgingival plaque to detect five species of periodontopathogens by Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) was used to investigate human polymorphisms in interleukin genes (*IL4*, *IL10*). Six members of the family showed Generalized AgP and eight were considered unaffected by the AgP. There was no association of alleles, genotypes and haplotypes in the *IL10* and *IL4* genes with the AgP in the studied family. *Treponema denticola* (*T.d.*) was the prevalent pathogen, followed by the *Tannerella forsythia* (*T.f.*). There was correlation between clinical findings (clinical attachment loss, bleeding on probing and probing depth) with the presence of *T.d.*, while *T.f.* was

correlated with bleeding on probing. In conclusion, although the investigated polymorphisms were not associated with the susceptibility to AgP, the presence of periodontopathogens is related to worse periodontal clinical parameters.

Keywords: Periodontitis; microbiology; genetics; cytokines.

INTRODUÇÃO

A Periodontite Agressiva (PA) é um tipo de doença periodontal (DP) caracterizada pelo início precoce das manifestações clínicas, que frequentemente evoluem de forma severa e com progressão rápida¹. Devido ao fato de a PA demonstrar agregação familiar, estudos anteriores buscaram identificar o padrão de transmissão da PA, sendo que foi especulado, entre outros, o padrão de transmissão autossômica dominante ou ligada ao cromossomo X².

A DP tem sido considerada uma patologia de caráter multifatorial³, desencadeada pela interação entre espécies da microbiota subgingival e a suscetibilidade do hospedeiro, levando à destruição tecidual⁴. Bactérias periodontopatogênicas iniciam e perpetuam a inflamação, podendo causar destruição do periodonto marginal via dois mecanismos: 1) pela ação direta dos subprodutos do metabolismo e das enzimas bacterianas; 2) estimulando a liberação de mediadores inflamatórios de células do hospedeiro⁵.

Há grande associação de elevados níveis de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) na microbiota subgingival com o diagnóstico clínico da PA⁶. Dessa forma, anticorpos contra esse microrganismo são detectados em indivíduos com a PA¹. Outras espécies bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella species* e *Campylobacter rectus* vêm sendo sugeridas com relação à etiologia da PA. No entanto, embora a infecção por periodontopatógenos seja essencial para o início da DP, sua mera presença na cavidade oral não é suficiente para explicar diferenças interindividuais na severidade da doença, sendo fatores genéticos os responsáveis por cerca de 50% da expressão da doença⁷.

Foi demonstrado que diferentes citocinas podem interferir na patogênese da DP. Há relatos na literatura científica que têm mostrado que indivíduos com PA apresentam altos níveis de interleucina 4 (IL-4) quando comparados com indivíduos com periodonto saudável^{8,9}. Também há a liberação de interleucina 10 (IL-10), uma importante citocina encontrada em níveis elevados em tecido gengival inflamado. A IL-10 tem papel anti-inflamatório, pois diminui os níveis de citocinas inflamatórias como a IL-1 e IL-6. Além disso, foi demonstrado que a IL-10 tem papel inibidor sobre a ação de lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis*.

Diferenças individuais nos níveis de interleucinas são atribuídas a polimorfismos nos genes de citocinas. Os níveis de expressão de uma proteína podem ser modulados por polimorfismos genéticos como o de base única (SNP-single nucleotide polymorphism), principalmente se localizado em uma região regulatória do gene chamada promotor¹⁰. Existem três polimorfismos no gene *IL4* que, por estarem próximos, são herdados como haplótipos e têm sido bastante investigados em estudos de associação com doenças: os SNPs -590 e +33 e o

polimorfismo do tipo VNTR (variable number of tandem repeat) de 70 pares de bases (pb) no intron 3. O haplótipo (TTD) foi significativamente prevalente em crianças japonesas com asma¹¹, assim como conferia maior susceptibilidade para desenvolver doença periodontal em indivíduos tchecos¹².

Da mesma forma, existem três polimorfismos na região promotora do gene *IL10*, nas posições -1082 (ou -1087), -819 e -592. O SNP -1082 caracteriza-se pela substituição de G para A, cujo alelo G está associado com elevada produção de IL-10 in vitro¹³. O SNP -819 (C/T) localiza-se numa região promotora do gene, na qual fatores de transcrição sob influência de estrogênio podem se ligar mais eficientemente ou não¹⁴. O -592 SNP é uma substituição de C para A numa região do promotor do gene na qual se ligam fatores de transcrição como Ets e Sp1, sendo que foi associado ao lúpus eritematoso sistêmico¹⁴. Os três polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação e destacam-se três haplótipos por eles formados: o GCC, o ACC e o ATA. O haplótipo GCC está associado com elevados níveis de IL-10¹³. Foi observado que mulheres brasileiras carregando o haplótipo ATA foram 2,57 vezes mais susceptíveis à DP¹⁵.

A comunidade científica internacional tem valorizado muito o estudo dos diferentes aspectos que participam da etiologia das doenças multifatoriais; assim, o presente trabalho tem o objetivo de investigar as características clínicas, genéticas e microbiológicas de indivíduos pertencentes a uma família com periodontite agressiva de Maceió - AL, Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

Após a aprovação desta pesquisa pelo Comitê de Ética da UFAL (nº 010123/2004-31), foram realizados novos exames clínicos periodontais – pois o primeiro exame foi realizado um ano antes (Tenório Neto et al.¹⁶, 2006) – e coletadas amostras de saliva e de fluido subgingival dos indivíduos que aceitaram livre e esclarecidamente participar da pesquisa. Da referida família com PA, foram incluídos neste estudo somente aqueles indivíduos dos quais foi possível obter os novos dados clínicos e coletar saliva para análise genética. Portanto, no heredograma da família (Figura 1), estão representados com a respectiva numeração somente os 14 indivíduos que atenderam a esse pressuposto, sendo seis deles afetados pela PA (42,9%) e oito não afetados (57,1%).

1. Análise Clínica dos Indivíduos

Na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL), foi executada uma abrangente avaliação do histórico médico e odontológico dos indivíduos participantes por meio do preenchimento do prontuário clínico da Disciplina de Periodontia. Sangramento à sondagem, profundidade à sondagem (seis sítios por dente) e perda clínica de inserção

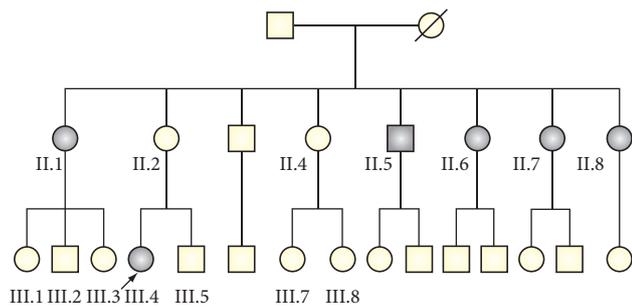


Figura 1. Heredograma da família estudada; círculos indicam indivíduos do gênero feminino e quadrados, masculino. Símbolos escuros representam indivíduos afetados pela Periodontite Agressiva. Flecha indica o indivíduo probando e o símbolo cortado por uma barra transversal indica indivíduo falecido. Números romanos indicam a geração da família, e números arábicos, a posição do indivíduo no heredograma.

foram determinados em cada paciente. Quando necessária, a documentação radiográfica foi realizada por meio de tomadas radiográficas periapicais e panorâmicas. Os dados clínicos obtidos de cada indivíduo foram utilizados para classificá-los como afetados ou não afetados pela PA. Os critérios para tal classificação basearam-se nos preconizados pela Academia Americana de Periodontologia descritos por Armitage¹⁷ (1999).

2. Investigação dos Polimorfismos nos Genes *IL10* e *IL4*

Antes do exame clínico periodontal, células da mucosa oral de cada indivíduo foram obtidas por meio de bochecho com solução de glicose a 3%¹⁸ e, mantidas sob refrigeração (cerca de 4 °C), foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP). Após centrifugação, o DNA foi extraído com o kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen, Paisley, UK), seguindo as normas do fabricante. O DNA de cada amostra foi quantificado com o BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), sendo obtida qualidade suficiente para realização das etapas seguintes de investigação molecular.

A região promotora do gene *IL10* que continha os loci polimórficos -819 (T/C) e -592 (C/A) foi amplificada conforme metodologia descrita em Scarel Caminaga et al.¹⁵ (2004); e o locus -1082 (G/A), de acordo com Lowe, Galley¹⁹ (2001). No gene *IL4*, foram investigados outros três loci polimórficos: -590 T/C no promotor, +33 C/T no exon 1 e inserção ou deleção de 70 pb no intron 3 (VNTR)²⁰. Para observar se houve sucesso na reação de PCR, os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida a 10%, corado com Nitrato de Prata. A seguir, foi realizada a técnica do RFLP, pela qual foi digerida parte do produto da PCR com uma enzima de restrição específica para cada locus polimórfico. Para o polimorfismo do tipo VNTR, é suficiente observar o tamanho do produto amplificado no gel de poli-acrilamida, que identifica os alelos que apresentam a inserção ou a deleção de 70 pb. As condições da PCR, dos primers utilizados e das enzimas de restrição para genotipagem dos polimorfismos estão representadas na Tabela 1.

3. Análise Microbiológica

Depois de uma semana do exame clínico periodontal, novo agendamento foi feito para cada paciente para proceder à coleta de fluido subgingival para análise microbiológica. Essa metodologia para análise microbiológica foi escolhida pelo fato de o fluido gengival ser uma complexa mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto, microrganismos bucais e endotoxinas liberadas por estes microrganismos. Além disso, pela possibilidade de o fluido estar enriquecido com produtos de degradação tecidual, na medida em que estes podem favorecer o crescimento de muitas espécies bacterianas que requerem proteínas ou produtos metabólicos finais de outras espécies para seu crescimento⁴.

De cada paciente, foram escolhidos dois sítios com doença periodontal e dois sítios sem doença, nos quais foram realizadas as coletas de fluido subgingival. Para cada sítio escolhido, uma ponta de papel absorvente estéril (endodôntico # 35) foi mantida subgingivalmente por 20 segundos e imediatamente mergulhada em um microtubo contendo 0,5 mL de solução de Ringer. Foram coletadas amostras de fluido subgingival de seis indivíduos da família estudada, sendo um indivíduo não afetado e cinco afetados pela PA. Assim como descrito para as amostras de bochecho, as amostras de fluido subgingival foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP).

As amostras foram fervidas durante 10 minutos, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para investigação da presença de periodontopatógenos por meio da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR). Para amplificar sequências dos microrganismos, foram utilizados os primers e as condições da PCR descritas na Tabela 2. Os produtos amplificados por PCR foram aplicados em géis de agarose a 1,5% e submetidos à eletroforese (90 V por 1 hora e 30 minutos). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados com o fotodocumentador GDS 8000 System (UVP, Upland, USA).

4. Análise Estatística

Os valores médios de cada parâmetro clínico periodontal com os respectivos desvios padrão foram calculados para cada indivíduo e, a seguir, analisados conjuntamente entre os membros da família afetados e os não afetados pela PA. Para a análise genética, foi empregado o programa ARLEQUIN (v. 3.0), tendo sido utilizados o teste de Hardy-Weinberg para verificar a distribuição de genótipos de cada loci e o teste de desequilíbrio de ligação para verificar se determinados alelos nos diferentes loci estariam sendo transmitidos associados (como haplótipos) ou ao acaso. Para investigar uma possível associação de periodontopatógenos com parâmetros clínicos periodontais, foi empregado o teste de Mann-Whitney.

Tabela 1. Primers e condições de amplificação e genotipagem dos polimorfismos investigados

Gene	Polimorfismo	Primers	Condições da PCR*	Enzima de restrição	Alelo	Tamanho do fragmento [#]	Referência	
IL4	-590	(F) 5' TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT 3'	51 °C	Ava II	C	177, 18	Noguchi et al. ⁴⁰ (2001)	
		(R) 5' TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA 3'			T	195		
	+33	(F) 5' CTC ATT TTC CCT CGG TTT CAG C 3'	58 °C	Mnl I	C	83, 43, 20, 4	Suzuki et al. ⁴¹ (1999)	
		(R) 5' GAA GCA GTT GGG AGG TGA GA 3'			T	126, 20, 4		
70 pb		(F) 5' TAG GCT GAA AGG GGG AAA GC 3'	58 °C	--	ins	253	Michel et al. ⁴² (2001)	
		(R) 5' CTG TTC ACC TCA ACT GCT CC 3'			del	183		
IL10	-1082	(F) 5' TCT GAA GAA GTC CTG ATG TCA CTG 3'	52 °C	Mnl I	G	94, 65 e 39	Lowe, Galley ¹⁹ (2001)	
		(R) 5' ACT TTC ATC TTA CCT ATC CCT ACT TCC 3'			A	133 e 65		
	-819		(F) 5' AAC TTT AGA CTC CAG CCA CAG AA 3'	62 °C	Mae III	C	217, 151, 124	Scarel Caminaga et al. ¹⁵ (2004)
						T	368, 124	
-592		(R) 5' GGT CTC TGG GCC TTA GTT TCC 3'		Rsa I	C	350, 92, 50		
					A	240, 111, 92, 50		

*Temperatura de anelamento da PCR; [#]pares de base (pb).

RESULTADO

1. Análise Clínica dos Membros da Família com PA

Da referida família com PA, foram investigados neste estudo 14 indivíduos, sendo 11 (78,58%) do gênero feminino e 3 (21,42%) do gênero masculino (Tabela 3). Oito indivíduos da família não foram afetados pela PA e dos seis indivíduos afetados, cinco são do gênero feminino. A idade média dos indivíduos afetados pela PA é de 28,8 anos ($\pm 6,8$) e, dos indivíduos não afetados, é de 19,3 anos (± 10). A Tabela 3 apresenta os achados clínicos, microbiológicos e genéticos dos indivíduos incluídos neste estudo.

Na Tabela 3, pode-se observar que a probanda (III.4), com 18 anos de idade, apresenta relevantes percentagens de sítios com nível de inserção clínico ≥ 5 mm (14,1%) e com profundidade de sondagem ≥ 4 mm (34%), admitindo-se apenas os sítios proximais não adjacentes. Cabe mencionar que essa paciente também apresentou perdas dentárias, incluindo um dente incisivo e quatro molares, sinais característicos de periodontite agressiva generalizada, visto que o paciente apresenta acometimento periodontal caracterizado por perda de inserção proximal em mais de três dentes não adjacentes além do primeiro molar e do incisivo inferior¹⁷.

Com relação aos indivíduos da geração II (tios da probanda), percebe-se que II.8 apresenta condições clínicas mais severas da PA generalizada, como, por exemplo, a maior percentagem de profundidade de sondagem ≥ 4 mm (61,7%) e de sítios com nível de inserção clínico ≥ 5 mm (23,4%), além da presença destes sítios associados ao sangramento à sondagem (37,0%). O único indivíduo que apresentou característica de PA localizada foi o II.1, como pode ser observado pelos dados clínicos apresentados na Tabela 3.

2. Investigação Genética dos Polimorfismos no Gene IL4

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para cada locus investigado, sendo observado equilíbrio dos mesmos no grupo não afetados. Como no grupo afetados, os loci +33 e VNTR 70 pb foram monomórficos (100% CC e 100% II, respectivamente), somente o locus -590 apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve associação de nenhum dos loci investigados com a PA nessa família. Assim como para outras populações previamente estudadas⁶, os polimorfismos investigados no gene *IL4* se mostraram em desequilíbrio de ligação, evidenciando haplótipos. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos, sendo que, para ambos, o alelo mais frequente foi o C C I (loci -590, +33 e VNTR 70 pb, respectivamente) e o mais raro foi o T T D. Um fato interessante foi encontrar o haplótipo incomum T C I.

Tabela 2. Primers utilizados na análise microbiológica

Microrganismo	Primers	Amplicon	Referência
<i>Treponema denticola</i>	F – 5' TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 3' R – 5' TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3'	346 pb	Ashimoto et al. ⁴³ (1996)
<i>Tanerella forsythia</i>	F – 5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' R – 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb	Ashimoto et al. ⁴³ (1996)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F – 5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' R – 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb	Benkirane et al. ⁴⁴ (1995)
<i>Prevotella nigrescens</i>	F – 5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' R – 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'	1100 pb	Guillot, Mouton ⁴⁵ (1997)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	F – 5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' R – 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'	557 pb	Ashimoto et al. ⁴³ (1996)
<i>Leukotoxin Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	F – 5' GCG GTC GAC AAC CTG ATA ACA GTA TT 3' R – 5' GCA GGA TCC ATA TTA AAT CTC CTT GT 3'	492 pb (altamente leucotóxico) 1022 pb (minimamente leucotóxico)	Haraszthy et al. ⁴⁶ (2000)

3. Investigação Genética dos Polimorfismos no Gene *IL10*

Após a genotipagem dos três loci polimórficos no gene *IL10* (-1082, -819, -592), foi verificado que os loci investigados mostraram equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo não afetados; já para o grupo afetados, o locus -1082 foi monomórfico (100% AA) e somente os loci -819 e -592 mostraram equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Também foi encontrado desequilíbrio de ligação entre os loci investigados do gene *IL10*, mas por não haver diferença estatística na distribuição dos haplótipos entre os grupos afetados e não afetados, não foi possível correlacionar nenhum destes haplótipos com a presença de PA na família estudada.

4. Análise Microbiológica

Foi constatado que o periodontopatógeno prevalente foi o *T.d* (100%), seguido por *T.f.* (83,3%), *P.n* (50%), *P.g* e *A.a* (33,3%). Dos seis indivíduos que foram submetidos à detecção de periodontopatógenos, foi observado em cinco deles a associação de *T.f.* e *T.d.* (83,3%).

Houve associação do periodontopatógeno *T.d.* com todos os índices clínicos periodontais e de *T.f.* com o índice de sangramento à sondagem (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Foi observado que na família estudada há membros afetados pela PA com altos índices de profundidade de sondagem ≥ 4 mm e de nível de inserção clínico ≥ 5 mm. Também foi observada a presença de sangramento à sondagem nesses sítios periodontais, indicando que, além de apresentarem bolsas periodontais, o tecido local está inflamado, caracterizando a presença e a atividade da doença periodontal²¹.

Apesar de haver nesta família seis pacientes afetados (42,8%) pela PA, para realizar a análise estatística dos dados genéticos, o tamanho amostral é pequeno ($n = 14$ membros da família

investigados); portanto, foi empregada a análise descritiva dos haplótipos encontrados (Tabela 3).

Com relação ao gene *IL4*, observou-se maior frequência dos alelos C, C e I para os três loci investigados, respectivamente. Para o locus -590, em um estudo anterior com 113 brasileiros residentes no Estado de São Paulo, foi mostrado que nessa população também houve maior frequência do alelo C²². Entretanto, não houve associação desse SNP com doença periodontal crônica nem em brasileiros²², nem²³ em europeus²⁴. A frequência de alelos costuma variar de um grupo étnico para outro; por exemplo, observou-se que a distribuição de alelos e genótipos do SNP -590 foi estatisticamente diferente entre brasileiros e japoneses²⁴. No entanto, outro estudo mais recente, também conduzido com uma população brasileira, mostrou associação do alelo T do SNP -590 com a doença periodontal crônica²⁰. Indivíduos que carregam pelo menos um alelo T se mostraram três vezes mais suscetíveis a desenvolver DP. Com relação ao SNP +33 e ao polimorfismo VNTR, Gonzáles et al.²⁴ (2007), encontraram associação com a PA, o que também foi observado por Anovazzi et al.²⁰ (2010), com relação à doença periodontal crônica. No entanto, Holla et al.¹² (2008), investigando uma população tcheca, não encontraram associação desses polimorfismos com doença periodontal crônica.

Foi verificada maior frequência dos alelos T no locus -590 e T no locus +33 em indivíduos alemães com PA ($p = 0,06$)²⁴. Na família com PA de Maceió, não foi verificado nenhum membro afetado com os alelos T para ambos os loci mencionados (Tabela 3). Na análise dos haplótipos formados pelos polimorfismos -590, +33 e VNTR, foi observada uma prevalência do haplótipo CCI tanto entre os indivíduos com PA generalizada quanto entre os não afetados. Além disso, presença do incomum haplótipo TCI no gene *IL4* pode indicar a miscigenação presente na população brasileira. No estudo do tipo caso-controle, Anovazzi et al.²⁰ (2010) observaram que o haplótipo TCI está associado à doença periodontal crônica, mas neste estudo de um caso familiar de PA, houve a presença de somente dois haplótipos TCI tanto

Tabela 3. Achados clínicos, microbiológicos e genéticos dos membros da família

	Paciente	Idade	Gênero	NIC ≥ 5 mm (%)	SS (%)	PS ≥ 4mm (%)	Microrganismos	Haplótipos genéticos	
								IL4	IL10
Periodontite Agressiva	II.1	39	F	3.7	8.0	12.3	<i>T.f, T.d, P.g.</i>	CCI/ CCI	ACC/ACC
	II.5	31	M	11.6	15.2	40.6	<i>T.f, T.d, P.n, A.a</i>	CCI/ TCI	GCC/ ATA
	II.6	30	F	18.9	22.9	60.0	<i>T.d, P.g</i>	CCI/ CCI	ACC/ATA
	II.7	28	F	20.5	41.0	44.8	NC	CCI/ CCI	ACC/ACC
	II.8	27	F	23.4	37.0	61.7	<i>T.f, T.d</i>	CCI/ TCI	ACC/ACC
	III.4	18	F	14.1	22.0	34.0	<i>T.f, T.d, P.n,</i>	CCI/ CCI	ACC/ATA
	Média ± DP	28.8 ± 6.8		15.4 ± 7.1	24.4 ± 12.6	42.2 ± 18.3			
Não Afetados	II.2	38	F	4.6	17.5	19.4	NC	CCI/TCI	ACC/ACC
	II.4	32	F	11.8	25.8	17.2	<i>T.f, T.d, P.n, A.a</i>	CCI/ CCI	ACC/ATA
	III.1	17	F	----	----	----	NC	CCI/CCI	ACC/ACC
	III.2	16	M	----	----	----	NC	CCI/CCI	ACC/ACC
	III.3	12	F	----	----	----	NC	CCI/TTD	ACC/ACC
	III.5	13	M	----	----	----	NC	TCI/TTD	ACC/GCC
	III.7	14	F	----	----	----	NC	CCI/CCI	ACC/ACC
	III.8	12	F	----	----	----	NC	CCI/CCI	ACC/GCC
	Média ± DP	19.3 ± 10							

Tabela 4. Achados clínicos associados aos periodontopatógenos

Parâmetros periodontais (%)	Patógenos - valores médios (± DP)				
	<i>T. f.</i>	<i>T. d.</i>	<i>P. n.</i>	<i>P. g.</i>	<i>A. a.</i>
PS ≥ 4 mm	12.9 (± 17.9)	13.9 (± 6.7)*	12.5 (1.38)	11.3 (10.7)	11.7 (0.1)
SS	21.6 (± 10.9)*	21.8 (± 9.8)*	21.0 (5.37)	15.4 (10.5)	20.5 (7,4)
NIC ≥ 5 mm	33.1 (± 19.7)	37.6 (± 20.7)*	30.6 (12.0)	36.1 (33.7)	28.9 (16.5)

± DP = desvio padrão; *p ≤ 0,05 pelo teste Mann-Whitney.

entre os afetados quanto entre os não afetados. Anovazzi et al.²⁰ (2010) também observaram que os haplótipos CTI e TTD foram associados à proteção contra o desenvolvimento da periodontite crônica e, neste estudo de família, houve dois haplótipos TTD no grupo de indivíduos não afetados. No entanto, para uma população tcheca, Holla et al.¹² (2008) observaram que indivíduos que carregaram o haplótipo TTD tinham maior susceptibilidade a desenvolver a periodontite crônica.

Com relação aos polimorfismos no gene *IL10*, Gonzáles et al.²⁵ (2002) investigaram os loci -819 e -592 em 18 indivíduos europeus não aparentados com PA, sem encontrar associação de nenhum desses com a doença. Considerando os polimorfismos como haplótipos, Scarel-Caminaga et al.¹⁵ (2004) constataram que mulheres carregando o haplótipo ATA foram 2,57 vezes mais suscetíveis à periodontite crônica e que aquelas que carregavam o haplótipo GCC/ACC tinham 8,83 vezes menos chance de desenvolver a doença. No presente estudo de uma família com

PA, é possível observar entre os indivíduos afetados a presença de três haplótipos ATA (25%), enquanto que entre os não afetados há somente um haplótipo ATA (6,3%). Uma maior tendência à prevalência do haplótipo ATA entre indivíduos com PA também foi observada por Yamazaki et al.²⁶ (2001). Mais recentemente, o haplótipo ATA/ATA foi encontrado associado à PA em frequência significativamente diferente (p = 0,023) em comparação a indivíduos periodontalmente saudáveis²⁷.

Referente à análise microbiológica, como somente um único indivíduo não afetado pela PA da presente família de Maceió pôde ter seu fluido subgingival coletado, foi possível realizar somente uma análise descritiva desses dados. Dos seis membros da família afetados pela PA, cinco deles foram submetidos à detecção de periodontopatógenos, sendo que todos apresentaram *T.d*, inclusive o único indivíduo do grupo não afetado. Alguns estudos demonstraram, em fluido gengival, que o microrganismo

T.d foi detectado com maior frequência em indivíduos com doença periodontal do que em indivíduos saudáveis²⁸⁻³⁰.

O *A.a* foi encontrado em somente 33,3% dos membros da família, sendo um paciente afetado (II.5) e outro não afetado pela PA (II.4). Diferentemente, esse microrganismo foi encontrado em alta prevalência em outros estudos com pacientes brasileiros^{31,32} e outras populações de diferentes etnias³³. Adicionalmente, foi investigado, por meio de uma PCR específica³⁴, se o periodontopatógeno *A.a* presente nos indivíduos II.4 e II.5 seria minimamente leucotóxico ou altamente leucotóxico, mas não foi verificada nenhuma das referidas formas nessa família.

Dos seis indivíduos que foram submetidos à detecção de periodontopatógenos, foi observado em cinco deles a associação de *T.f.* e *T.d.* (83,3%). Em concordância, em uma família paulista com PA, foi detectada tal associação de microrganismos em seis dos 14 membros investigados³⁵. Segundo Haffajee et al.³⁶ (1997) e Papapanou et al.³⁷ (1997), a associação de *T.f.*, *T.d.* e *P.g* implicaria na progressão da destruição periodontal. Portanto, é recomendável que esses pacientes tenham um acompanhamento frequente de sua condição clínica, com reforço de correta higienização oral. Assim, seriam diminuídas as chances de terem progressão da doença periodontal.

Cada parâmetro clínico foi analisado em relação à presença ou à ausência dos periodontopatógenos, verificando-se que o microrganismo mais prevalente, o *T.d.*, foi associado

significativamente com todos os parâmetros clínicos ($p = 0,0039$) (Tabela 4). Os resultados encontrados nesta família são condizentes com Pabón et al.³⁸ (2008), que demonstraram associação estatisticamente significativa de *T.d.* com os parâmetros clínicos profundidade de sondagem e perda de inserção (comparando indivíduos positivos para *T.d.* com negativos para *T.d.*). Pode-se observar que o *T.f.* também foi significativamente associado com sangramento à sondagem. Esse resultado está em concordância com o de Yano-Higuchi et al.³⁹ (2000), que encontraram relação de *T.f.* e *P.g* com profundidade de sondagem e sangramento à sondagem.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, apesar dos polimorfismos investigados tanto no gene *IL10* como no gene *IL4* não terem relação com a suscetibilidade à PA na família estudada, a presença de periodontopatógenos está associada a piores índices clínicos periodontais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP pelo Auxílio Pesquisa 2003/10424-0 e pelas Bolsas 2005/03175-1 e 2005/04553-8.

REFERÊNCIAS

1. Llorente MA, Griffiths GS. Periodontal status among relatives of aggressive periodontitis patients and reliability of family history report. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 121-5.
2. Hart AC. Genetic considerations of risk in human periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 3: 3-11.
3. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 159-79.
4. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 135-87.
5. Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 3rd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1997. p. 227-57.
6. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 1: 727-52.
7. 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: 1699-701.
8. Bartova J, Krátka-Opatrná Z, Procházková J, Krejsa O, Dusková J, Mrklas L. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early-onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators Inflamm.* 2000; 9: 115-20.
9. Manhart SS, Reinhart RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK, et al. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65: 807-13.
10. Stern DL. Evolutionary biology. The problem of variation. *Nature.* 2000; 408: 529-31.
11. Hobbs K, Negri J, Klinnert M., Rosenwasser LJ, Borish, L. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β promoter polymorphisms in Allergies and Asthma. *Am J Resp Crit Car Med.* 1998; 158: 1958-62.
12. Holla LI, Fassmann A, Augustin P, Halabala T, Znojil V, Vanek J. The association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol.* 2008; 79: 1927-33.
13. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnot PJ, Hutchinson L. An investigation of polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24: 1-8.
14. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnot P, Worthington J, Ollier WER, et al. Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997; 24: 2314-7.

15. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr, RB, Camargo LEA, Line SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 443-8.
16. Tenório Neto JF, Pavão RJLP, Carlos Junior A. Periodontite Agressiva: análise clínica de suscetibilidade à doença. *Periodontia.* 2006; 16: 47-51.
17. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
18. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000; 18: 6-9.
19. Lowe PR, Galley HF. A novel PCR-RFLP assay for the detection of single nucleotide polymorphism at position -1082 in the human IL-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 2001; 28: 563-4.
20. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KMC, Orrico SRP, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Polymorphisms and Haplotypes in the *Interleukin-4* gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2010; 81: 392-402.
21. Newbrun, E. Indices to measure gingival bleeding. *J Periodontol.* 1996; 67: 555-61.
22. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr, RB, Line SRP. Investigation of *IL4* gene polymorphism in individual with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 341-5.
23. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB Jr, Taba Júnior M, Grisi MF, Michel J, et al. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent.* 2004; 32: 241-6.
24. Gonzáles JR, Mann M, Stelzig J, Bodeker RH, Meyle J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 473-9.
25. Gonzáles JR, Michel J, Diete A, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 816-22.
26. Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 828-32.
27. Reichert S, Machulla HKG, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Gläser CH, et al. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Periodontol Res.* 2008; 43: 40-7.
28. Rivieri GR, Smith KS, Carranza NJr, Tzagaroulaki E, Kay SL, Dock M. Subgingival distribution os *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *J Periodontol.* 1995; 66: 829-37.
29. Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. Quantitative relationship os *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun.* 1988; 56: 726-8.
30. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severith od periodontal tissue destrucion. *J Periodontol.* 2001; 72: 1354-63.
31. Corteli Jr, Cortelli SC, Jordan SF, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic Periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 860-6.
32. Scarel-Caminaga RM, Pires JR, Sogumo PM, Salmon CR, Peres RCR, Spolidório DMP. A familial case of Aggressive Periodontitis: clinical, microbiological and genetic findings. *Rev Odontol UNESP.* 2009; 38: 175-83.
33. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol.* 1983; 54: 707-11.
34. Rosalem Jr W, de Souza RC, de Andrade AFB, Colombo APV. Analysis of leukotoxin gene types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with aggressive periodontitis. *Braz J Microbiol.* 2006; 7: 127-34.
35. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MAN, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SRP. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 233-9.
36. Haffajee AD, Cugini M, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 767-76.
37. Papananou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol.* 1997; 68: 651-66.
38. Pabón MC, Ospina DPR, Guzmán DMI, Rojas LMO, Arroyave SIT. Detection of *Treponema denticola* in saliva obtained from patients with various periodontal conditions. *Clin Oral Invest.* 2008; 12: 73-81.
39. Yano-Higuchi K, Takamatsu N, He T, Umeda M, Ishikawa I. Prevalence of bacterioides forsythus, porphyromonas gingivalis and actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 597-602.
40. Noguchi E, Nukaga-Nishio Y, Jian Z, Yokuchi Y, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Matsui A, Shibasaki M, Arinami T. Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Hum Immunol.* 2001; 62: 1251-7.
41. Suzuki I, Yamaguchi E, Hizawa N, Itoh A, Kawakami Y. A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. *Immunogenetics* 1999; 49: 738-9.
42. Michel J, Gonzáles JR, Wunderlich D, Herrmann JM, Meyle J. Interlekin-4 polymorphisms in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 483-8.

43. Ashimoto A, Chen, C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-73.
44. Benkirane RR, Guillot E, Mouton C. Immunonagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2908-12.
45. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu strictu and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1876-82.
46. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71: 912-22.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga
Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, UNESP – Univ Estadual Paulista,
14801-903 Araraquara - SP, Brasil
e-mail: raquel@foar.unesp.br

Recebido: 07/10/2010

Aceito: 27/12/2010