



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA IL-1 E
DO IL-1RA COM A PERIODONTITE**

Trabalho submetido por
Mariana de Oliveira Fulgêncio
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA IL-1 E
DO IL-1RA COM A PERIODONTITE**

Trabalho submetido por
Mariana de Oliveira Fulgêncio
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Ricardo Alves

e coorientado por
Mestre José Maria Cardoso e Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

outubro de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Doutor Ricardo Alves, obrigada por ter aceitado orientar a minha tese e pela disponibilidade demonstrada durante a redação da mesma.

Ao meu coorientador, Mestre José Maria Cardoso, por toda a dedicação, exigência e rigor demonstrados ao longo da realização deste projeto. Por ter estado sempre presente, disposto a ajudar e, principalmente, pelo voto de confiança em mim depositado.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, por todos os momentos de partilha de sabedoria e conhecimento, bem como pela ajuda inalcançável na parte laboratorial.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, pela paciência imensa em rever a minha análise estatística e por se ter prontificado sempre a ajudar.

Aos meus pais e irmã, os meus três pilares principais, que desde o primeiro ao último dia acreditaram que seria capaz de concretizar esta fase. Pelos valores transmitidos, presença e carinho diários, é o vosso amor que me faz querer ser sempre melhor. Nada disto seria possível sem vocês, serão eternamente os meus maiores amigos.

À minha avó, cuja presença no meu coração é eterna.

Aos meus avós, pelas palavras de incentivo constantes e por acreditarem sempre que serei a melhor médica dentista.

Aos meus amigos do coração, Beatriz F., Beatriz C. e Hugo, por terem escolhido acompanhar o meu percurso desde muito cedo e terem sido os amigos que escolhi levar para a vida toda.

À minha colega de box e amiga eterna, Filipa, o meu braço direito, a minha companheira de aprendizagem e amizade, a minha parceira de vida.

Às minhas amigas, Rita, Inês e Catarina, por terem sido as melhores pessoas para fazerem este percurso comigo e pela constante partilha de experiências que marcarão para sempre a nossa amizade.

À Mariana, a minha conselheira de serviço, amiga de partilha diária e pelo que me fez crescer.

Ao Pedro, a melhor pessoa que podia ter ao meu lado, pela presença, apoio e motivação constantes, por me ensinar a ser a minha melhor versão de mim. Que os nossos percursos pessoais e ambições futuras sejam sempre concretizados ao lado um do outro.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, pelos ensinamentos e valores transmitidos durante estes 5 anos. Guardarei para sempre com carinho os momentos cá vividos.

RESUMO

Objetivos: Verificar a possível relação entre a existência de polimorfismos dos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN e a presença de periodontite, através de um estudo realizado numa população de pacientes caucasianos que frequentaram a Clínica Dentária Egas Moniz.

Materiais e Métodos: Foi utilizada uma amostra de 100 indivíduos, 38 com saúde periodontal e 62 com periodontite. Recolheram-se amostras da mucosa jugal dos pacientes, tendo sido posteriormente realizada a extração do DNA e análise genética com recurso às técnicas de *Real-time Polymerase chain reaction* e *Polymerase chain reaction*, seguida de análise eletroforética. Procedeu-se à análise estatística através do programa SPSS.

Resultados: Considerando os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, a presença do alelo alterado (T) foi superior no grupo periodontite comparativamente ao grupo saúde, evidenciando 21,0% e 14,5% para a IL-1A⁻⁸⁸⁹ ($p = 0,251$) e 17,7% e 7,9% para a IL-1B⁺³⁹⁵⁴ ($p = 0,051$), respetivamente. Relativamente ao polimorfismo do gene IL-1RN, verificou-se a presença do alelo 1 na maioria dos pacientes (87,0%), ao passo que os alelos 2/3/5 corresponderam a um total de 13,0%, sendo 10,5% associado ao grupo saúde e 14,5% ao grupo periodontite ($p = 0,415$). Dos pacientes que apresentavam o genótipo positivo (existência de pelo menos um alelo alterado nos genes IL-1A e IL-1B), 22,5% pertenciam ao grupo periodontite, enquanto 10,5% se encontravam no grupo saúde ($p = 0,128$). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os polimorfismos avaliados. Contudo, a presença do genótipo CC para o gene IL-1B foi mais prevalente no grupo saúde, com uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,048$).

Conclusão: Apesar de não se ter verificado uma diferença estatisticamente significativa quanto à presença dos polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra entre os grupos, verifica-se uma maior prevalência dos alelos alterados no grupo periodontite.

Palavras-chave: periodontite; interleucina-1; polimorfismos; genética.

ABSTRACT

Objective: To verify the possible relationship between the existence of polymorphisms in the IL-1A, IL-1B and IL-1RN genes and the presence of periodontitis, through a study carried out in a population of Caucasian patients who attended the Egas Moniz Dental Clinic.

Materials and Methods: A sample of 100 individuals was used, 38 with periodontal health and 62 with periodontitis. Samples were collected from the buccal mucosa, and DNA extraction and genetic analysis were later performed using the *Real-time Polymerase chain reaction* and *Polymerase chain reaction techniques*, followed by electrophoretic analysis. The statistical analysis was carried out through the SPSS program.

Results: Considering IL-1A⁻⁸⁸⁹ and IL-1B⁺³⁹⁵⁴ polymorphisms, the presence of the altered allele (T) was higher in the periodontitis group compared to the health group, showing 21,0% and 14,5% for IL-1A⁻⁸⁸⁹ ($p = 0,251$) and 17,7% and 7,9% for IL-1B⁺³⁹⁵⁴ ($p = 0,051$), respectively. Regarding the polymorphism of the IL-1RN gene, the presence of allele 1 was verified in most patients (87,0%), while the 2/3/5 alleles corresponded to a total of 13,0%, with 10,5% associated with the health group and 14,5% to the periodontitis group ($p = 0,415$). Among the patients who had the positive genotype (existence of at least one altered allele in the IL-1A and IL-1B genes), 22,5% belonged to the periodontitis group, while 10,5% were found in the health group ($p = 0,128$). There were no statistically significant differences amongst the groups for the evaluated polymorphisms. Yet, the presence of the genotype CC for the IL-1B gene was more prevalent in the health group, with a statistically significant difference ($p = 0,048$).

Conclusion: Although there was no statistically significant difference regarding the presence of IL-1 and IL-1Ra gene polymorphisms between the groups, there is a higher prevalence of altered alleles in the periodontitis group.

Keywords: periodontitis; interleukin-1; polymorphisms; genetics.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	15
1. Periodontite.....	15
1.1 Definição	15
1.2 Epidemiologia.....	15
1.3 Etiopatogenia	16
1.4 Características clínicas e histopatológicas.....	18
1.5 Evolução da classificação das doenças periodontais e nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares.....	19
1.6 Fatores de risco	22
1.7 Periodontite e as doenças sistémicas	24
2. O papel das citocinas inflamatórias	25
2.1 Interleucina-1 (IL-1)	25
2.1.1 Interleucina-1 α e Interleucina-1 β (IL-1 α e IL-1 β)	26
2.2 Antagonista do recetor da IL-1 (IL-1Ra).....	27
3. Polimorfismos genéticos.....	28
3.1 Definição	28
3.2 <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP).....	29
3.3 <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR)	29
4. Relação dos polimorfismos genéticos e a periodontite	30
5. Análise laboratorial para a genotipagem de polimorfismos genéticos	34
5.1 Técnica de <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	34
5.2 Técnica de <i>Real-Time</i> PCR.....	36
II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO.....	39
III. MATERIAIS E MÉTODOS	41
1. Considerações éticas	41
2. Tipo de estudo e local de realização	41
3. Seleção da amostra	41
4. Critérios de inclusão	43
5. Critérios de exclusão	43

6.	Recolha de amostras	43
7.	Extração de DNA.....	44
8.	Técnica de <i>Real-time</i> PCR.....	49
9.	Técnica de PCR	52
10.	Análise do polimorfismo <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR)	54
11.	Análise Estatística.....	56
IV.	RESULTADOS	57
1.	Análise da técnica de <i>Real-time</i> PCR.....	57
2.	Análise da técnica de PCR.....	61
3.	Características demográficas e presença do fator de risco – tabaco na amostra do estudo.....	63
4.	Frequências alélicas	63
5.	Frequências genotípicas.....	66
6.	Presença do genótipo positivo	69
7.	Análise dos resultados tendo em conta o fator de risco – tabaco	70
V.	DISCUSSÃO	73
VI.	CONCLUSÕES.....	81
VII.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	83
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
IX.	ANEXOS.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de amplificação de uma reação de <i>Real-time</i> PCR. Autorizado por (Kubista et al., 2006) (Anexo 4).	37
Figura 2. Recolha de amostras da mucosa jugal com recurso a um omniswab (Whatman FTA).	43
Figura 3. Armazenamento de amostras no frio (-20°C).	44
Figura 4. Proteinase K.	45
Figura 5. <i>Buffer</i> ATL.	45
Figura 6. Vórtex.	45
Figura 7. Amostras na incubadora de calor	45
Figura 8. <i>Buffer</i> AL.	45
Figura 9. Amostras na centrifugadora.	45
Figura 10. QIAamp MiniSpin Column.	46
Figura 11. <i>Buffer</i> AW1.	47
Figura 12. <i>Buffer</i> AW2.	47
Figura 13. Etanol Absoluto (96-100%).	47
Figura 14. <i>Buffer</i> ATE.	48
Figuras 15 e 16. Tubos “eppendorf” de todas as amostras, após extração de DNA, selados com Parafilm®”M”.	48
Figura 17. Diluições das amostras de DNA em tubos “eppendorf” dos pacientes nº 88 a 106.	49
Figura 18. Espectrofotómetro.	49
Figura 19. <i>Primers</i> + sondas IL-1A e IL-1B (TaqMan™ SNP Genotyping Assay 40X).	50
Figura 20. Diluição dos <i>primers</i> + sondas IL-1A e IL-1B (TaqMan™ SNP Genotyping Assay 20X).	50
Figura 21. Master Mix.	50
Figura 22. Suporte com minitubos “eppendorf” para análise <i>Real-time</i> PCR.	51
Figura 23. <i>Primers</i> IL1RN_F e IL1RN_R.	53
Figura 24. Diluição dos <i>primers</i> IL1RN_F e IL1RN_R.	53
Figura 25. MyTaq.	53
Figura 26. Suporte com minitubos “eppendorf” para análise PCR.	54
Figura 27. SEaKem® LE Agarose.	54
Figura 28. TAE 1X.	54
Figura 29. Corante <i>red-safe</i>	54
Figura 30. Azul de bromofenol 0,05%.	55

Figura 31. Minitubos “epENDORF” preparados para análise eletroforética.....	55
Figura 32. Marcador NZYDA <i>Ladder</i> VI.	56
Figura 33. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo homozigótico do tipo 1/1 (paciente 83 - grupo controlo) relativa ao polimorfismo IL-1A ⁸⁸⁹ . Curva azul: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: <i>Threshold</i>	58
Figura 34. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo heterozigótico do tipo 1/2 (paciente 15 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1A ⁸⁸⁹ . Curva verde com círculos: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva verde lisa: detetada pela sonda FAM (alelo 2); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: <i>Threshold</i>	59
Figura 35. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo homozigótico do tipo 1/1 (paciente 106 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ . Curva azul: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: <i>Threshold</i>	60
Figura 36. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo heterozigótico do tipo 1/2 (paciente 72 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ . Curva cinzenta com círculos: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva cinzenta lisa: detetada pela sonda FAM (alelo 2); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: <i>Threshold</i>	60
Figura 37. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras, relativo ao gene IL-1RN no intrão 2. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); CN: controlo negativo; E: paciente excluído (ausência de DNA); Grupo controlo: pacientes nº 61, 62, 64, 68, 76, 79, 81, 83, 85; Grupo doença: pacientes nº 15, 42, 46, 53, 55, 71, 74, 77, 78, 84, 87. Todos os pacientes eram homozigóticos para o alelo 1 (412 pb), à exceção dos pacientes 46 e 61. No paciente 61 observaram-se 2 bandas uma correspondente ao alelo 1 e outro ao alelo mutado (alelo 5) (584 pb). No paciente 46 observou-se somente uma banda correspondente ao alelo 2 (240 pb), sendo este paciente homozigótico para o alelo 2.	61
Figura 38. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras, relativo ao gene IL-1RN no intrão 2. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); CN: controlo negativo; E: paciente excluído (ausência de DNA); Grupo controlo: paciente nº 102; Grupo doença: pacientes nº 56, 57, 60, 63, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 82. Todos os pacientes eram homozigóticos para o alelo 1 (412 pb), à exceção dos pacientes 69, 70 e 73. Em ambos os pacientes observou-se somente uma banda correspondente ao alelo 2 (240 pb), sendo estes pacientes homozigóticos para o alelo 2.	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráficos 1 e 2. Prevalência dos alelos 1 (C) e 2 (T) nos polimorfismos IL-1A ⁻⁸⁸⁹ e IL-1B ⁺³⁹⁵⁴	60
Gráfico 3. Prevalência dos alelos 1 e 2/3/5 (T) no polimorfismo do gene IL-1RN.	62
Gráfico 4. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , nos grupos controle e doença.	64
Gráfico 5. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ , nos grupos controle e doença.	65
Gráfico 6. Prevalência dos alelos 1 e 2/3/5 no polimorfismo do gene IL-1RN, nos grupos controle e doença.	65
Gráfico 7. Prevalência dos genótipos CC e CT no polimorfismo IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , nos grupos controle e doença.	67
Gráfico 8. Prevalência dos genótipos CC, CT e TT no polimorfismo IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ , nos grupos controle e doença.	68
Gráfico 9. Prevalência dos genótipos 1/1 e 1/3 no polimorfismo do gene IL-1RN, nos grupos controle e doença.	69
Gráfico 10. Prevalência de genótipo positivo nos grupos controle e doença.	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da Periodontite com base no estágio. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).....	21
Tabela 2. Classificação da Periodontite com base no grau. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).....	22
Tabela 3. Preparação das amostras para discriminação alélica por reação de <i>Real-time</i> PCR, seguindo as instruções do fabricante.....	50
Tabela 4. Sequência de <i>primers</i> utilizados para o polimorfismo IL-1RN. Adaptado de (Kornman et al., 1997).....	52
Tabela 5. Preparação das amostras para discriminação alélica por reação de PCR, seguindo as instruções do fabricante.	53
Tabela 6. Relação da periodontite com as variáveis idade, gênero e tabagismo.	63
Tabela 7. Frequências alélicas nos grupos controle e doença para os polimorfismos IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2).	63
Tabela 8. Frequências genotípicas nos grupos controle e doença para os polimorfismos IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2).	66
Tabela 9. Relação da amostra com a presença de genótipo positivo.....	70
Tabela 10. Frequências fenotípicas em pacientes fumadores (n=40) nos grupos controle e doença.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL: Tampão de lise

ATE: Tampão de eluição

ATL: Tampão de lise celular

AW: Tampão de lavagem

C: Citosina

CAL: Perda de inserção clínica

DP: Doença periodontal

DM: Diabetes Mellitus

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dNTP: *Deoxynucleoside triphosphate*

FCG: Fluido crevicular gengival

FcγR: Recetor gama Fc

IL-1: Interleucina-1

IL-1α: Interleucina-1α

IL-1β: Interleucina-1β

IL-1Ra: Antagonista do recetor da interleucina-1

IL-1RI: IL-1 recetor I

IL-1RII: IL-1 recetor II

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

IL-10: Interleucina-10

IUEM: Instituto Universitário Egas Moniz

kDa: Kilo Dalton

LPS: Lipopolissacarídeo

mA: Miliampere

ml: Mililitro

M: Marcador de massas moleculares

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MMP: Metaloproteinase de matriz

ng: Nanograma

nm: Nanómetro

pb: pares de bases

PC: Periodontite crónica

PS: Profundidade de sondagem

PCR: *Polymerase chain reaction*

PGE₂: Prostaglandina E2

rpm: rotações por minuto

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

STR: *Short Tandem Repeat*

T: Timina

TAE: Tris acetato EDTA

TE: *Transposable Element*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UDG: Uracil-DNA glicosilase

UTR: *Untranslated region*

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*

μ l: Microlitro

μ M: Micromolar

°C: Graus Celsius

χ^2 : Teste de independência do Qui-quadrado

I. INTRODUÇÃO

1. Periodontite

1.1 Definição

A periodontite consiste numa doença inflamatória crónica multifatorial associada a um biofilme disbiótico, que se acumula na placa dentária subgingival, caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte do dente (Hernández et al., 2011; Kinane & Lappin, 2002; Papapanou et al., 2018). É ainda caracterizada pela destruição do tecido conjuntivo de inserção do dente, bem como por uma reabsorção do osso alveolar que, eventualmente, pode resultar na perda dentária (Linhartova et al., 2020; Heitz-Mayfield, 2005; Hernández et al., 2011).

A periodontite implica um processo destrutivo potenciado por microrganismos periodontopatogénicos específicos, que ativam uma resposta imunoinflamatória a nível do hospedeiro. Contudo, a predisposição genética ou a relação com fatores ambientais, tais como os hábitos do indivíduo, potenciam esse efeito e contribuem para o início e curso da doença (Brodzikowska et al., 2019; Kumar, 2019; Moreira et al., 2005; Toy & Uslu, 2019).

Trata-se de uma condição irreversível que alterna entre as fases de destruição ativa e latência, podendo permanecer estável, em remissão, ou então evoluir para períodos de exacerbação (Almeida et al., 2006; Chapple et al., 2018; Wankhede et al., 2017).

1.2 Epidemiologia

A doença periodontal (DP), que abrange a gengivite e a periodontite, é a patologia oral mais comum da população humana e é considerada uma condição disbiótica resultante do desequilíbrio entre a comunidade subgingival e a resposta imune do hospedeiro (Feng & Liu, 2020; Michaud et al., 2017; Nazir et al., 2020). Apresenta uma alta prevalência tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, afetando cerca de 20-50% da população mundial (Nazir et al., 2020; Nazir, 2017).

Segundo o *Global Burden of Disease Study* (GBD, 2016), foi considerada a 11^a condição com maior prevalência mundial, abrangendo, de forma crescente, todas as faixas etárias (Nazir, 2017; Tadjoeidin et al., 2017).

De acordo com a classificação da *American Academy of Periodontology and European Federation of Periodontology*, a prevalência da periodontite incluindo os 4 estádios é de 85,4% e de periodontite grave (estádios III e IV) é de 48,5% (Alawaji et al., 2022). Assim, a elevada prevalência da periodontite, bem como os efeitos prejudiciais que pode ter na população, tornam esta doença um problema abrangente de saúde pública a nível global (Papapanou et al., 2018; Wankhede et al., 2017).

1.3 Etiopatogenia

A compreensão atual da patogénese da periodontite sugere que esta doença apresenta vários fatores etiológicos para o seu início e progressão (Linhartova et al., 2020; Nazir, 2017; Suzuki & Yamada, 2022; Toy & Uslu, 2019). Antigamente, acreditava-se que a acumulação de placa bacteriana, por si só, era responsável e suficiente para o aparecimento da doença (Greenstein & Hart, 2002; Kornman et al., 1994). Atualmente, sabe-se que embora a presença de bactérias periodontopatogénicas seja necessária para o seu aparecimento, a extensão e gravidade da doença são influenciadas pela interação multifatorial entre os microrganismos patogénicos, a resposta do hospedeiro, fatores adquiridos/ambientais e predisposição genética (Cullinan et al., 2001; de Carvalho et al., 2009; Moreira et al., 2005).

A cavidade oral é constituída por, aproximadamente, 800 espécies bacterianas diferentes, embora a percentagem que efetivamente pode levar ao aparecimento da doença seja muito reduzida (Ashby et al., 2009; Kumar, 2019; Wankhede et al., 2017). Um conjunto de bactérias, predominantemente anaeróbias gram negativas e do complexo vermelho e laranja, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são encontradas com maior frequência nas localizações subgingivais e em maior proporção em casos de DP (Cai et al., 2021; Gross et al., 2017; Shaddox et al., 2012).

Os microrganismos periodontopatogénicos, anteriormente mencionados, são capazes de promover o desequilíbrio da homeostase tecidual e potenciar o processo destrutivo do periodonto, ao ativarem mecanismos teciduais provenientes da resposta

inflamatória do hospedeiro. Essa exacerbada resposta imune do hospedeiro inicia um conjunto de alterações imunológicas e inflamatórias, através da regulação da expressão de citocinas e enzimas, que provocam um desequilíbrio no metabolismo ósseo a favor dos processos de reabsorção de tecido conjuntivo e osso alveolar (Kornman et al., 1997; Salazar-Pelaéz et al., 2012; Suzuki & Yamada, 2022).

Inicialmente, vários microrganismos vão-se organizando em colônias, multiplicam-se e permitem a adesão sucessiva de novas espécies, até se dar a formação completa da placa bacteriana, que se acumula na superfície dentária. Essa placa bacteriana, quando não removida, é capaz de invadir o epitélio sulcular e juncional, levando à formação das bolsas periodontais. Essas bolsas possuem um ambiente anaeróbio propício para a proliferação de bactérias anaeróbias, as espécies bacterianas mais comuns na periodontite (Hegde & Awan, 2019; Wankhede et al., 2017).

Os produtos bacterianos provenientes dessas bactérias, como as colagenases, proteases, endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS's), hialuronidases, metaloproteinases de matriz (MMP's) e outros antigénios bacterianos, são os responsáveis pela estimulação da resposta inflamatória do hospedeiro (Hajishengallis et al., 2004; Hegde & Awan, 2019; Wankhede et al., 2017).

Essa resposta imune ocorre quando os neutrófilos e as células protetoras do organismo não conseguem combater a invasão bacteriana, desencadeando um conjunto de reações. Nesse sentido, pode-se destacar a ativação de macrófagos que levam à produção de prostaglandina E2 (PGE2), proteína C-reativa, mediadores bioquímicos inflamatórios, denominados citocinas, como algumas interleucinas (interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8)), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferão, que culminam na perda de tecido conjuntivo e osso alveolar (Humar et al., 1999; Wankhede et al., 2017). Esta resposta do hospedeiro é individual e é caracterizada pela sua suscetibilidade à periodontite (Toy & Uslu, 2019).

Assim, sabe-se que, para além do fator etiológico principal que inicia todo o processo destrutivo associado à DP, o biofilme bacteriano, também a suscetibilidade do hospedeiro e a sua resposta imune assumem um papel fulcral para a propagação e evolução da doença. Contudo, existem outros fatores, denominados fatores de risco, que também contribuem e afetam a capacidade de os tecidos periodontais restabelecerem o equilíbrio entre o hospedeiro e o biofilme (Cullinan et al., 2001).

1.4 Características clínicas e histopatológicas

A periodontite apresenta como principal característica clínica a perda de suporte do tecido periodontal, também denominada por perda de inserção clínica (CAL), resultante da inflamação gengival mediada pelo hospedeiro (Holtfreter et al., 2015; Tonetti et al., 2018).

Adicionalmente, ocorre perda óssea alveolar, confirmada através de avaliações radiográficas, presença de bolsas periodontais e hemorragia gengival. Nesse sentido, no seu diagnóstico, deverão ser consideradas todas as localizações que apresentam hemorragia na medição da profundidade de sondagem (PS), o número e a extensão de dentes com PS acima de um determinado limiar, geralmente maior ou igual a 4 mm ou 6 mm, e ainda os dentes com CAL superior ou igual a 3 mm ou 5 mm (Kinane et al., 2017; Nazir et al., 2020; Papapanou et al., 2018; Wankhede et al., 2017). Ocasionalmente, poderão ainda existir sinais de supuração (Wankhede et al., 2017).

Um paciente para ser identificado como um caso de periodontite diagnosticado necessita de cumprir os seguintes requisitos: perda de inserção em duas ou mais localizações interproximais não adjacentes ou perda de inserção de 3 mm ou mais na localização vestibular ou lingual/palatina de pelo menos 2 dentes, excluindo as seguintes causas não periodontais: 1) recessão gengival de origem traumática; 2) cárie dentária com extensão até à zona cervical do dente; 3) presença de perda de inserção na face distal de um segundo molar, que esteja associada ao mau posicionamento ou à extração de terceiro molar; 4) lesão endo-perio com drenagem através do periodonto marginal; ou 5) ocorrência de fratura radicular vertical (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Com base no novo esquema de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares, todas as formas de periodontite, que se englobam na categoria “Periodontite”, são classificadas de acordo com um sistema multidimensional de estádios e graus da doença. É através deste sistema que se pode concluir clínica e radiograficamente sobre qual o diagnóstico periodontal definitivo (Caton et al., 2018; Papapanou et al., 2018).

Relativamente às características histopatológicas, segundo o quadro histopatológico das Gengivites, classificado por Page e Schroeder (1976), existem quatro estádios que avaliam a progressão da inflamação gengival e periodontal com base em evidência clínica e histopatológica: lesão inicial (estádio 1), lesão precoce (estádio 2), lesão estabelecida (estádio 3) e lesão avançada (estádio 4). Os estádios 1 a 3

correspondem à transição de uma gengiva clinicamente saudável para a presença de gengivite crónica, ao passo que o estágio 4 se refere à transição da gengivite para a periodontite.

Após inúmeras alterações a nível do epitélio de união, com um aumento progressivo do infiltrado inflamatório e células do plasma, ocorre a migração apical do epitélio juncional e inicia-se, assim, a formação da bolsa periodontal. No estágio 4, existe a formação de bolsas periodontais, a quantidade de plasmócitos é predominante, apesar da existência de todo o tipo de células inflamatórias. Neste estágio ocorre ainda a perda do osso alveolar e do ligamento periodontal, bem como a rutura da arquitetura tecidual com fibrose (Page & Schroeder, 1976).

1.5 Evolução da classificação das doenças periodontais e nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares

Os sistemas de classificação emergiram com o intuito de fornecer uma base sólida para o estudo científico da etiologia, patogénese e tratamento de várias doenças. Neste sentido, desde 1989 até 1996 que a classificação da periodontite foi reiteradamente alterada, tendo sido subdividida em vários grupos (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Contudo, o Workshop de 1999 introduziu uma nova classificação – “Classificação de Doenças e Condições Periodontais” –, que modificou e adicionou novos parâmetros à classificação anterior, que permanecia ambígua em algumas categorias, subdividindo-se em oito categorias: Doenças gengivais; Periodontite crónica; Periodontite agressiva; Periodontite como manifestação de doenças sistémicas; Doenças periodontais necrosantes; Abscessos do periodonto; Periodontite associada a lesões endodônticas e Defeitos e condições adquiridas ou de desenvolvimento. Esta classificação, com as suas alterações, refletia uma melhoria quer na prática clínica quer na investigação científica, tendo permanecido em vigor mais de 17 anos (Armitage, 1999; Papapanou et al., 2018).

No entanto, uma vez que apresentava algumas ausências, nomeadamente uma categoria de doenças peri-implantares, e defeitos na categorização, diagnóstico e facilidade de implementação, surgiu a necessidade de elaboração de uma nova classificação que conseguisse ultrapassar essas limitações. Assim, com base em informações de estudos populacionais e prospetivos, bem como de investigações científicas, foi proposto e aceite um novo esquema de classificação no Workshop

Mundial, com a denominação “Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares”, que se subdivide em quatro categorias: Saúde periodontal, doenças e condições gengivais; outras condições que afetam o periodonto; Doenças e condições peri-implantares e Periodontite. Nesta última categoria incluem-se as formas de doença “Periodontite crônica” e “Periodontite agressiva”, que deixaram de ser consideradas como duas doenças separadas pela ausência de diferenças na etiologia e fisiopatologia da doença (Papapanou et al., 2018).

Assim, a categoria “Periodontite” abrange três formas distintas da mesma: a Periodontite necrosante, a Periodontite como manifestação de doenças sistêmicas e a Periodontite. Para a identificação de uma situação de periodontite deverão ser cumpridos três requisitos: o paciente deverá ser identificado como um caso de periodontite, com evidência de perda de inserção clínica, sendo esta a sua principal manifestação; reconhecimento do tipo específico de periodontite e, por fim, descrição clínica de sinais que possam comprometer a atuação a nível clínico, com repercussões a nível oral e sistêmico, bem como o prognóstico (Papapanou et al., 2018). Esta categoria rege-se, assim, por um sistema de classificação com base em estádios e graus da doença (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

O estágio depende da gravidade da doença na sua apresentação e da complexidade no tratamento da mesma, englobando quatro categorias (I, II, III, IV), crescente no sentido de pior prognóstico e complexidade no tratamento. Subdivide-se em: severidade, complexidade, extensão e distribuição. Avalia vários parâmetros, nomeadamente a perda de inserção clínica, a percentagem e a quantidade de perda óssea, visível no RX, a perda dentária, a PS, o tipo de perda óssea, a presença de defeitos de crista e de furca e fatores de complexidade que contribuem, de forma negativa, para o agravamento do estágio de periodontite (estádios III e IV). Avalia ainda a extensão e distribuição da doença, mediante a percentagem de abrangência geral ou localizada. Está descrito de forma pormenorizada na Tabela 1 quais os parâmetros clínicos de referência que permitem determinar em que estágio de periodontite se encontra o paciente (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Tabela 1. Classificação da Periodontite com base no estágio. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).

ESTÁDIO de Periodontite		Estádio I	Estádio II	Estádio III	Estádio IV
Severidade	CAL Interproximal	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Perda óssea RX	1/3 coronal (< 15%)	1/3 coronal (15-30%)	Até 1/2 ou até 1/3 apical da raiz	Até 1/2 ou até 1/3 apical da raiz
	Perda Dentária	Não existe perda dentária devido à Periodontite		≤ 4 dentes perdidos devido à Periodontite	≥ 5 dentes perdidos devido à Periodontite
Complexidade	Local	- Máxima PS ≤ 4 mm	- Máxima PS ≤ 5 mm	<u>Em adição ao estágio II de complexidade:</u> - PS ≥ 6 mm - Perda óssea vertical ≥ 3 mm - Defeitos de furca (II ou III) - Defeitos de crista moderados	<u>Em adição ao estágio III de complexidade:</u> Necessidade de reabilitação complexa por: - Disfunção mastigatória - Trauma oclusal 2° (mobilidade ≥ 2) - Defeitos de crista severos - Colapso de mordida, má posição dentária, migração patológica - < 20 dentes remanescentes
		- Perda óssea predominantemente horizontal	- Perda óssea predominantemente horizontal		
Extensão e Distribuição		Para cada estágio, descrever a extensão como LOCALIZADA (< 30% dos dentes envolvidos), GENERALIZADA ou PADRÃO MOLAR/INCISIVOS			

Por outro lado, o grau permite uma avaliação da história da taxa de progressão da periodontite, antecipação de eventual insucesso do tratamento periodontal, avaliação do risco de progressão e ainda avaliação do risco de que a doença ou o seu tratamento possam afetar negativamente a saúde geral do paciente. Subdivide-se em três categorias (A, B e C), nas quais se incluem os critérios primários, com base na evidência direta ou indireta de progressão da doença, e modificadores de grau. Inicialmente, todos os pacientes com periodontite devem ser categorizados como grau B, e apenas se modifica esse grau de acordo com as evidências diretas e indiretas de progressão. A evidência direta de progressão baseia-se na informação longitudinal obtida através da perda óssea visível em radiografias antigas disponíveis, ao passo que a evidência indireta de progressão se rege pela determinação da percentagem de perda óssea no dente mais comprometido, em função da idade. Por último, os modificadores de grau incorporam fatores de risco, como os hábitos tabágicos e a Diabetes Mellitus (DM), que contribuem para a modificação do grau. Na Tabela 2 estão evidenciados os parâmetros de referência clínicos que permitem determinar o grau de periodontite que o paciente apresenta (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Tabela 2. Classificação da Periodontite com base no grau. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).

GRAU de Periodontite			Grau A Taxa de Progressão Baixa	Grau B Taxa de Progressão Moderada	Grau C Taxa de Progressão Rápida
Critérios primários	Evidência Direta de progressão	Informação longitudinal (perda óssea rx ou CAL)	Evidência de nenhuma perda em 5 anos	< 2 mm em 5 anos	≥ 2 mm em 5 anos
	Evidência Indireta de progressão	% perda óssea/idade	< 0,25	0,25 a 1	> 1
		Fenótipo do caso	Depósitos densos de biofilme com níveis baixos de destruição	Destruição proporcional com os depósitos de biofilme	Destruição excede o que seria expectável com os depósitos de biofilme / Padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão e/ou doença de início precoce
Modificadores de grau	Fatores de Risco	Hábitos Tabágicos	Não fumador	<10 cigarros/dia	> 10 cigarros/dia
		Diabetes	Normoglicémico	HbA1c < 7% em diabéticos	HbA1c ≥ 7% em diabéticos

A forma localizada de “Periodontite agressiva” na antiga “Classificação de Doenças e Condições Periodontais” de 1999, de acordo com o novo sistema de classificação com base em estádios e graus, classifica-se como “Periodontite Estádio III ou IV Grau C, padrão incisivo-molar” dadas as características específicas que evidencia. Surge no início da puberdade em adolescentes saudáveis, caracteriza-se pela rápida perda de inserção clínica e destruição óssea alveolar ao redor dos dentes molares e/ou incisivos, apresenta uma maior prevalência em indivíduos afrodescendentes e evidencia uma predisposição genética visível pelo seu padrão de agregação familiar (de Carvalho et al., 2009; Shaddox et al., 2021; Wankhede et al., 2017).

1.6 Fatores de risco

A periodontite consiste numa doença patofisiológica diversa que para além de resultar de uma relação entre o fator etiológico principal, a placa bacteriana, e a resposta imune do hospedeiro, está ainda dependente de outros fatores de risco (Nazir, 2017; Suzuki & Yamada, 2022; Wankhede et al., 2017). Esses fatores possuem um grande impacto pela sua contribuição no início e progressão da DP, pelo que o conhecimento detalhado de como influenciam a doença e a resposta ao tratamento permite concluir sobre

quais os fatores que deverão ser tidos em consideração no momento da classificação da periodontite (Kumar, 2019; Tonetti et al., 2018; Trevilatto et al., 2011).

Podem subdividir-se em fatores de risco modificáveis, geralmente de natureza ambiental ou comportamental, nos quais se incluem o tabagismo, a dieta, a má higiene oral, a DM, a medicação, as alterações hormonais no gênero feminino e o *stress*, e não modificáveis, intrínsecos ao indivíduo, que abrangem a idade, o gênero, a etnia e a predisposição genética (Kiani et al., 2009; Nazir, 2017).

Existem ainda outros fatores de risco, considerados locais, dos quais se podem destacar o trauma oclusal e irregularidades da superfície dentária, como concavidades, sulcos e fissuras (Suzuki & Yamada, 2022).

Relativamente aos fatores de risco modificáveis, as evidências sugerem que o tabagismo altera a flora microbiana oral, elevando o número de determinados microrganismos periodontais, bem como exerce efeitos adversos no periodonto (Genco & Borgnakke, 2013; Nazir, 2017). Pensa-se ainda que pode inibir a cicatrização e alterar a resposta imune do hospedeiro, através do aumento da produção de TNF- α no fluido crevicular gengival (FCG), por parte dos macrófagos. Relativamente à interleucina-1 β (IL-1 β), não existe consenso na literatura atual no que diz respeito ao aumento ou diminuição da sua concentração no FCG, por parte das células mononucleares gengivais, em resposta ao tabagismo (Churg et al., 2009; Cullinan et al., 2001; Genco & Borgnakke, 2013).

A DM desempenha um papel crucial no início e progressão da DP, podendo alterar a resposta imunológica do paciente e, assim, aumentar o risco e a gravidade de desenvolver periodontite (Stanko & Holla, 2014). Verificou-se uma concentração mais elevada de mediadores inflamatórios, nomeadamente citoquinas, em pacientes diabéticos (Hegde & Awan, 2019; Nazir, 2017).

A predisposição genética juntamente com a resposta do hospedeiro, as bactérias patogénicas e os fatores ambientais, tornam o indivíduo mais suscetível ao desenvolvimento da doença (de Carvalho et al., 2009; Nazir, 2017).

1.7 Periodontite e as doenças sistêmicas

A periodontite tem evidenciado, após inúmeras pesquisas e estudos, uma forte associação com várias condições sistêmicas, nomeadamente com a doença cardiovascular e a DM. Sabe-se que a associação entre a DP e determinadas doenças sistêmicas é bidirecional, ou seja, a presença de periodontite poderá causar efeitos sistêmicos adversos, ao passo que as doenças sistêmicas poderão aumentar o risco ou predispor para o aparecimento da doença (Hegde & Awan, 2019; Nazir, 2017). O impacto sistêmico da periodontite é resultante da disseminação de microrganismos periodontopatogênicos e de mediadores inflamatórios locais dos tecidos periodontais para outras regiões do corpo (Hegde & Awan, 2019; Nagpal et al., 2015).

Relativamente à relação entre a periodontite e a doença cardiovascular, a bacteremia transitória resultante da migração dos microrganismos patogênicos para a corrente sanguínea estimula a resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, potencia a formação e maturação de placas de ateroma. Vários estudos a nível celular e molecular demonstraram que as interações celulares envolvidas em ambas as doenças são semelhantes (Hegde & Awan, 2019). Além disso, verificou-se a presença aumentada de citocinas inflamatórias, como a IL-1, a IL-2, a IL-6, a IL-8 e a proteína C-reativa, quer nas lesões ateromatosas quer em pacientes que apresentam periodontite (Almeida et al., 2006; Hegde & Awan, 2019).

No que concerne à DM, esta pode alterar a resposta imunológica do paciente, aumentando o risco e exacerbando a gravidade da DP. Por outro lado, a periodontite pode agravar a resistência à insulina e afetar o controle metabólico da DM, levando à hiperglicemia e diabetes tipo II (Almeida et al., 2006; Stanko & Holla, 2014). Adicionalmente, a elevação dos microrganismos na corrente sanguínea, potenciada pela periodontite, poderá provocar algumas complicações, tais como uma bacteremia ou endotoxemia, com conseqüente elevação dos marcadores inflamatórios séricos. Conclui-se, assim, que ambas as condições apresentam uma relação bidirecional (Hegde & Awan, 2019).

Neste sentido, e considerando a associação entre a periodontite e determinadas doenças como biologicamente plausível, pode-se enfatizar a necessidade de adoção de estratégias de prevenção de saúde oral para que haja uma redução na incidência e prevalência da periodontite e, assim, minimizar o efeito no aparecimento destas doenças sistêmicas (Hegde & Awan, 2019).

2. O papel das citocinas inflamatórias

As citocinas inflamatórias são moléculas de sinalização celular de estrutura peptídica, hidrossolúveis, variam entre 8 e 30 kDa e são produzidas maioritariamente por macrófagos. No entanto, outras células nucleadas, como monócitos, fibroblastos e células epiteliais poderão também estar na sua origem (de Oliveira et al., 2011; Linhartova et al., 2020; Greenstein & Hart, 2002; Salazar-Pelaéz et al., 2012).

Estas moléculas ligam-se a recetores específicos de outras células, desencadeiam respostas celulares e, assim, não só influenciam a atividade, diferenciação e proliferação das células imunológicas, como também regulam a produção e atividade de outras citocinas inflamatórias (de Oliveira et al., 2011; Kornman et al., 1997; Vijayalakshmi et al., 2010).

Nesse sentido, as citocinas atuam como moduladoras da resposta inflamatória ao mediarem as respostas imunes inatas e, assim, permitem a regulação da resposta do hospedeiro à infeção microbiana (Deo & Bhongade, 2010; Kornman et al., 1997; Salazar-Pelaéz et al., 2012).

Essa regulação do hospedeiro passa pela identificação de bactérias por meio de recetores do tipo Toll, que estabelecem uma ligação com padrões moleculares específicos associados a patógenos, como LPS's bacterianos das bactérias gram-negativas e fatores de virulência, culminando na produção de citocinas inflamatórias (Graves, 2008; Hajishengallis et al., 2004; Trevilatto et al., 2011). De seguida, as citocinas, através de uma cascata de sinalização intracelular, permitem a ativação de fatores de transcrição, bem como a produção de várias citocinas que, direta ou indiretamente, estimulam a formação de osteoclastos (Graves, 2008).

2.1 Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos B, células dendríticas, células epiteliais e células endoteliais em resposta a estímulos inflamatórios, possuindo várias atividades relacionadas com a regulação do sistema imune inato, com a cicatrização, imunidade e inflamação. A IL-1 está diretamente implicada na patogénese de doenças como a periodontite e a peri-

implantite (Gonçalves et al., 2018; Mesa et al., 2017; Moreira et al., 2005; Salazar-Pelaéz et al., 2012; Shaddox et al., 2021).

O papel da IL-1 na patogénese da periodontite passa pela sua capacidade reguladora no início e progressão da resposta do hospedeiro à infeção microbiana (Graves & Cochran, 2003; Moreira et al., 2005; Toy & Uslu, 2019).

É responsável pelo aumento de moléculas de adesão que facilitam a migração de leucócitos para os tecidos, ativação de linfócitos T e B, modulação do catabolismo da matriz extracelular e produção de outras citocinas, nomeadamente TNF- α . Essas citocinas sinalizam outras células (como os fibroblastos) para a produção de PGE₂, responsáveis pela destruição óssea e MMP's, associadas à degradação do tecido conjuntivo (Cullinan et al., 2001; Deng et al., 2013; Dinarello, 2002; Feng & Liu, 2020; Graves & Cochran, 2003; Greenstein & Hart, 2002).

A família de genes da IL-1 é constituída por vários genes, mas apenas três regulam a sua produção. São eles os genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN que codificam, respetivamente, as proteínas interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β e o antagonista do recetor da interleucina-1 (IL-1Ra) (Moreira et al., 2005; Nicklin et al., 1994; Toy & Uslu, 2019). Esta família, para além das proteínas supramencionadas, é ainda composta por dois tipos de recetores de membrana, o IL-1 recetor I (IL-1RI) e o IL-1 recetor II (IL-1RII) (Mesa et al., 2017).

2.1.1 Interleucina-1 α e Interleucina-1 β (IL-1 α e IL-1 β)

A IL-1 apresenta duas isoformas principais bioativas: a IL-1 α e a IL-1 β , sendo esta última considerada mais potente e patogénica. Exercem uma atividade biológica idêntica ao se ligarem ao IL-1RI ativo. Também poderão ligar-se ao IL-1RII, ainda que sem envolvimento na transdução de sinal, ao contrário do primeiro (Deng et al., 2013; Deo & Bhongade, 2010).

Ao contrário da IL-1 α , a IL-1 β não é bioativa, sendo produzida como um precursor inativo (pró-IL-1 β). A conversão para a sua forma biologicamente ativa requer primeiramente a sua clivagem por uma enzima, a caspase-1 e, de seguida, uma ativação por parte de complexos multiproteicos denominados inflamassomas (Aral et al., 2020; Deo & Bhongade, 2010).

A IL-1 α é maioritariamente produzida por queratinócitos provenientes do epitélio juncional ou da bolsa, ao passo que a IL-1 β é produzida principalmente por macrófagos

e fibroblastos ativos, mas também por células epiteliais orais, osteoblastos, células T ativadas e condrócitos (Aral et al., 2020; Dinarello, 2002)

A IL-1 α atua como um regulador de eventos intracelulares e como mediador da inflamação local (Dinarello, 2002), enquanto a IL-1 β permite a ativação de células endoteliais e a adesão de eosinófilos, potenciando a resposta inflamatória (Aral et al., 2020). Para além disso, a IL-1 β estimula a produção de tromboxanos, colagénio, proteases, osteoclastos e ativa os fibroblastos e outras células nucleadas para produzirem PGE2 e MMP's, levando à reabsorção óssea (Aral et al., 2020; Greenstein & Hart, 2002; Slots, 1999).

Níveis aumentados de IL-1, especialmente de IL-1 β , foram observados no FCG de pacientes com DP, evidenciando uma associação com a gravidade da periodontite (Kiani et al., 2009; Kornman et al., 1997).

2.2 Antagonista do recetor da IL-1 (IL-1Ra)

O antagonista do recetor da IL-1 (IL-1Ra) consiste numa proteína anti-inflamatória inibidora competitiva dos recetores específicos de membrana da IL-1, inibindo, conseqüentemente, as funções de IL-1 α e IL-1 β (Graves & Cochran, 2003; Kornman et al., 1997; Mesa et al., 2017).

Ao suprimir a atividade destas citocinas, exerce uma ação anti-inflamatória e inibe a cascata de sinalização intracelular (Mesa et al., 2017; Trevilatto et al., 2011). Ao impedir a progressão do infiltrado de células inflamatórias em direção à crista alveolar, bem como a ação de osteoclastos, inibe a reabsorção óssea e a degradação do tecido conjuntivo, visível em várias doenças infecciosas e inflamatórias, como a periodontite (Deo & Bhongade, 2010; Mesa et al., 2017).

3. Polimorfismos genéticos

3.1 Definição

Os polimorfismos genéticos correspondem a alterações na sequência do DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Kinane & Hart, 2003; Toy & Uslu, 2019; Wankhede et al., 2017). Comparativamente com as mutações genéticas, são mais prevalentes e afetam pelo menos 1% da população (Al-Koofee & Mubarak, 2020). A sua prevalência varia entre populações e grupos étnicos e são considerados uma variante normal na população (Kinane & Hart, 2003; Toy & Uslu, 2019).

As alterações que ocorrem a nível da sequência de nucleotídeos podem não ter nenhum efeito, quando não há alteração dos aminoácidos e das proteínas codificadas, ou então possuir efeitos biológicos relevantes, quando uma sequência de aminoácidos de um codão é alterada, na região codificante e, conseqüentemente, há uma alteração na estrutura da proteína codificada, assim como na sua função. Esta alteração poderá originar uma proteína com a sua função gravemente alterada, resultando numa proteína disfuncional, ou apenas ligeiramente alterada (Kinane & Hart, 2003; Toy & Uslu, 2019).

Nesse último caso, uma alteração no funcionamento fisiológico, influenciada por determinados fatores ambientais (interações gene-ambiente) poderá resultar, direta ou indiretamente, em alterações nas imunidades inata e adaptativa. Para além disso, pode constituir um fator preventivo para o aparecimento de uma doença ou, contrariamente, aumentar o risco do seu aparecimento. Nesse caso, poderá causar diferenças fenotípicas na resposta inflamatória do indivíduo (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005).

A presença de polimorfismos a nível no genoma humano é variada, podendo estar presente nas seguintes regiões: promotor ou 5' *flanking region*, exões ou regiões codificadoras, intrões ou na região 3' UTR (3' *untranslated region*) (Takashiba & Naruishi, 2006).

Os polimorfismos genéticos podem subdividir-se em várias categorias, nomeadamente *single nucleotide polymorphism* (SNP), polimorfismos de repetição em *tandem*, que abrange *variable number of tandem repeats* (VNTR) e *short tandem repeat* (STR), polimorfismos de inserção ou deleção e *transposable element* (TE) (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Vijayalakshmi et al., 2010).

3.2 *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

A maioria dos polimorfismos que ocorre no genoma humano corresponde ao polimorfismo de nucleotídeo único ou *single nucleotide polymorphism* (SNP). Consiste numa variação genética de um único par de bases, envolvendo apenas um nucleotídeo, pelo que apenas permite combinações com dois alelos (Gonçalves et al., 2018; Koch & de Andrade, 2008; Sripichai & Fucharoen, 2007).

Constitui cerca de 90% das variações presentes no genoma humano e ocorre a cada 300 nucleotídeos, originando um total de vários milhões de SNP's ao longo de todo o genoma do indivíduo (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Salazar-Pelaéz et al., 2012; Sripichai & Fucharoen, 2007; Vijayalakshmi et al., 2010).

Este tipo de polimorfismo pode situar-se em várias regiões do genoma, nomeadamente na região codificante/exão, na região não codificante/intrão, na região 3' ou 5' não traduzida/*untranslated region* (3'/5' UTR) ou na região intergénica, situada entre genes adjacentes (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Salazar-Pelaéz et al., 2012). Considerando que apenas 3-5% das sequências de DNA codificam proteínas, é mais frequente que este polimorfismo se encontre presente nas regiões não codificantes (Sripichai & Fucharoen, 2007). Os SNP's têm sido relacionados com o aumento da suscetibilidade a doenças através da estimulação dos genes responsáveis pelas mesmas (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Trevilatto et al., 2011).

Para além disso, estes polimorfismos poderão ser marcadores biológicos úteis na identificação de uma doença, na eventual proximidade com os genes responsáveis pela mesma, bem como para a realização de estudos relativos a previsões genéticas (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Sripichai & Fucharoen, 2007).

3.3 *Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)*

O polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* ou *variable number of tandem repeats* (VNTR), também denominado minissatélites, consiste em inúmeras repetições lado a lado de sequências de DNA, espalhadas ao longo de todo o DNA. Cada repetição envolve uma pequena quantidade de pares de bases (pb), sendo que o número de pb repetidas difere de indivíduo para indivíduo (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Koch & de Andrade, 2008; Sartoretto & Farias, 2010). Como os VNTR podem estar situados

tanto em regiões codificadoras, regiões não traduzidas ou UTR's e regiões reguladoras próximas a um gene, a variação no comprimento desta sequência poderá evidenciar um impacto significativo na funcionalidade da mesma (Bakhtiari et al., 2021).

4. Relação dos polimorfismos genéticos e a periodontite

Existem vários polimorfismos em genes que possuem uma função na imunorregulação e metabolismo, como citocinas, recetores, reguladores metabólicos e proteínas associadas às respostas imunes inata e adaptativa, que têm sido estudados quanto à sua relação com o risco de desenvolvimento de periodontite. A influência de alterações nestes genes na periodontite varia mediante a população em consideração e o tipo de periodontite em causa, sendo que as discrepâncias verificadas entre estudos podem ser resultantes do critério de seleção de pacientes, da sua etnia e do reduzido tamanho da amostra. Nesse sentido, podem incluir-se os genes que influenciam a expressão da interleucina-4 (IL-4), IL-6, IL-8, interleucina-10 (IL-10), TNF- α , recetor gama Fc (Fc γ R), molécula CD14, recetores do tipo Toll, recetor de vitamina D (gene VDR), entre outros (Kinane & Hart, 2003; Shaddox et al., 2021; Toy & Uslu, 2019; Yoshie et al., 2007).

Os estudos que mencionam a associação de alterações nos genes da IL-6, da IL-8, da IL-10, do TNF- α , da molécula CD14, dos recetores do tipo Toll e do recetor de vitamina D (gene VDR) e a periodontite demonstraram resultados contraditórios, evidenciando, contudo, uma possível relação. Em relação aos genes da IL-4 e o Fc γ R, não existem dados suficientes na literatura que comprovem uma associação com o risco de aparecimento de periodontite (Laine et al., 2012; Toy & Uslu, 2019; Yoshie et al., 2007). Neste sentido, pode concluir-se que a associação dos polimorfismos presentes nestes genes e a ocorrência de periodontite apresenta correlações variáveis e inconclusivas, devendo ser realizados mais estudos e mais abrangentes para averiguar esta possível associação (Laine et al., 2012; Vijayalakshmi et al., 2010).

Ao contrário destes, os polimorfismos nos genes que codificam a IL-1, considerados marcadores da suscetibilidade para a periodontite, constituem os polimorfismos mais abrangentes e amplamente discutidos nos estudos que tentam relacionar os polimorfismos genéticos e a periodontite (Brodzikowska et al., 2019; Ding et al., 2012; Greenstein & Hart, 2002; Kiani et al., 2009; Yoshie et al., 2007).

A citocina IL-1, mediadora da resposta inflamatória, evidencia um papel na patogênese de variadas doenças inflamatórias, caracterizadas pelo aumento de inflamação, destruição tecidual e processos de reabsorção óssea. Neste sentido, a compreensão da sua influência nestas doenças, particularmente a periodontite, constitui uma temática de especial interesse (Brodzikowska et al., 2019; Kiani et al., 2009; Moreira et al., 2005; Salazar-Pelaéz et al., 2012).

Neste sentido, a família de genes da IL-1 encontra-se localizada no braço longo do cromossoma 2, na posição 2q13, e engloba três genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN, que codificam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra, respetivamente (Kornman et al., 1997; Moreira et al., 2005; Salazar-Pelaéz et al., 2012).

As proteínas IL-1 α e IL-1 β têm vindo a desempenhar um papel pró-inflamatório em várias doenças humanas, nomeadamente doenças infecciosas, ao passo que o IL-1Ra constitui um inibidor competitivo endógeno das proteínas pró-inflamatórias e, pelo contrário, exerce um efeito anti-inflamatório (Mesa et al., 2017).

O polimorfismo do gene IL-1A, localizado na posição -889 da região promotora (reguladora), é caracterizado pela substituição de uma base azotada citosina (C) por uma base timina (T), resultando, assim, um alelo diferente daquele que contém a sequência normal do gene, denominado alelo 2 (Shirodaria et al., 2000). Por outro lado, o polimorfismo do gene IL-1B, situado na posição +3954, no exão 5 do mesmo gene, caracteriza-se pela mesma substituição de pb, de uma C para T (Pociot et al., 1992). Ambos os polimorfismos descritos são denominados de SNP e podem originar dois possíveis alelos: alelos C e T.

Segundo a evidência científica, a presença do alelo alterado (alelo T), associada ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, resulta no aumento da produção da proteína correspondente, IL-1 β , resultando numa resposta mais marcada na presença do mesmo estímulo. Em indivíduos homozigóticos para o alelo T, a produção desta proteína aumenta quatro vezes mais do que indivíduos homozigóticos para o alelo C. Assim como para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, a presença do alelo T relaciona-se com níveis mais elevados da proteína IL-1 α em tecidos de pacientes portadores da doença, estando relacionado, em ambos os polimorfismos, com a incidência e gravidade da periodontite (Kiani et al., 2009; Kornman et al., 1997; Moreira et al., 2005; Papapanou et al., 2001).

O polimorfismo situado no intrão 2 do gene IL-1RN contém uma sequência com um número variável de repetições em *tandem* (VNTR), constituindo um polimorfismo

penta-alélico de 86 pb (Danis et al., 1995). Estão descritos cinco alelos distintos associados a este polimorfismo, mediante o número de vezes em que essa sequência se repete: alelo 1 de 412 pb, alelo 2 de 240 pb, alelo 3 de 326 pb, alelo 4 de 498 pb e alelo 5 de 584 pb, com 4, 2, 3, 5 e 6 repetições, respetivamente (Kornman et al., 1997).

Segundo Santtila et al. (1998), a presença do alelo 2, considerado o alelo alterado, no gene IL-RN está associada à redução da proteína correspondente IL-1Ra, bem como ao aumento da produção de IL-1 β *in vitro*.

O estudo de Kornman et al. (1997) foi o primeiro estudo realizado a estudar a relação entre os polimorfismos genéticos e a periodontite, tendo estimulado a realização de estudos subsequentes acerca do mesmo tema. Nesse estudo, foi demonstrada uma associação entre a presença simultânea do alelo 2 associado aos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com o risco agravado de desenvolver periodontite severa em pacientes caucasianos não fumadores. A ocorrência simultânea de, pelo menos, um alelo 2 em ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ foi designada de genótipo positivo.

A revisão sistemática e meta-análise efetuada por Nikolopoulos et al. (2008) incluiu cinquenta e três estudos e observou uma associação entre a presença do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T e o aparecimento de periodontite crónica (PC) em caucasianos, evidenciando que a presença do alelo 2 em ambos os polimorfismos (genótipo positivo) apresentava um efeito superior comparativamente com o efeito isolado de cada polimorfismo.

A revisão sistemática e meta-análise realizada por Karimbux et al. (2012) incluiu vinte e sete estudos, dos quais dez mostraram uma associação entre a presença de genótipo positivo e a incidência e gravidade da inflamação periodontal.

No entanto, a revisão sistemática realizada por Huynh-Ba et al. (2007) demonstrou associações controversas entre a presença de genótipo positivo e a progressão da DP, bem como a sua influência nos resultados do tratamento.

Têm sido realizados variados estudos com o intuito de perceber a associação entre os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T com o desenvolvimento da periodontite.

Karimbux et al. (2012), na sua revisão sistemática e meta-análise, verificaram ainda uma associação positiva entre a presença isolada de ambos os polimorfismos dos genes IL-1A ou IL-1B com o risco de desenvolvimento de PC em indivíduos caucasianos.

A meta-análise desenvolvida por da Silva et al. (2017) incluiu vinte e um estudos caso-controle com indivíduos de várias raças e concluiu que o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ estava associado com o risco de desenvolvimento de PC, em caucasianos. Verificou-se

ainda que o alelo T foi associado a casos de periodontite, ao passo que o alelo C a casos de saúde.

Outra meta-análise mais recente, realizada por Feng & Liu (2019), incluiu doze estudos de caso-controle e concluiu que o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T estava relacionado com a suscetibilidade para o desenvolvimento de PC, nas populações europeia, africana e americana.

A meta-análise desenvolvida por Deng et al. (2012), que englobou trinta e seis estudos, observou uma associação entre o polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T e o risco de aparecimento de PC.

De acordo com a meta-análise de da Silva et al. (2018), que incluiu cinquenta e quatro estudos, a presença do polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T aumentou o risco de desenvolvimento de PC nas populações caucasiana, asiática e mista, não se tendo verificado associação em africanos. Verificou-se ainda que o alelo T foi associado a casos de periodontite, ao passo que o alelo C a casos de saúde.

Vários estudos de caso-controle isolados mostram resultados contraditórios em relação ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T, podendo ser resultante da variedade de grupos étnicos (Isaza-Guzman et al., 2016; Zuccarello et al., 2014).

No que concerne ao polimorfismo do gene IL-1RN, estudos de associação realizados evidenciaram resultados contraditórios entre a associação desse polimorfismo com a suscetibilidade para o desenvolvimento de PC, bem como as suas formas agressivas (Mesa et al., 2017). A única meta-análise relativa a este polimorfismo, realizada por Ding et al. (2012), descreveu resultados não consensuais, que variaram de acordo com a população em estudo. Essa meta-análise era constituída por dezanove estudos e concluiu que este polimorfismo pode contribuir para um risco aumentado de desenvolver PC na população asiática, sendo que na população caucasiana não se verificou essa associação. Uma das possíveis explicações para os resultados obtidos foi o reduzido tamanho da amostra. Verificou-se ainda um risco diminuído de desenvolvimento de formas agressivas da doença na população caucasiana.

Relativamente às formas mais agressivas de periodontite, de acordo com duas revisões sistemáticas, não se verificou associação dos polimorfismos supramencionados com as mesmas, independentemente da etnia considerada (Chen et al., 2015; Ding et al., 2012).

Muitos estudos têm vindo a ser publicados, que comprovam uma possível associação entre um genótipo particular da IL-1 e o risco de desenvolvimento de

diferentes formas de periodontite. Dada a elevada variedade de polimorfismos genéticos que podem influenciar a suscetibilidade individual e as diferenças étnicas entre populações, é necessário o desenvolvimento de mais estudos de larga escala, multiétnicos e que envolvam a relação da componente genética com outros fatores ambientais (exemplo: tabagismo), de forma a se entender a robustez da associação destes polimorfismos com a doença (Brodzikowska et al., 2019; Ding et al., 2012; Feng & Liu, 2020; Gonçalves et al., 2018).

Existem cada vez mais estudos que indicam que a variabilidade interindividual na resposta imunoinflamatória a nível do hospedeiro, associada ao aparecimento de doenças infecciosas, como a periodontite, é influenciada pela componente genética. Nesse sentido, têm sido efetuadas várias pesquisas para tentar compreender a influência da presença de alelos específicos (mutados) na ocorrência da doença, embora não se comprove a existência de uma correlação direta. No entanto, acredita-se que a compreensão do perfil de suscetibilidade genética de cada indivíduo e de que forma a sua extensão contribui para a patogénese da periodontite poderá ser o início para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento da doença, com repercussões a nível da saúde pública, científico e, principalmente, terapêutico (Brodzikowska et al., 2019; Kinane & Hart, 2003; Toy & Uslu, 2019; Yoshie et al., 2007).

5. Análise laboratorial para a genotipagem de polimorfismos genéticos

5.1 Técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR)

A reação de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica laboratorial *in vitro* simples, rápida e versátil que tem vindo a ser usada com fins de deteção, quantificação e tipagem de agentes microbianos intervenientes num número crescente de doenças (Garibyan & Avashia, 2013; Koch & de Andrade, 2008; Verma et al., 2014). Consiste na amplificação seletiva de sequências de DNA a partir de amostras de DNA total previamente extraídas, mesmo quando a sua quantidade é reduzida (Garibyan & Avashia, 2013; Joshi & Deshpande, 2011).

A técnica é feita a partir de moléculas de DNA, de fita dupla e com a sequência a ser amplificada, *primers*, nucleotídeos ou *deoxynucleosides triphosphate* (dNTP's) e enzimas DNA polimerase. Os *primers* consistem em sequências curtas de nucleotídeos

de fita simples que deverão ser complementares à sequência base de DNA para, desta forma, se unirem à mesma e, assim, amplificarem o DNA. Na presença das quatro bases nucleotídeas e da DNA polimerase, esta inicia a formação do produto de PCR a partir da região delimitada pelos *primers* (Garibyan & Avashia, 2013; Koch & de Andrade, 2008; Powledge, 2004).

Neste sentido, a reação de PCR consiste em vários ciclos de amplificação de DNA e é constituída por 3 etapas principais: desnaturação, hibridação/*annealing* e extensão. Na primeira etapa, a solução que contém o DNA é aquecida a altas temperaturas (95 graus celsius (°C)), acima do ponto de fusão das fitas de DNA molde, para que se dê a desnaturação do mesmo. Desta forma, são rompidas as ligações de hidrogénio entre as bases complementares, sendo produzidas duas moléculas de DNA de fita simples. A segunda etapa consiste na hibridação ou *annealing* na qual os *primers* se dissociam do seu modelo e se ligam às suas bases complementares no DNA de fita simples, obtido na etapa anterior, através de ligações de hidrogénio DNA-DNA estáveis. Esta fase ocorre a uma temperatura inferior à etapa de desnaturação (cerca de 50-60°C). Por último, na fase de extensão a temperatura volta a elevar-se, dependendo da DNA polimerase utilizada, sendo a sua temperatura ótima de 72°C. Nesta fase, ocorre a síntese de uma nova fita de DNA, complementar à fita de DNA molde, a partir da adição de dNTP's à região de *primers* anteriormente emparelhados, permitindo assim a sua extensão. No final de cada ciclo ocorre uma duplicação do número de cópias da fita de DNA pretendida (Garibyan & Avashia, 2013; Joshi & Deshpande, 2011; Kornman et al., 1997; Powledge, 2004; Verma et al., 2014).

A automatização do processo só foi possível devido à escolha de uma enzima DNA polimerase que conseguisse suportar altas temperaturas sem sofrer desnaturação. Neste sentido, a introdução da enzima Taq polimerase, extraída e produzida a partir de bactérias geneticamente modificadas, que se evidencia em várias formas de apresentação comercial, veio rentabilizar o procedimento, uma vez que suporta repetições de oscilação de temperatura (Joshi & Deshpande, 2011; Powledge, 2004; Verma et al., 2014).

5.2 Técnica de *Real-Time* PCR

A técnica de PCR em tempo real ou *Real-time* PCR consiste numa melhoria da técnica de PCR convencional, possibilitando a amplificação de um fragmento de DNA e, ao mesmo tempo, quantificar o produto amplificado. Permite monitorizar, ciclo a ciclo, de forma sucessiva e com alta sensibilidade e especificidade a emissão de fluorescência resultante do processo de amplificação das sequências de DNA alvo. É uma técnica que tem vindo a ser bastante utilizada, por exemplo, para a genotipagem de SNP's em apenas uma etapa e, assim, detetar a presença de genes e alelos específicos (Graves & Cochran, 2003; Kralik & Ricchi, 2017; Reuter et al., 2005).

Comparativamente com a técnica de PCR convencional, esta técnica apresenta algumas vantagens, nomeadamente descartar a necessidade de interpretação através de análise eletroforética, minimizar o risco de contaminação cruzada, uma vez que não exige manipulação adicional após a amplificação, e aumento da velocidade de execução da técnica (Kralik & Ricchi, 2017; Walker, 2002).

Para a concretização deste procedimento é necessário recorrer aos mesmos componentes utilizados na reação de PCR convencional, tais como moléculas de DNA, dNTP's, enzimas DNA polimerase e *primers forward* e *reverse*, com uma modificação que consiste na adição de sondas de hidrólise oligonucleotídicas curtas específicas para a sequência de DNA pretendida, marcadas com corantes de fluorescência (exemplo: ensaio Taqman®). Além disso, é ainda necessário utilizar um termociclador, com um sistema ótico incorporado, assim como um computador com *software* específico para a recolha de dados e análise no término da reação (Kralik & Ricchi, 2017; Reuter et al., 2005).

Neste sentido, a reação de *Real-time* PCR consiste em vários ciclos de amplificação de DNA e é constituída pelas mesmas 3 etapas da técnica de PCR convencional: desnaturação, hibridação/*annealing* e extensão (Kralik & Ricchi, 2017). Previamente à execução do processo de amplificação, o DNA é sujeito a um tratamento com uracil-DNA glicosilase (UDG) para diminuir a probabilidade de contaminação, resultante da presença de produtos residuais indesejados da preparação (Pierce & Wangh, 2004).

Existem dois sistemas principais para a visualização de fragmentos de DNA amplificados: corantes de DNA fluorescentes não específicos e sondas marcadas com fluoróforos, sendo os ensaios TaqMan® e Molecular Beacons os mais usados devido à sua maior especificidade. Utilizam uma sonda de transferência de energia de ressonância de

fluorescência como meio de detecção do produto de DNA amplificado, sendo que a fluorescência é medida após cada ciclo e a sua intensidade reflete a quantidade de DNA amplificado no momento (Kralik & Ricchi, 2017).

No caso específico do ensaio Taqman[®], a sonda TaqMan, complementar a uma das fitas de DNA, é marcada na sua extremidade 5' e 3' por um *reporter* fluorescente e um *quencher*, que inibe a fluorescência do primeiro dado a sua proximidade ao mesmo. Contudo, após a hibridação dos *primers* à sequência alvo, a sonda TaqMan é hidrolisada pela atividade da enzima Taq DNA polimerase que, ao adicionar dNTP's para a síntese da nova cadeia de DNA, degrada a sonda na extremidade 5' e permite, assim, a liberação de fluorescência proveniente do *reporter*. Dessa forma, a acumulação de fluorescência é proporcional à quantidade de amplificação do DNA presente que é, posteriormente, detetada pelo sistema incorporado no termociclador (VanGuilder et al., 2008; Walker, 2002) (Figura 1).

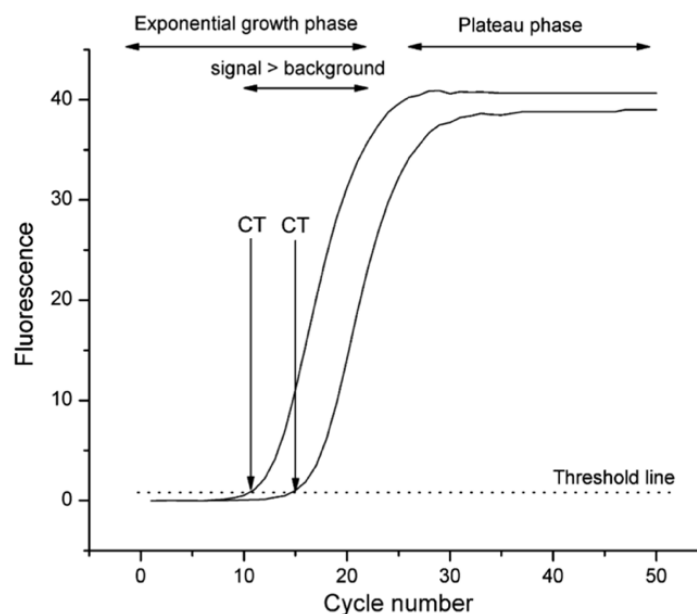


Figura 1. Curvas de amplificação de uma reação de *Real-time* PCR. Autorizado por (Kubista et al., 2006) (Anexo 4).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo avaliar a possível relação entre a presença de polimorfismos dos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN e a presença de periodontite. Foi efetuado numa população de pacientes caucasianos da Clínica Dentária Egas Moniz.

São apresentadas duas hipóteses experimentais para este estudo. Consideram-se como hipótese nula (H_0) e hipótese alternativa (H_1) as seguintes premissas:

- H_0 : Não se verifica uma associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra e a presença de periodontite;
- H_1 : Verifica-se uma associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra e a presença de periodontite.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM) (Anexo 1), tendo sido conduzido segundo as regras da Declaração de Helsínquia, revista em 2013, respeitando a proteção de dados dos pacientes.

Foi entregue a todos os pacientes, que reuniam as características para serem incluídos no estudo, um Termo de Consentimento Informado, o qual foi posteriormente assinado (Anexo 2). A cada paciente foi atribuído um número para identificação e anonimato do mesmo.

A confidencialidade dos dados foi preservada, tendo as amostras recolhidas sido unicamente utilizadas para análise laboratorial e inclusão neste estudo que, após ter sido concluído, foram descartadas.

2. Tipo de estudo e local de realização

O presente estudo – transversal controlado analítico –, foi realizado na Clínica Dentária Egas Moniz, no IUEM, onde se recrutaram pacientes e se realizou a recolha de amostras. No Laboratório de Biologia Molecular do IUEM foi realizada a análise genética.

3. Seleção da amostra

A amostra incluída neste estudo é composta por 2 grupos principais. O primeiro grupo, de estudo, é constituído por pacientes com periodontite diagnosticada (perda de inserção em duas ou mais localizações interproximais não adjacentes ou perda de inserção de 3 mm ou mais na localização vestibular ou lingual/palatina de pelo menos 2 dentes, excluindo as seguintes causas não periodontais: 1) recessão gengival de origem traumática; 2) cárie dentária com extensão até à zona cervical do dente; 3) presença de perda de inserção na face distal de um segundo molar, associada ao mau posicionamento ou à extração de terceiro molar; 4) lesão endo-perio com drenagem através do periodonto marginal; ou 5) ocorrência de fratura radicular vertical)). O segundo grupo, de controlo,

é formado por pacientes que apresentem saúde periodontal (sem perda de inserção, PS até 3 mm, hemorragia à sondagem em menos de 10% das localizações e sem perda óssea radiográfica) (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018). A inclusão dos pacientes em cada um dos grupos foi realizada de acordo com as características clínicas definidas na nova classificação das Doenças Periodontais e Peri-implantares (Tonetti et al., 2018).

Esta investigação está integrada num projeto CiiEm Investiga com o título (ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA IL-1 E DO IL-1Ra COM A PERI-IMPLANTITE), que se iniciou em 2019. Para análise estatística da presente investigação, utilizaram-se 26 amostras que já tinham sido previamente recolhidas e submetidas a análise genética, às quais se adicionaram as amostras respeitantes a este estudo, recolhidas entre novembro de 2021 e julho de 2022. Assim, obteve-se um total de 104 amostras, tendo sido excluídas 4, o que resultou num valor final de 100 amostras.

Esta investigação abrange todos os pacientes que compareceram na consulta de periodontologia da clínica Dentária Egas Moniz durante esse período de tempo, e que cumpriam os critérios de inclusão. Assim, a amostra de pacientes perfaz um total de 100 indivíduos (n=100), dos quais 38 pertencem ao grupo controlo (saúde periodontal) e 62 foram incluídos no grupo doença (periodontite diagnosticada).

A inclusão ou exclusão dos pacientes no estudo foram determinadas mediante resposta a um conjunto de questões apresentadas sobre a forma de questionário (Anexo 3). Esse questionário tinha como objetivo recolher informações e dados referentes de cada paciente. Em caso de inclusão no estudo, o paciente teve de assinar um consentimento informado (Anexo 2) e, de seguida, procedeu-se à recolha das amostras.

As avaliações clínicas neste estudo foram executadas por três operadores: o orientador, coorientador e a orientanda, tendo sido feita uma calibração prévia. A recolha das amostras, que consistiu na recolha de células da mucosa jugal com auxílio de um omniswab (Whatman FTA), foi realizada pelo coorientador e a orientanda. Os pacientes candidatos foram submetidos, como é habitual em todas as consultas de periodontologia, a uma avaliação do índice de placa e gengival (4 localizações). O exame de sondagem periodontal foi realizado em todos os dentes (6 localizações), quando se tratava de consultas de diagnóstico, reavaliação e suporte periodontal.

De todos os pacientes selecionados aleatoriamente na consulta de periodontologia, 37 foram excluídos previamente por apresentarem pelo menos um ou mais critérios de exclusão, não tendo sido efetuada colheita de amostra nestes pacientes.

4. Critérios de inclusão

Neste estudo incluíram-se pacientes de ambos os géneros, com idade superior a 18 anos, pacientes com pais e avós de origem caucasiana, pacientes com periodontite diagnosticada e pacientes que consintam participar no estudo e assinem o Consentimento Informado.

5. Critérios de exclusão

Como critérios de exclusão temos pacientes que apresentem qualquer condição sistémica que possa afetar o sistema imunológico, grávidas, pacientes que tenham sido submetidos a tratamento periodontal na zona a avaliar e pacientes que tenham tomado antibióticos ou anti-inflamatórios de forma crónica nos últimos 6 meses.

6. Recolha de amostras

As amostras biológicas, contendo células da mucosa oral, foram recolhidas com recurso a um omniswab (Whatman FTA), que se passou na mucosa jugal, de ambos os lados, durante cerca de 30 segundos (Figura 2). Após a recolha das amostras, estas foram inseridas dentro de tubos “ependorf” de 2 ml e, de seguida, colocadas de imediato em gelo.



Figura 2. Recolha de amostras da mucosa jugal com recurso a um omniswab (Whatman FTA).

Todas as amostras recolhidas foram armazenadas no frio (-20°C) (Figura 3) até serem analisadas. Posteriormente, foram submetidas ao processo de extração de DNA e, de seguida, procedeu-se à análise genética, tendo sido efetuada através das técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*) e de *Real-time PCR (Real-time Polymerase chain reaction)* no laboratório de Biologia Molecular do IUEM. Após concluída a análise laboratorial, todas as amostras, utilizadas apenas para este estudo, foram descartadas.



Figura 3. Armazenamento de amostras no frio (-20°C).

7. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo as instruções do fabricante e teve por base o capítulo *Protocol: Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs* do livro *QIAamp DNA Investigator Handbook*.

Dado o número de amostras incluído no estudo (n=100), em todos os procedimentos laboratoriais seguidamente descritos, as mesmas foram distribuídas por grupos e fez-se a respetiva análise numa sequência cronológica, seguindo a ordem de recolha das amostras.

Primeiramente, adicionou-se 20 µl da solução proteinase K (Figura 4) e 600 µl da solução *Buffer* ATL, um tampão de lise celular (Figura 5), com recurso a micropipetas, aos tubos “ependorf” com as omniswabs previamente colocadas. De seguida, as soluções contidas nos tubos foram misturadas no vórtex (Figura 6), durante 10 segundos.

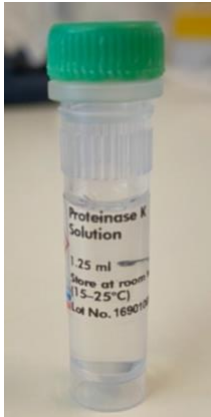


Figura 4. Proteinase K.



Figura 5. Buffer ATL.



Figura 6. Vórtex.

Posteriormente, os tubos “ependorf” foram colocados dentro de uma incubadora de calor (Figura 7), com uma temperatura de 56°C e 900 rpm durante, pelo menos, 1 hora, sendo colocadas de 10 em 10 minutos no vórtex, durante 10 seg, para favorecer o processo de lise.

De forma a eliminar gotas no interior dos tubos “ependorf”, as amostras foram centrifugadas (Figura 9) e, de seguida, adicionou-se 600 µl da solução *Buffer AL*, um tampão de lise (Figura 8). Imediatamente a seguir, foram novamente colocadas no vórtex, durante 15 segundos. Deve-se assegurar que a amostra fica totalmente misturada com a solução, obtendo-se uma mistura homogénea, para garantir a eficácia da lise.

Ambas as soluções *Buffer ATL* e *Buffer AL* asseguram a rotura /lise da membrana celular e desnaturação de proteínas. Obtém-se, assim, moléculas de DNA e produtos resultantes da lise no interior dos tubos “ependorf”.



Figura 7. Amostras na incubadora de calor.



Figura 8. Buffer AL.



Figura 9. Amostras na centrifugadora.

Seguidamente, os tubos “eppendorf” foram novamente inseridos dentro da incubadora de calor, a uma temperatura de 70°C e 900 rpm durante 10 minutos, sendo colocadas de 3 em 3 minutos no vórtex, durante 10 segundos (Figura 7).

Foi realizada nova centrifugação e, imediatamente a seguir, adicionaram-se 300 µl de etanol, numa percentagem de 96-100%. A amostra e o etanol deverão ficar totalmente homogeneizados para garantir o sucesso dos passos subsequentes. Colocaram-se novamente as amostras no vórtex durante 15 seg e efetuou-se nova centrifugação.

Da solução obtida na etapa anterior, transferiu-se 700 µl para uma coluna de eluição, denominada QIAamp MiniSpin Column (inserida num tubo coletor de 2 ml) (Figura 10), sem tocar na membrana da mesma, e procedeu-se a nova centrifugação a 8000 rpm durante 1 min. De seguida, descartou-se o conteúdo residual no tubo coletor de 2 ml e voltou a colocar-se a coluna QIAamp MiniSpin Column no interior do mesmo. Este processo foi repetido até não haver mais amostra dentro dos tubos de amostras “eppendorf” previamente preparados na etapa anterior. Por último, fez-se uma nova centrifugação a 8000 rpm durante 1 min e, de seguida, descartou-se o tubo coletor de 2 ml, colocando-se a coluna num novo tubo coletor de 2 ml. O DNA de todas as amostras ficou, assim, retido na membrana da coluna, ao passo que os produtos resultantes da lise, presentes no interior do tubo coletor de 2 ml, foram descartados.



Figura 10. QIAamp MiniSpin Column.

Posteriormente, adicionaram-se as soluções *Buffer* AW1 e AW2 (Figuras 11 e 12), duas soluções de lavagem cuja função é eliminar os resíduos contaminantes de DNA, que se encontrem em suspensão na amostra. Nesse sentido, adicionou-se 500 µl de *Buffer* AW1 à coluna QIAamp MiniSpin Column, sem tocar na membrana da coluna, e

procedeu-se a uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 min. De seguida, descartou-se o tubo coletor de 2 ml, colocando-se a coluna num novo tubo coletor de 2 ml. O mesmo procedimento foi repetido para a solução *Buffer AW2*, mas desta vez numa concentração de 700 µl. Durante a realização deste protocolo, foi evitado o contacto entre a coluna e o líquido no fundo do tubo coletor.



Figura 11. *Buffer AW1.*



Figura 12. *Buffer AW2.*

Após a adição das soluções *Buffer*, realizou-se o mesmo procedimento com etanol (96-100%) (Figura 13), tendo-se adicionado 700 µl do mesmo, sem tocar na membrana da coluna, e procedeu-se a uma centrifugação a 8000 rpm durante 1 min. Imediatamente após, descartou-se o tubo coletor de 2 ml, inserindo-se a coluna num novo tubo coletor de 2 ml. Após a adição destas soluções, procedeu-se a uma centrifugação a alta velocidade de todas as amostras a 14,000 rpm durante 3 minutos, com o intuito de secar totalmente a membrana. O etanol, ao precipitar o DNA, purifica ao máximo esta molécula.

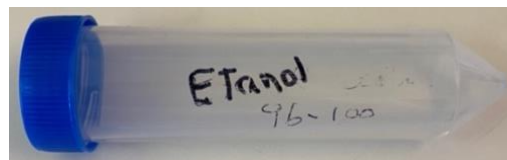


Figura 13. Etanol Absoluto (96-100%).

De seguida, a coluna QIAamp MiniSpin Column foi colocada num novo tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml, tendo-se descartado previamente o tubo coletor de 2 ml com a solução no seu interior. Abriu-se a tampa da coluna e incubou-se a 56°C durante 3 minutos.

A solução *Buffer ATE* (Figura 14) foi a última a ser adicionada a cada uma das amostras, numa concentração de 25 µl, no centro da membrana, para permitir uma eluição completa do DNA. Fecharam-se as tampas dos tubos, procedeu-se à sua incubação à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto e centrifugou-se a alta velocidade a 14,000 rpm durante 1 minuto. Este procedimento foi repetido de forma a perfazer um volume final de 50 µl em todas as amostras.

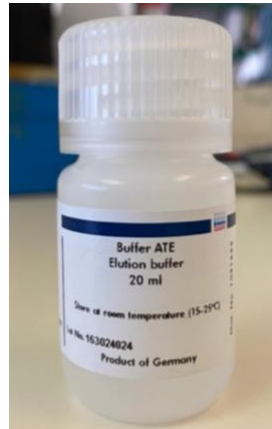


Figura 14. *Buffer ATE*.

Por fim, procedeu-se à selagem dos tubos “*ependorf*” com *Parafilm*®M” que foram, posteriormente, armazenados no frio, a -20°C (Figuras 15 e 16).



Figuras 15 e 16. Tubos “*ependorf*” de todas as amostras, após extração de DNA, selados com *Parafilm*®M”.

8. Técnica de *Real-time* PCR

Recorreu-se à técnica de *Real-time* PCR para a análise dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, tendo sido utilizado o kit comercial *AppliedBiosystems*TM (Thermo Fisher SCIENTIFIC). A análise foi efetuada segundo grupos de amostras, conforme descrito no tópico anterior, sendo a análise do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ a primeira a ser efetuada.

Iniciou-se esta etapa pela realização de diluições das amostras de DNA extraídas anteriormente (Figura 17). Para tal, foi necessário quantificar previamente a concentração de DNA em cada tubo. Nesse sentido, fez-se uma quantificação de 2 µl para cada amostra em espectrofotómetro com um quociente 260/280 nm, que nos permite determinar o grau de pureza do DNA extraído (Figura 18). De seguida, agruparam-se as amostras mediante concentrações semelhantes e, para cada grupo, calculou-se quanto teria de se adicionar de H₂O para perfazer um volume total de 20 µl em cada amostra. De seguida, adicionaram-se as concentrações correspondentes de DNA e H₂O calculadas para cada amostra, em tubos “ependorf” numerados para o grupo a ser analisado.

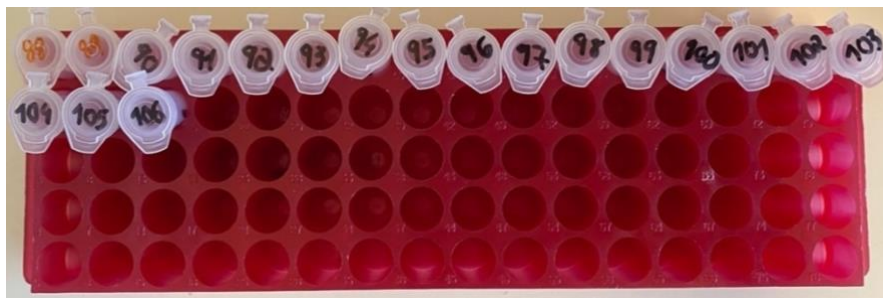


Figura 17. Diluições das amostras de DNA em tubos “ependorf” dos pacientes nº 88 a 106.

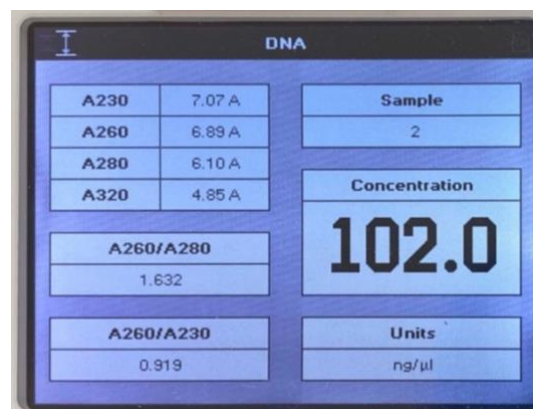


Figura 18. Espectrofotómetro.

Após concluídas as diluições, procedeu-se à realização da técnica propriamente dita. Assim, diluiu-se a solução TaqMan™ SNP Genotyping Assay (Figura 20), que contém no seu interior os *primers forward* e *reverse*, bem como a sonda de hidrólise correspondentes a cada polimorfismo (Figura 19), numa proporção de 1:2, com uma concentração final de 20X. Esta solução é especificamente definida para cada polimorfismo e obtém-se comercialmente.

Seguidamente, foi preparada uma solução Master Mix (Figura 21) que continha os valores de referência, multiplicados pelo número de amostras, das soluções TaqMan™ Genotyping Master Mix (contém a enzima Taq DNA Polimerase, dNTP's, *Buffer* e MgCl₂) e TaqMan™ SNP Genotyping Assay, com exceção da solução de DNA de cada uma das amostras (Tabela 3). Após a obtenção dos valores necessários, adicionaram-se ambas as soluções num tubo “eppendorf”.

Tabela 3. Preparação das amostras para discriminação alélica por reação de *Real-time* PCR, seguindo as instruções do fabricante.

Tampões/Soluções	Referência (x1)	Concentração final
TaqMan™ Genotyping Master Mix	10 µl	1x
20X: TaqMan™ SNP Genotyping Assay	1 µl	1x
DNA (1-20 ng/µl) diluído em dH ₂ O ²	9 µl	-
V Final	20 µl	-



Figura 19. *Primers* + sondas IL-1A e IL-1B (TaqMan™ SNP Genotyping Assay 40X).



Figura 20. Diluição dos *primers* + sondas IL-1A e IL-1B (TaqMan™ SNP Genotyping Assay 20X).



Figura 21. Master Mix.

De seguida, numeraram-se minitubos “eppendorf” com 0,5 ml de capacidade (Figura 22), correspondentes ao número de amostras a analisar, e adicionou-se sequencialmente a cada tubo 11 µl da solução previamente preparada. Em cada amostra adicionou-se 9 µl de DNA, ao passo que no controlo “branco” foi adicionado 9 µl de RNase/Dnase-free Water, perfazendo o mesmo volume das restantes amostras com DNA. Desta forma, cada tubo continha um volume final de 20 µl. Foi também usado um controlo “positivo” (correspondente a uma amostra com genotipagem conhecida).

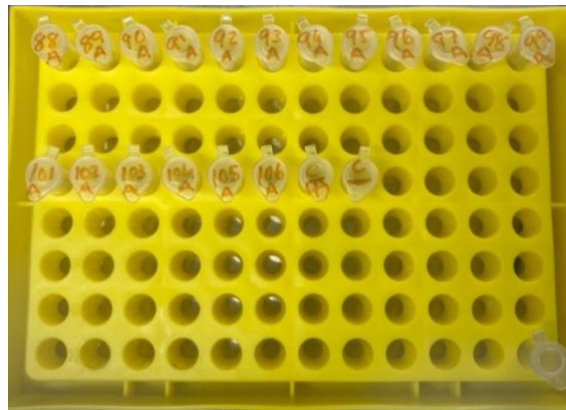


Figura 22. Suporte com minitubos “eppendorf” para análise *Real-time* PCR.

Este procedimento foi repetido para todas as amostras (n=100) dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴.

Posteriormente, as amostras foram inseridas no termociclador *Corbett Research RG 3000* para se dar início às reações de amplificação em *Real-time* PCR. Para ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, foram inicialmente realizados dois ciclos, denominados de “Hold’s” (tratamento UDG), um de 50°C durante 2 min, seguido de outro ciclo de 95°C durante 10 min, previamente à amplificação do DNA propriamente dita. De seguida, iniciaram-se 40 ciclos de 95°C durante 15 seg (desnaturação), 60°C durante 30 seg (*annealing*/hibridação) e, por último, 72°C durante 30 seg (aquisição).

Após concluída a amplificação, o computador com *software* específico ligado ao termociclador evidenciou uma representação gráfica com várias curvas, relativas a cada amostra, representativas dos genótipos dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, após a reação de *Real-time* PCR.

9. Técnica de PCR

A análise do polimorfismo do gene IL-1RN foi realizada através da técnica de PCR para amplificação do DNA, seguida da análise eletroforética em gel de agarose para avaliação dos respectivos produtos de PCR. O polimorfismo do gene IL-1RN, aqui analisado, consiste numa variação genética de uma sequência repetitiva de 86 pb, consistindo num polimorfismo VNTR. Assim, a sua genotipagem utilizando a metodologia básica das técnicas de biologia molecular torna-se a mais viável economicamente, comparativamente à sequenciação direta ou à técnica de *Real-time* PCR.

O DNA obtido através da técnica de extração de DNA foi reconhecido por sequências específicas de oligonucleotídeos para este polimorfismo, denominadas *primers*, tendo sido descritas por Kornman et al. (1997). Foram então utilizadas sequências de iniciadores diretos e indiretos, correspondentes aos *primers forward* e *reverse*, respetivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Sequência de *primers* utilizados para o polimorfismo IL-1RN. Adaptado de (Kornman et al., 1997).

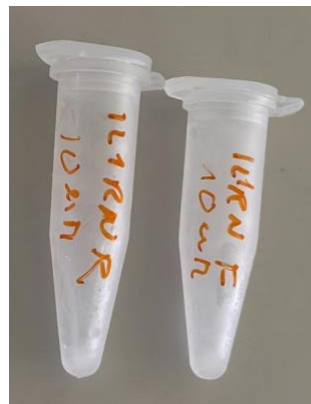
<i>Primers</i> IL-1RN (VNTR)	Sequência nucleotídica
<i>Forward</i>	5'-CTCAGCAACACTCCTAT -3'
<i>Reverse</i>	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA -3'

A técnica de PCR realizada estava de acordo com a descrita por Kornman et al. (1997). Iniciou-se esta parte do protocolo pela diluição dos *primers* de IL-1RN numa concentração final de 10 µM (Figura 24).

Para o cálculo das concentrações finais relativas às soluções que constituem a solução Master Mix, a qual incluía Mytaq (constituída pela enzima Taq DNA Polimerase (Figura 25), dNTP's, *Buffer* e MgCl₂), *primers forward* e *reverse* (Figura 23) e RNase/Dnase-free Water, multiplicaram-se os valores de referência, de seguida apresentados, pelo número de amostras (Tabela 5). Adicionalmente, incluíram-se ainda dois controlos: um negativo (H₂O) e um positivo (com amostra cujo genótipo tinha sido previamente determinado).

Tabela 5. Preparação das amostras para discriminação alélica por reação de PCR, seguindo as instruções do fabricante.

	Tampões/Soluções	Referência	Concentração final
Master Mix	My Taq	12,5 μ l	1x
	<i>Primer forward</i>	1 μ l	1x
	<i>Primer reverse</i>	1 μ l	1x
	RNase/Dnase-free Water	5,5 μ l	1x
DNA	-	5 μ l	-
V Final	-	25 μ l	-

**Figura 23.** *Primers* IL1RN_F e IL1RN_R.**Figura 24.** Diluição dos *primers* IL1RN_F e IL1RN_R.**Figura 25.** MyTaq.

Posteriormente, foram numerados minitubos “eppendorf” de 0,5 ml, correspondentes ao número de amostras a analisar (Figura 26), e transferiu-se para cada tubo 20 μ l da solução previamente preparada, seguida de 5 μ l de DNA de cada amostra, perfazendo um volume final de 25 μ l. Ao tubo de controlo negativo, ao invés de DNA, foi adicionado 5 μ l de RNase/Dnase-free Water, perfazendo o mesmo volume das restantes amostras com DNA.

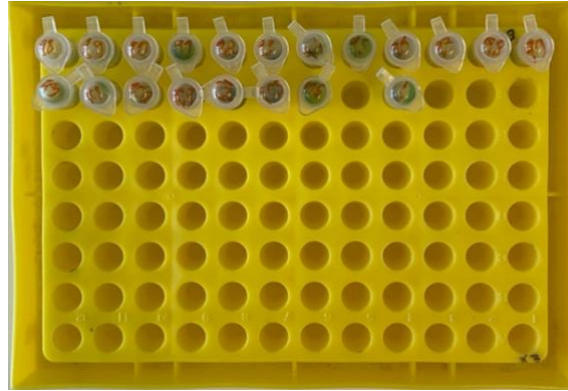


Figura 26. Suporte com minitubos “ependorf” para análise PCR.

Finalmente, as amostras foram inseridas no termociclador *MJ MINI™ Personal Thermal Cycler* para decorrerem as reações de amplificação. Segundo o protocolo descrito por Kornman et al. (1997), para o polimorfismo do gene IL-RN, inicialmente foi realizado um ciclo de 96°C durante 1 min, sucedido por 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, 70°C durante 2 min e, finalmente, 70°C durante 5 minutos.

10. Análise do polimorfismo *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)

Para a revelação da genotipagem das regiões polimórficas associadas ao gene IL-1RN (intrão 2, VNTR), recorreu-se à técnica de eletroforese em gel de agarose a 3%. Nesse sentido, iniciou-se a preparação do gel de agarose pesando 4,5 gramas de pó de agarose (SeaKem® LE Agarose) (Figura 27) e, de seguida, através de um balão de erlenmeyer foram adicionados 150 ml de TAE 1X (Tris Acetato EDTA) (Figura 28), um tampão da corrente elétrica.

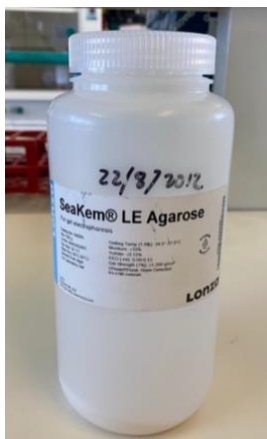


Figura 27. SEaKem® LE Agarose.



Figura 28. TAE 1X.



Figura 29. Corante *red-safe*.

A mistura foi aquecida, através de um micro-ondas, até se obter uma textura homogénea e transparente. De seguida, aguardou-se o tempo necessário para o arrefecimento da mistura e adicionou-se corante *red-safe* numa concentração de 5 μl (Figura 29). Este é um corante de fluorescência de ácidos nucleicos e tem como objetivo penetrar nas ligações de hidrogénio entre as bases complementares do DNA e, assim, possibilitar a visualização das bandas correspondentes no gel, através da utilização de luz ultravioleta. Seguidamente, colocou-se a solução no interior da cama do gel. Após solidificação do mesmo, transferiu-se para uma cuba horizontal e preencheu-se com TAE 1X, o suficiente para que o gel ficasse totalmente imerso.

Posteriormente, adicionou-se às amostras de DNA, previamente amplificadas pela técnica de PCR, 5 μl de Azul de bromofenol a 0,05% (Figura 30), que permite aumentar a densidade das moléculas de DNA e, simultaneamente, a observação da velocidade de migração das mesmas na corrida eletroforética (Figura 31).



Figura 30. Azul de bromofenol 0,05%.



Figura 31. Minitubos “Eppendorf” preparados para análise eletroforética.

Por fim, adicionou-se 8 μl de um marcador de massas moleculares (M), denominado NZYDNA *Ladder* VI (Figura 32), no primeiro e último poço, e 12 μl de DNA das amostras do grupo em análise nos poços seguintes, no gel de eletroforese, tendo sido realizada a eletroforese com uma corrente elétrica a 100 mA. A análise eletroforética foi realizada mediante utilização de um transiluminador de luz ultravioleta.



Figura 32. Marcador NZYDA Ladder VI.

11. Análise Estatística

A análise estatística do presente estudo foi realizada com recurso ao programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

O tratamento dos dados foi efetuado mediante uma análise estatística descritiva e inferencial. Procedeu-se à análise inferencial com o intuito de comparar e testar a possível associação entre as variáveis qualitativas avaliadas neste estudo. Para tal, o teste estatístico utilizado foi o teste de independência do Qui-quadrado (χ^2) de *Pearson*. Previamente à sua realização, foi estabelecido um valor de significância de 5% ($p \leq 0,05$), com o propósito de rejeitar ou aceitar a hipótese nula.

IV. RESULTADOS

1. Análise da técnica de *Real-time* PCR

Os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ foram analisados recorrendo à técnica de *Real-time* PCR. As novas amostras recolhidas nº 27 a 106 foram previamente quantificadas, mediante o grupo de amostra em que estavam incluídas e, de seguida, foram submetidas à reação de amplificação, com base no ensaio Taqman[®], segundo as instruções do fabricante.

Para a realização desta técnica, é de extrema importância a aquisição de dois controlos: positivo e negativo. O controlo positivo deverá originar curvas de amplificação, ao passo que o controlo negativo, designado como “branco”, não permite a deteção de nenhuma amplificação. Se ambos os controlos cumprirem com estes requisitos, a análise de *Real-time* PCR deverá ser fidedigna.

No decorrer da reação de *Real-time* PCR, vão sendo geradas curvas de amplificação, que permitem determinar a quantidade de produto de DNA amplificado para cada amostra. A intensidade de fluorescência só é detetada a partir de um determinado limiar – “*Threshold*” –, no qual existe um ponto que corresponde proporcionalmente ao número inicial de moléculas de DNA presentes nas várias amostras.

As curvas são constituídas por 3 fases: fase inicial, na qual a intensidade de fluorescência não é detetada; fase exponencial, na qual o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente e determina a acumulação do DNA amplificado; e fase *plateau*, quando algum componente da reação se consome na totalidade (exemplos: *primers*, dNTP's, Taq DNA polimerase).

O polimorfismo que caracteriza os genes IL-1A e IL-1B, conhecido como SNP, consiste na substituição de uma base C por uma base T e, assim, origina 2 possíveis alelos: C e T. Deste modo, as sondas específicas do ensaio Taqman[®] utilizadas para a deteção destes SNP's foram marcadas com fluoróforos (exemplos: FAM, JOE e VIC), com comprimentos de onda de emissão específicos, permitindo a deteção dos alelos C e T e, assim, concluir sobre qual o genótipo de cada amostra. Para além das sondas oligonucleotídicas adicionadas, os *primers forward* e *reverse* atuam também no reconhecimento e delimitação dos SNP's a serem analisados.

Neste sentido, cada amostra corresponde a uma curva de amplificação que, mediante a configuração apresentada (círculos ou lisa) e a quantidade de curvas, determina o genótipo dessa amostra. A sonda FAM está associada ao alelo 2 (T), evidenciando uma curva lisa, e as sondas VIC ou JOE associadas ao alelo 1 (C), representando uma curva com círculos.

As diferentes possibilidades de genótipo para cada curva variam entre a presença apenas do alelo 1 (sem alteração), coincidente com um genótipo do tipo 1/1 (C/C), alelo 2 (alelo mutado), sendo o indivíduo portador de um genótipo 2/2 (T/T) ou a presença de ambos os alelos 1 e 2, com um genótipo associado 1/2 (C/T).

Para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ das amostras número 1 a 106 (n=100 pacientes, sem contabilizar os pacientes excluídos), em 63 pacientes verificou-se a presença do genótipo 1/1, sendo homocigóticos para o alelo 1, e 37 pacientes evidenciaram um genótipo 1/2, sendo heterocigóticos. Nas figuras 33 e 34 estão evidenciadas as curvas de amplificação de 2 pacientes, ilustrativas das 2 possibilidades de genótipo supramencionadas.

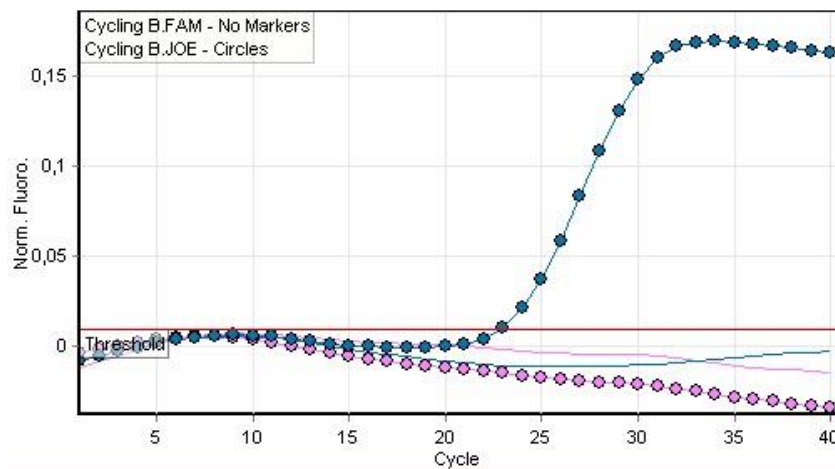


Figura 33. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo homocigótico do tipo 1/1 (paciente 83 - grupo controle) relativa ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹. Curva azul: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva rosa: controle negativo (branco); Linha vermelha: *Threshold*.

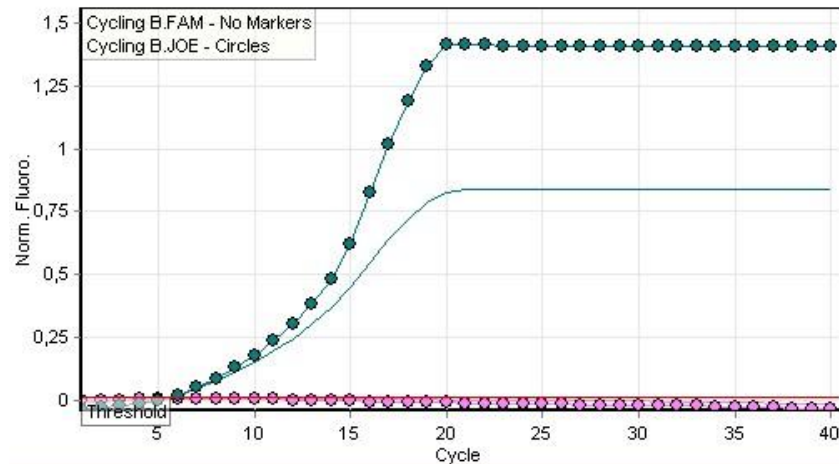


Figura 34. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo heterozigótico do tipo 1/2 (paciente 15 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹. Curva verde com círculos: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva verde lisa: detetada pela sonda FAM (alelo 2); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: *Threshold*.

Ainda em relação ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, não se observou nenhum paciente portador do genótipo 2/2.

Relativamente ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, do total das 100 amostras, 73 pacientes verificaram a presença do genótipo 1/1, sendo homozigóticos para o alelo 1, 26 pacientes evidenciaram um genótipo 1/2, sendo heterozigóticos e apenas 1 paciente (paciente nº 24, do primeiro grupo de análise) apresentou um genótipo do tipo 2/2, sendo homozigótico para o alelo 2.

Nas figuras 35 e 36 estão evidenciadas as curvas de amplificação de 2 pacientes, ilustrativas das 2 possibilidades de genótipo 1/1 e 1/2 para este SNP.

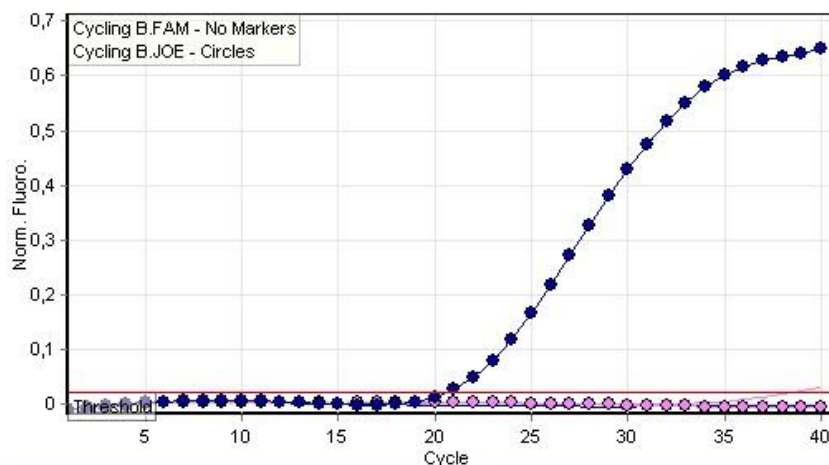


Figura 35. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo homozigótico do tipo 1/1 (paciente 106 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴. Curva azul: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: *Threshold*.

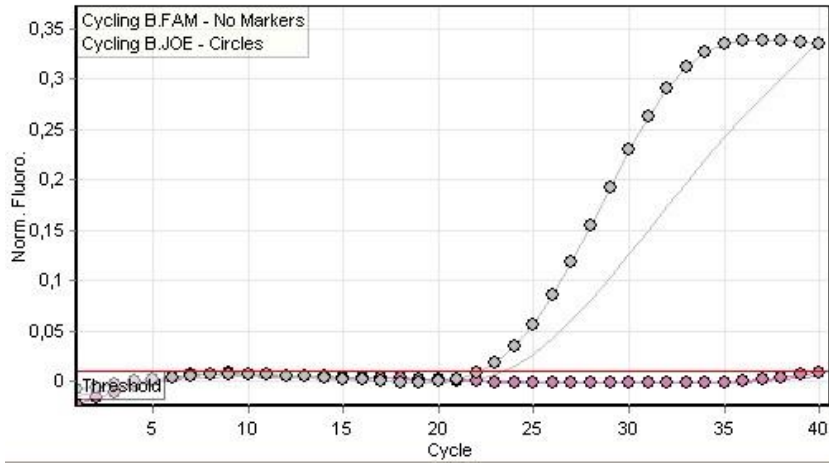
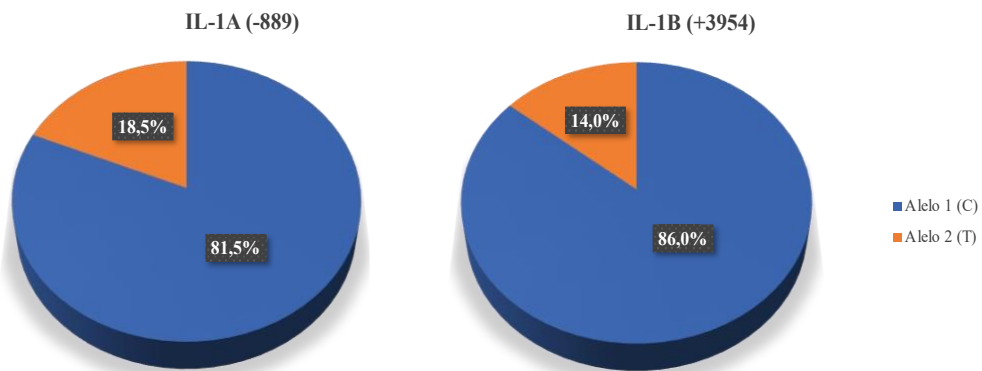


Figura 36. Curva de amplificação exemplificativa de um paciente portador do genótipo heterozigótico do tipo 1/2 (paciente 72 - grupo doença) relativa ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴. Curva cinzenta com círculos: detetada pela sonda JOE (alelo 1); Curva cinzenta lisa: detetada pela sonda FAM (alelo 2); Curva rosa: controlo negativo (branco); Linha vermelha: *Threshold*.

Considerando a amostra na sua totalidade (n=100), para ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, é possível concluir que existe uma maior prevalência do alelo 1 (C) comparativamente ao alelo 2 (T), de 81,5% e 86,0%, respetivamente (Gráficos 1 e 2).



Gráficos 1 e 2. Prevalência dos alelos 1 (C) e 2 (T) nos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴.

2. Análise da técnica de PCR

O polimorfismo no intrão 2 do gene IL-1RN (VNTR), associado a cinco possíveis alelos, mediante o número de vezes que se repetem em *tandem* ao longo de uma sequência de 86 pb, foi analisado com recurso à técnica de PCR convencional. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados segundo a técnica de eletroforese em gel de agarose a 3%, permitindo visualizar inúmeras bandas, correspondentes às diferentes combinações de genótipo possíveis. Para a identificação das bandas, foi utilizado um marcador de massas moleculares denominado NZYDNA Ladder VI.

Considerando a totalidade da amostra (n=100), verificou-se que 86 pacientes eram homocigóticos para o alelo 1, correspondente à banda de 412 pb e 12 pacientes eram homocigóticos para o alelo 2, associado à banda de 240 pb. Apenas 2 pacientes evidenciaram um genótipo com dois alelos distintos (genótipo 1/3): o paciente 4, com a presença dos alelos 1 e 3, correspondentes a 412 e 326 pb, e o paciente 61, evidenciando a presença dos alelos 1 e 5, correspondentes a 412 e 584 pb (Figuras 37 e 38).

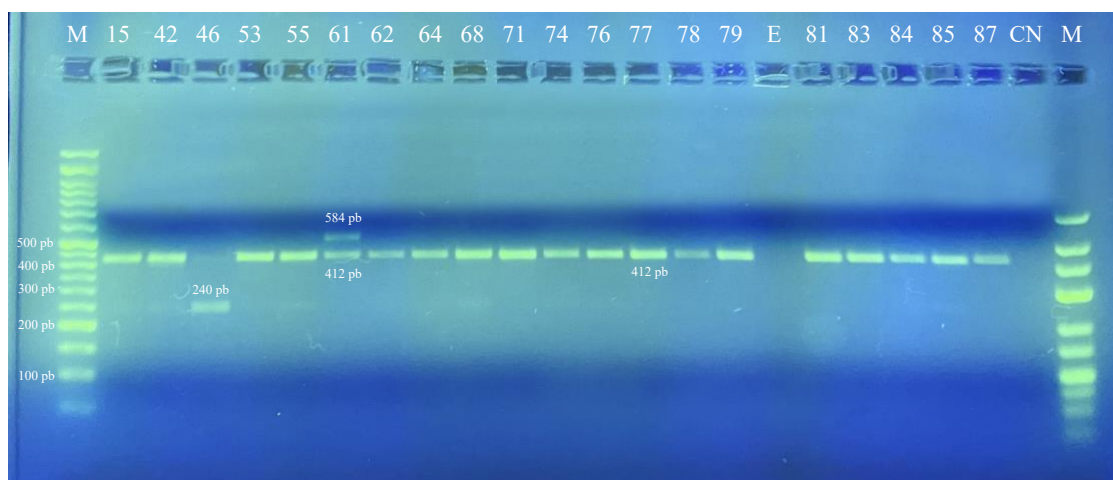


Figura 37. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras, relativo ao gene IL-1RN no intrão 2. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); CN: controlo negativo; E: paciente excluído (ausência de DNA); Grupo controlo: pacientes nº 61, 62, 64, 68, 76, 79, 81, 83, 85; Grupo doença: pacientes nº 15, 42, 46, 53, 55, 71, 74, 77, 78, 84, 87. Todos os pacientes eram homocigóticos para o alelo 1 (412 pb), à exceção dos pacientes 46 e 61. No paciente 61 observaram-se 2 bandas uma correspondente ao alelo 1 e outro ao alelo mutado (alelo 5) (584 pb). No paciente 46 observou-se somente uma banda correspondente ao alelo 2 (240 pb), sendo este paciente homocigótico para o alelo 2.

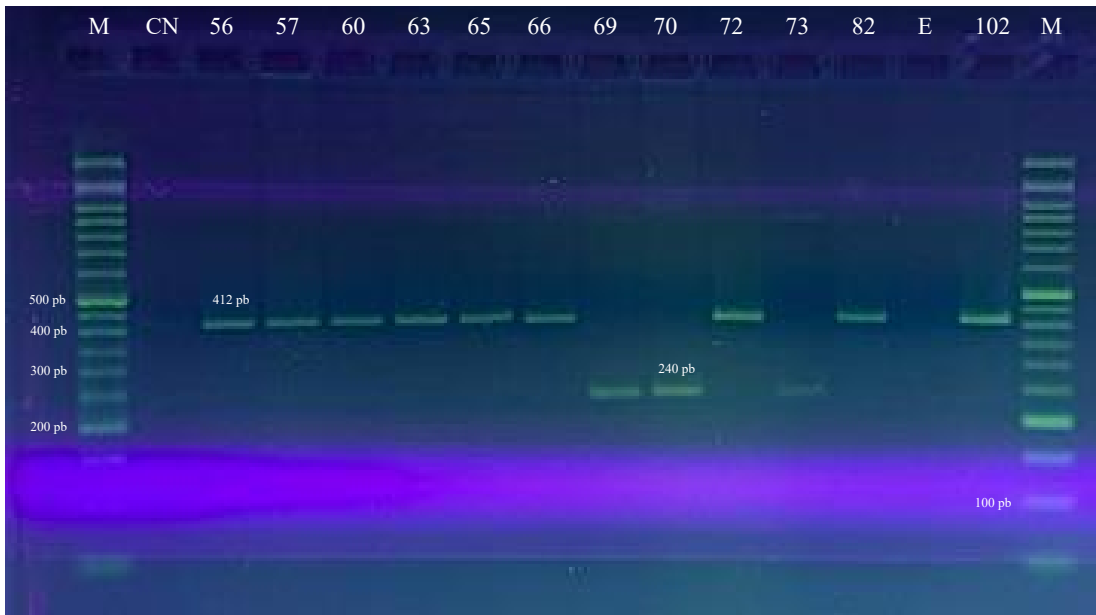


Figura 38. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras, relativo ao gene IL-1RN no intrão 2. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); CN: controle negativo; E: paciente excluído (ausência de DNA); Grupo controle: paciente nº 102; Grupo doença: pacientes nº 56, 57, 60, 63, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 82. Todos os pacientes eram homocigóticos para o alelo 1 (412 pb), à exceção dos pacientes 69, 70 e 73. Em ambos os pacientes observou-se somente uma banda correspondente ao alelo 2 (240 pb), sendo estes pacientes homocigóticos para o alelo 2.

Assim, tendo em conta o número total de amostras (n=100) para o polimorfismo do gene IL-1RN, conclui-se, também neste caso, que existe uma maior prevalência do alelo 1 comparativamente aos alelos 2/3/5, correspondentes a percentagens de 87,0% e 13,0%, respetivamente (Gráfico 3). Considerando o número residual de pacientes que apresentavam os alelos 2, 3 e 5, incluíram-se estes três alelos numa única categoria.

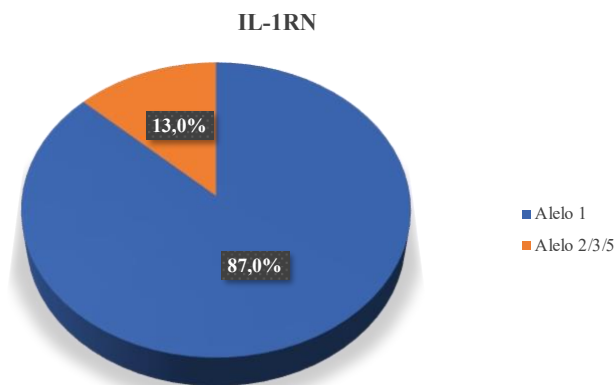


Gráfico 3. Prevalência dos alelos 1 e 2/3/5 (T) no polimorfismo do gene IL-1RN.

3. Características demográficas e presença do fator de risco – tabaco na amostra do estudo

Na amostra total, observou-se que 53,0% dos indivíduos tinham uma idade compreendida entre 20 e 59 anos e 47,0% apresentavam 60 anos ou mais. Quanto ao género, observou-se que 43,0% dos indivíduos eram do género masculino enquanto 57,0% eram do género feminino. Quanto ao fator de risco tabaco, 20,0% dos pacientes eram fumadores, ao passo que 80,0% não apresentavam esse hábito. Consideram-se estes fatores como possíveis variáveis de confusão, pelo que se analisou se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saúde e doença, quanto à sua presença. A análise estatística revelou que não existiam diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos quanto a estas variáveis (Tabela 6).

Tabela 6. Relação da periodontite com as variáveis idade, género e tabagismo.

	Saúde Periodontal (n=38)	Periodontite (n=62)	Total (n=100)	Valor-p
Idade				
20-59	23 (60,5%)	30 (48,4%)	53 (53,0%)	$p = 0,238$
60 ou mais	15 (39,5%)	32 (51,6%)	47 (47,0%)	
Género				
Masculino	14 (36,8%)	29 (46,8%)	43 (43,0%)	$p = 0,330$
Feminino	24 (63,2%)	33 (53,2%)	57 (57,0%)	
Tabagismo				
Não	32 (84,2%)	48 (77,4%)	80 (80,0%)	$p = 0,410$
Sim	6 (15,8%)	14 (22,6%)	20 (20,0%)	

4. Frequências alélicas

Para os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intron 2), foram calculadas as frequências alélicas considerando os grupos de controlo e doença, bem como o total da amostra (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências alélicas nos grupos controlo e doença para os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intron 2).

Alelos (%)	Saúde Periodontal (n=76)	Periodontite (n=124)	Total (n=200)	Valor-p
IL-1A (-889)				
C	65 (85,5%)	98 (79,0%)	163 (81,5%)	$p = 0,251$
T	11 (14,5%)	26 (21,0%)	37 (18,5%)	
IL-1B (+3954)				
C	70 (92,1%)	102 (82,3%)	172 (86,0%)	$p = 0,051$
T	6 (7,9%)	22 (17,7%)	28 (14,0%)	
IL-1RN (VNTR)				
1	68 (89,5%)	106 (85,5%)	174 (87,0%)	$p = 0,415$
2/3/5	8 (10,5%)	18 (14,5%)	26 (13,0%)	

No que concerne ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, a frequência do alelo C no grupo saúde periodontal foi de 85,5%, enquanto no grupo periodontite foi de 79,0%. Relativamente ao alelo T, verificou-se uma frequência de 14,5% no grupo saúde e 21,0% no grupo periodontite. Considerando o número total de alelos presentes na amostra (n=200), a frequência de alelo C e T foi, respetivamente, 81,5% e 18,5% (Gráfico 4).

Após análise estatística relativa ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, obteve-se um valor de $p = 0,251$ ($p > 0,05$) para ambos os alelos C e T, pelo que o resultado do teste χ^2 não exclui a hipótese experimental nula. Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas, verifica-se uma maior frequência do alelo mutado (alelo T) no grupo periodontite (21,0%) relativamente ao grupo saúde (14,5%).

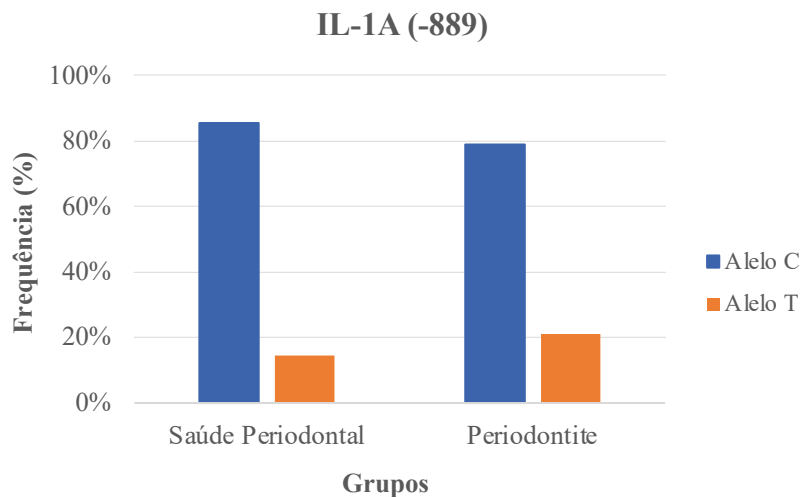


Gráfico 4. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, nos grupos controlo e doença.

Relativamente ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, a frequência do alelo C no grupo saúde periodontal e periodontite foi de 92,1% e 82,3%, respetivamente. Por outro lado, a frequência do alelo T foi de 7,9% para o grupo saúde e 17,7% para o grupo doença. No que diz respeito ao número total de alelos presentes na amostra (n=200), verificou-se uma frequência alélica total dos alelos C e T de 86,0% e 14,0%, respetivamente (Gráfico 5).

O resultado do teste χ^2 para o polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ foi $p = 0,051$ ($p > 0,05$), para ambos os alelos C e T, pelo que não se rejeita a hipótese nula em estudo. Apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas entre os grupos para os alelos C e T, verificou-se uma maior percentagem, mais do dobro, do alelo mutado (alelo T) no grupo doença relativamente ao grupo saúde (17,7% versus 7,9%, respetivamente).

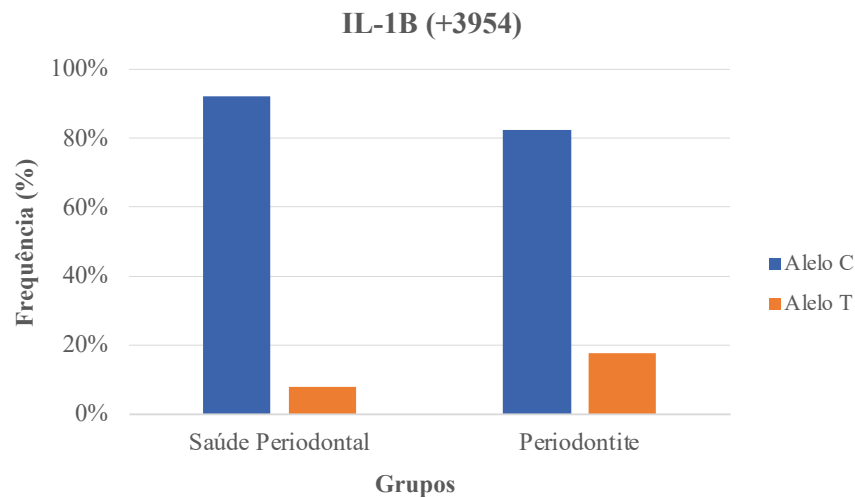


Gráfico 5. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, nos grupos controle e doença.

No polimorfismo do gene IL-1RN verificou-se, no grupo saúde periodontal, uma frequência alélica para o alelo 1 de 89,5% e para os alelos 2/3/5 de 10,5%. Em relação ao grupo periodontite, a frequência alélica verificada para o alelo 1 foi de 85,5% e para os alelos 2/3/5 de 14,5%. Tendo em conta o número total de alelos (n=200), observou-se uma frequência do alelo 1 e dos alelos 2/3/5 de 87,0% e 13,0%, respetivamente (Gráfico 6).

Realizou-se uma análise inferencial recorrendo ao teste χ^2 e obteve-se um resultado de $p = 0,415$ ($p > 0,05$) para ambos os alelos 1 e alelos 2/3/5, pelo que não se verificou associação.

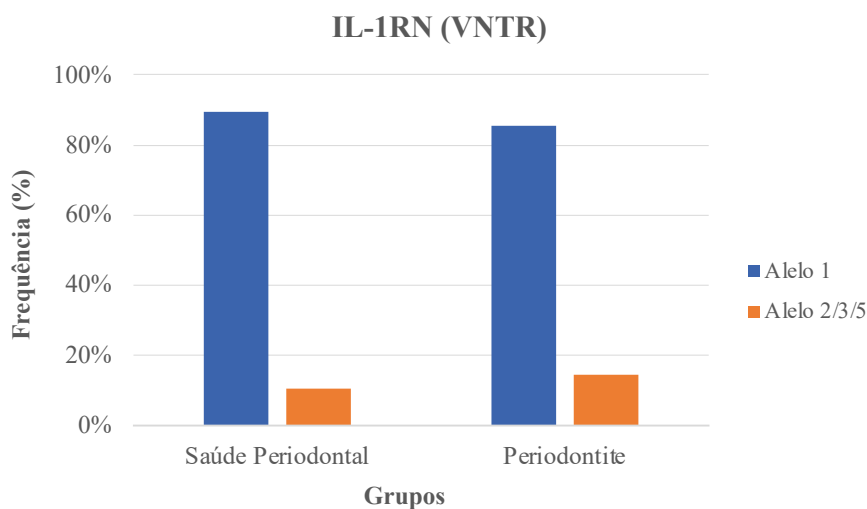


Gráfico 6. Prevalência dos alelos 1 e 2/3/5 no polimorfismo do gene IL-1RN, nos grupos controle e doença.

5. Frequências genótípicas

Para os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), foram também calculadas as frequências genótípicas considerando os grupos saúde periodontal e periodontite, assim como para o total da amostra (Tabela 8).

Tabela 8. Frequências genótípicas nos grupos controlo e doença para os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2).

Genótipo (%)	Saúde Periodontal (n=38)	Periodontite (n=62)	Total (n=100)	Valor-p
IL-1A (-889)				
CC	27 (71,1%)	36 (58,1%)	63 (63,0%)	<i>p</i> = 0,192
CT	11 (28,9%)	26 (41,9%)	37 (37,0%)	<i>p</i> = 0,192
IL-1B (+3954)				
CC	32 (84,2%)	41 (66,1%)	73 (73,0%)	<i>p</i> = 0,048
CT	6 (15,8%)	20 (32,3%)	26 (26,0%)	<i>p</i> = 0,068
TT	0 (0,0%)	1 (1,6%)	1 (1,0%)	—
IL-1RN (VNTR)				
1	33 (86,8%)	53 (85,5%)	86 (86,0%)	<i>p</i> = 0,849
2/3/5	5 (13,2%)	9 (14,5%)	14 (14,0%)	<i>p</i> = 0,849

Em relação ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, considerando o número total de indivíduos pertencentes ao grupo saúde periodontal (n=38), 27 (71,1%) apresentaram um genótipo CC, ao passo que 11 evidenciaram um genótipo CT (28,9%). Relativamente ao grupo periodontite, 36 (58,1%) possuem um genótipo CC enquanto 26 (41,9%) exibiram um genótipo CT. Em nenhum dos grupos se verificou a presença do genótipo TT. Tendo em consideração o número total de indivíduos (n=100), 63 (63,0%) evidenciaram um genótipo CC, ao passo que 37 (37,0%) revelaram um genótipo CT (Gráfico 7).

O resultado do teste χ^2 foi *p* = 0,192 (*p* > 0,05) para ambos os genótipos CC e CT, pelo que não se descarta a hipótese nula, evidenciando que não existe associação entre a presença destes genótipos para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ e a periodontite. Apesar do resultado do teste χ^2 , a diferença quanto à presença de genótipo CT entre os grupos evidenciou alguma discrepância, de 41,9% e 28,9% para o grupo periodontite e saúde periodontal, respetivamente.

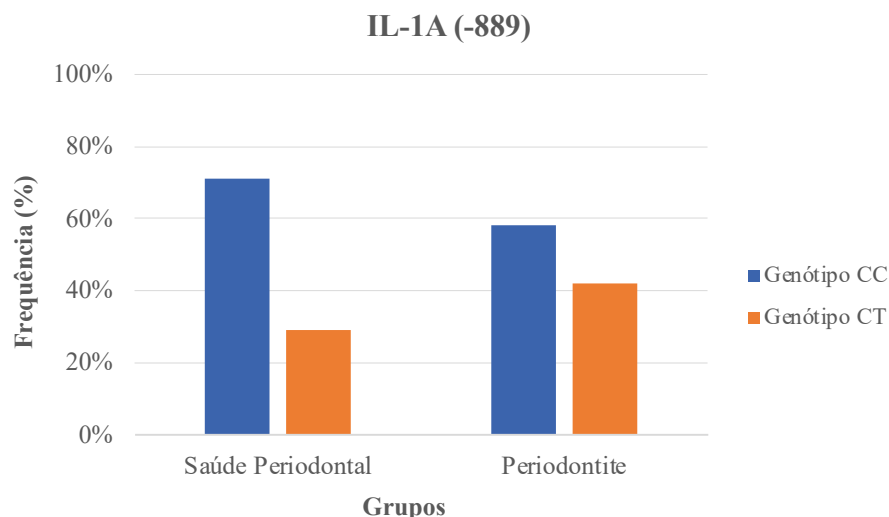


Gráfico 7. Prevalência dos genótipos CC e CT no polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, nos grupos controle e doença.

Quanto ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, dos 38 indivíduos pertencentes ao grupo saúde periodontal, 32 (84,2%) evidenciaram um genótipo CC, 6 (15,8%) apresentaram um genótipo CT e nenhum indivíduo revelou um genótipo TT. Contrariamente, no grupo periodontite, dos 62 indivíduos, 41 (66,1%) evidenciaram um genótipo CC, 20 (32,3%) um genótipo CT (28,9%) e apenas 1 indivíduo (1,6%) manifestou o genótipo TT. Considerando toda a amostra (n=100), 73 (73,0%) indivíduos revelaram um genótipo CC, 26 (26,0%) o genótipo CT e apenas 1 (1,0%) o genótipo TT (Gráfico 8).

Após realização de análise inferencial para os três tipos distintos de genótipo, entre os grupos saúde e doença, verificou-se para os genótipos CC e CT um valor de $p = 0,048$ ($p < 0,05$) e $p = 0,068$ ($p > 0,05$), respectivamente. Não foi possível efetuar a mesma análise para o genótipo TT dada a particularidade da frequência apresentada pelo grupo saúde periodontal (Tabela 7), pelo que não se obteve nenhum valor de p .

O genótipo CC evidencia uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,048$) entre grupos, verificando-se uma frequência superior do genótipo CC no grupo saúde periodontal (84,2%) comparativamente ao grupo periodontite (66,1%), pelo que se conclui que o genótipo CC (sem alelos mutados) é mais frequente em indivíduos saudáveis não portadores da doença.

No que concerne ao genótipo CT, não apresenta uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,068$) com a presença de periodontite, uma vez que as diferenças entre grupos não são estatisticamente significativas. Contudo, existe uma diferença do genótipo

CT, de quase o dobro, no grupo periodontite (32,3%) relativamente ao grupo saúde (15,8%).

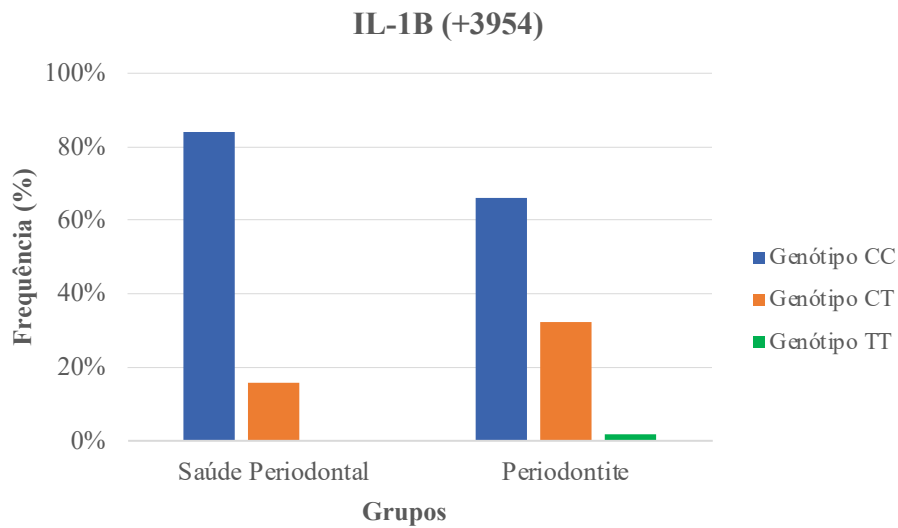


Gráfico 8. Prevalência dos genótipos CC, CT e TT no polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, nos grupos controle e doença.

No que diz respeito ao polimorfismo do gene IL-1RN, atendendo ao número de indivíduos pertencentes ao grupo saúde periodontal, 33 indivíduos (86,8%) evidenciaram um genótipo 1/1, enquanto os restantes 5 (13,2%) exibiram um genótipo 1/3. Relativamente ao grupo periodontite, o genótipo 1/1 esteve presente em 53 indivíduos (85,5%), comparativamente ao genótipo 1/3 que foi detetado em 9 pacientes (14,5%). Tendo em conta o número total de indivíduos (n=100), 86 (86,0%) apresentaram o genótipo 1/1 e 14 (14,0%) o genótipo 1/3 (Gráfico 9).

O resultado do teste χ^2 foi $p = 0,849$ ($p > 0,05$) para ambos os genótipos 1/1 e 1/3, pelo que se rejeita a hipótese alternativa, não existindo associação entre a presença deste polimorfismo do gene IL-1RN e a presença de periodontite.

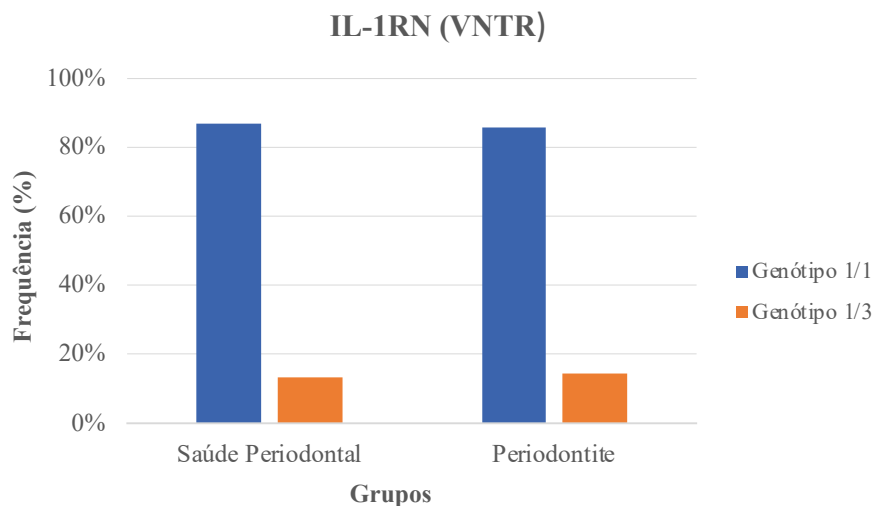


Gráfico 9. Prevalência dos genótipos 1/1 e 1/3 no polimorfismo do gene IL-1RN, nos grupos controle e doença.

6. Presença do genótipo positivo

No grupo saúde periodontal (n=38), somente 4 indivíduos (10,5%) evidenciaram a presença do genótipo positivo, enquanto os restantes 34 (89,5%) não possuem este genótipo. Relativamente ao grupo periodontite (n=62), 14 indivíduos (22,6%) exibiram genótipo positivo, sendo que os restantes 48 (77,4%) não são portadores no mesmo genótipo.

Caracterizando a amostra (n=100) quanto à presença do genótipo positivo, concluiu-se que apenas 18 (18,0%) dos indivíduos revelam um genótipo positivo, ao passo que os restantes 82 pacientes (82,0%) não evidenciam a presença desse genótipo (Tabela 9 e Gráfico 10).

O resultado do teste χ^2 para comprovar a associação entre a presença do genótipo positivo entre grupos foi $p = 0,128$ ($p > 0,05$), pelo que se conclui que não existe associação estatisticamente significativa entre os grupos saúde e doença quanto à presença do genótipo positivo. Contudo, observa-se uma tendência mais elevada de indivíduos com a presença deste genótipo no grupo doença comparativamente ao grupo saúde (22,6% versus 10,5%, respetivamente).

Tabela 9. Relação da amostra com a presença de genótipo positivo.

Genótipo Positivo	Saúde Periodontal (n=38)		Periodontite (n=62)		Total (n=100)		Valor-p
	n	%	n	%	n	%	
Sim	4	10,5%	14	22,6%	18	18,0%	0,128
Não	34	89,5%	48	77,4%	82	82,0%	

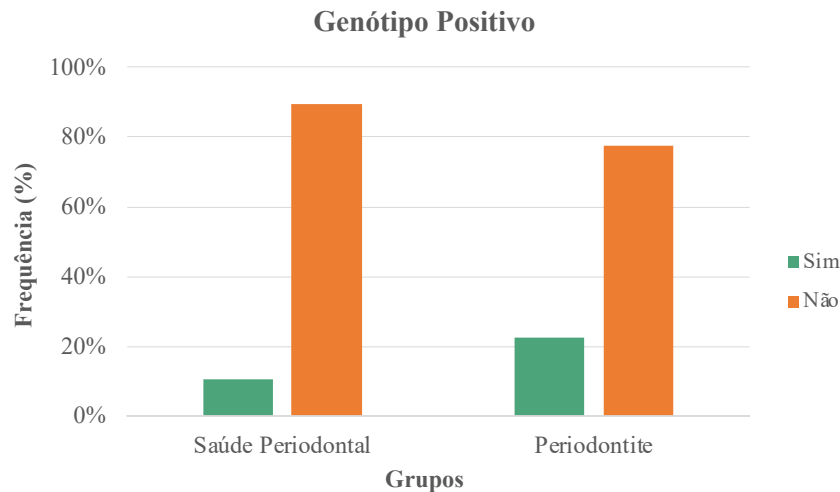


Gráfico 10. Prevalência de genótipo positivo nos grupos controle e doença.

7. Análise dos resultados tendo em conta o fator de risco – tabaco

Por último, para a variável presença de hábitos tabágicos, fez-se ainda uma avaliação das frequências alélicas tendo em conta a presença e ausência de hábitos tabágicos. Assim, considerando exclusivamente os pacientes com hábitos tabágicos (n=20) e o número total de alelos presentes na amostra de pacientes fumadores (n=40), relativamente ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, verificou-se a presença do alelo T (alelo mutado) apenas no grupo periodontite, correspondente a uma frequência de 39,3%, enquanto no grupo saúde é de 0,0%. A frequência de alelos C e T, considerando o número total de alelos dos indivíduos fumadores (n=40), foi 72,5% e 27,5%, respetivamente (Tabela 10).

Ainda que não se possa aplicar o teste χ^2 pelas características das frequências apresentadas pelo grupo saúde periodontal, constatou-se uma diferença significativa entre os grupos, evidenciando uma maior frequência do alelo T (alelo mutado) em pacientes fumadores pertencentes ao grupo doença comparativamente ao grupo saúde.

Foi ainda avaliada a associação entre pacientes com presença e ausência de hábitos tabágicos e as restantes frequências alélicas para os polimorfismos IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos quanto à variável tabaco (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências fenotípicas em pacientes fumadores (n=40) nos grupos controlo e doença.

Alelos (%) + Fumadores	Saúde Periodontal (n=12)	Periodontite (n=28)	Total (n=40)	Valor-p
IL-1A (-889)				
C	12 (100,0%)	17 (60,7%)	29 (72,5%)	$p = 0,011$
T	0 (0,0%)	11 (39,3%)	11 (27,5%)	
IL-1B (+3954)				
C	11 (91,7%)	22 (78,6%)	33 (82,5%)	$p = 0,318$
T	1 (8,3%)	6 (21,4%)	7 (17,5%)	
IL-1RN (VNTR)				
1	12 (100,0%)	24 (85,7%)	36 (90,0%)	$p = 0,168$
2/3/5	0 (0,0%)	4 (14,3%)	4 (10,0%)	

É ainda importante mencionar que outros estudos avaliaram a relação dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2) com diferentes graus de severidade da Periodontite. No entanto, sendo o grupo periodontite (n=62) constituído maioritariamente por formas severas da doença (n=57) comparativamente às formas suaves/moderadas (n=5), não se realizou, no presente estudo, a distinção entre as diferentes formas da doença. De salientar ainda que as formas de progressão rápida da periodontite não foram tidas em consideração na presente investigação.

V. DISCUSSÃO

Os polimorfismos que ocorrem ao nível dos genes da IL-1 e do IL-1RN têm sido abordados em vários estudos no sentido de tentar compreender o seu papel no desenvolvimento de periodontite. Contudo, os resultados têm sido discordantes (Nikolopoulos et al., 2008; Pociot et al., 1992; Salazar-Pelaéz et al., 2012; Shirodaria et al., 2000; Zuccarello et al., 2014).

Montes et al. (2009) realizaram um estudo onde compararam vários estudos realizados em diferentes populações, nomeadamente italiana, sueca, brasileira, chinesa e japonesa, com o intuito de analisar as frequências alélicas totais dos polimorfismos IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2). No presente estudo, verificou-se que a frequência do alelo sem alteração (alelo C) para o IL-1B⁺³⁹⁵⁴, na amostra total, foi de 86,0%, sendo o alelo mais prevalente, tal como se verifica para as diferentes populações no estudo de Montes et al. (2009) a um nível global. No que concerne ao alelo T (alelo mutado), no presente estudo, observou-se uma frequência de 14,0%, sendo essa frequência inferior à observada em estudos realizados na Europa (Suécia e Itália) e no Brasil, mas superior à encontrada em populações asiáticas (Montes et al., 2009). Para o polimorfismo IL-1RN, observaram-se frequências mais elevadas para o alelo 1, comparativamente ao alelo 2 em todos os estudos, como é observado na presente investigação (87,0% para o alelo 1 e 13,0% para os alelos 2/3/5). Relativamente ao alelo alterado, verificou-se que a frequência observada no presente estudo (13,0%) é inferior à encontrada em populações do sul da Europa (Itália), mas superior à verificada em populações asiáticas (Montes et al., 2009).

No estudo de Trevilatto et al. (2011), foram comparadas as frequências alélicas totais para os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2). Para os polimorfismos IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2) foram incluídos os mesmos estudos referidos por Montes et al. (2009), tendo chegado às mesmas conclusões. Por sua vez, para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, avaliado em três populações distintas, alemã, sueca e brasileira, observou-se que a frequência do alelo C (alelo normal) é a mais prevalente e que foi semelhante entre as diferentes populações (60,0-70,0%). No presente estudo, observou-se uma frequência superior do alelo C na amostra total (81,5%). Relativamente ao alelo mutado (alelo T), Trevilatto et al. (2011) observaram uma frequência de, aproximadamente, 30,0%, sendo a frequência para o alelo T na amostra total, encontrada no presente estudo, de 18,5%.

No estudo de Yoshie et al. (2007) foram avaliadas as taxas de alelos mutados para os polimorfismos IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2) nas populações caucasiana, africano-americana, japonesa e chinesa. A presença do alelo mutado (alelo T) foi mais prevalente na população caucasiana, seguida da africano-americana, com frequências consideravelmente baixas para a população chinesa e japonesa.

A meta-análise de da Silva et al. (2017), que abrangeu 21 estudos caso-controle, 14 em etnia caucasiana, 5 em asiática e 2 em população mista, perfazendo um total de 2174 indivíduos com PC e 1756 indivíduos pertencentes ao grupo controle, pretendeu analisar a relação do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ com a periodontite. Ao contrário da presente investigação, encontrou uma associação entre o alelo T e o risco de desenvolvimento de PC no grupo caucasiano. Para as restantes etnias, não se verificou a mesma associação, possivelmente devido à heterogeneidade dos grupos. Realizaram ainda uma avaliação para o gene IL-1A considerando apenas três estudos, incluindo ambos os pacientes fumadores e não fumadores, contudo, não encontraram associação do polimorfismo desse gene com a periodontite. No presente estudo, considerando apenas os pacientes fumadores, embora não se tenha verificado uma associação estatisticamente significativa, observou-se a presença do alelo mutado (T) apenas em pacientes fumadores pertencentes ao grupo periodontite.

De da Silva et al. (2018) realizaram posteriormente outra meta-análise que, para além de incluir os estudos referidos na meta-análise anterior, incluiu ainda mais 33 estudos, perfazendo um total de 54 estudos caso-controle, 21 relativos à população caucasiana, 22 à população asiática, 9 à população mista e 2 à população africana. Perfez um total de 4924 pacientes com PC e 4452 pacientes saudáveis e teve como propósito estudar a associação do polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com a periodontite. Os resultados comprovaram uma associação do alelo T com o grupo periodontite, face ao alelo C que se relacionava maioritariamente com o grupo saúde. Assim, o alelo T foi associado ao aumento do risco de desenvolvimento de periodontite nas populações caucasiana, asiática e mista, mas não para a africana. No entanto, nesta investigação, apesar de se comprovar a existência do alelo T em maior percentagem no grupo periodontite face ao grupo saúde (17,7% *versus* 7,9%), essa associação não é estatisticamente significativa. Por outro lado, a presença do alelo C comprovou-se ser superior no grupo saúde periodontal, conclusão essa coincidente com a meta-análise de da Silva et al. (2018). Verificou-se ainda, com esta meta-análise, uma associação do genótipo TT com a PC, considerando toda a amostra sem distinção por populações. A análise na população africana foi inconclusiva,

primeiramente, devido ao número limitado de estudos incluídos, pelo que deverão realizar-se mais estudos abrangendo este grupo populacional.

Moreira et al. (2005) realizaram um estudo numa população brasileira que envolveu 129 indivíduos saudáveis, com PC ou periodontite agressiva, cujo objetivo era analisar o polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, considerando dois grupos: um apenas com pacientes não fumadores e o outro grupo com ambos os pacientes fumadores e não fumadores. Tendo em conta pacientes fumadores e não fumadores, a frequência alélica do alelo T foi de 25,0% no grupo PC e 11,3% no grupo saúde. Relativamente ao alelo C, este foi mais prevalente no grupo saúde periodontal (88,7%) do que no grupo doença (75,0%). Os resultados apresentados são similares à frequência do alelo C entre grupos, verificada no presente estudo, tendo-se observado uma frequência de 92,1% e 82,3% nos grupos saúde periodontal e periodontite, respetivamente. Contudo, relativamente ao alelo T, constataram-se percentagens relativamente mais baixas, de 17,7% e 7,9%, no grupo periodontite e saúde periodontal, respetivamente. No que concerne às frequências genóticas, no estudo de Moreira et al. (2005), o genótipo CC prevaleceu no grupo saúde periodontal (77,4%), comparativamente ao grupo periodontite (55,77%). No entanto, ambos os genótipos CT e TT apresentaram uma frequência superior no grupo doença, de 38,5% e 5,8%, respetivamente, em comparação com o grupo saúde, de 22,6% e 0,0%. Assim, os resultados para o genótipo CC assemelham-se aos verificados na presente investigação, com percentagens nos grupos saúde e doença, respetivamente, de 84,2% e 66,1%. As diferenças entre os grupos quanto à presença deste genótipo (genótipo CC) foram estatisticamente significativas no presente estudo ($p = 0,048$). No que diz respeito aos genótipos CT e TT, as frequências observadas no presente estudo variam ligeiramente das observadas por Moreira et al. (2005), com frequências de 32,3% para o grupo doença e 15,8% para o grupo saúde para o genótipo CT, e 1,6% para o grupo doença e 0,0% para o grupo saúde relativamente ao genótipo TT. No estudo de Moreira et al. (2005) comprovou-se a associação entre o polimorfismo do IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e a PC, contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo.

Em relação ao polimorfismo do gene IL-1RN, foram poucos os estudos realizados para compreender a sua associação com a periodontite. O estudo de Karasneh et al. (2011), realizado numa população caucasiana da Jordânia, pretendeu estudar a associação de polimorfismos do gene da IL-1, nomeadamente os genes IL-1A e IL-1B, e do gene do IL-1RN, com a periodontite. Relativamente aos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ não se verificou associação destes polimorfismos com a periodontite. Contudo, relativamente

ao gene IL-1RN verificou-se que existia associação entre este polimorfismo e a periodontite, no que diz respeito às frequências alélicas e genóticas. Este estudo apresenta frequências alélicas de 90,0% para o alelo 1 e 10,0% para os alelos 2, 3 e 4 (alelos alterados), sendo que no presente estudo verificou-se uma frequência de 87,0% para o alelo 1 e 13,0% para os alelos mutados 2, 3 e 5. Constata-se uma semelhança nas frequências alélicas observadas para o gene IL-1RN, para os grupos saúde e doença, entre estudos, apesar das diferenças no presente estudo não serem estatisticamente significativas.

Por outro lado, o estudo de Sakellari et al. (2006), realizado numa população caucasiana da Grécia, que estudou os polimorfismos IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), evidenciou não existir uma associação estatisticamente significativa entre a presença destes polimorfismos e a periodontite.

Trevilatto et al. (2011) efetuaram um estudo caso-controle numa população brasileira no sul do Brasil de 113 indivíduos de origens caucasiana, afro-americana, mestiça e japonesa, revelando uma miscigenação elevada na mesma população. Tratavam-se de indivíduos saudáveis, com periodontite moderada ou periodontite severa e teve como intuito relacionar a presença dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2) com a periodontite. A população de origem caucasiana era predominante, existindo uma predominância de ascendência europeia na região sul do Brasil. Relativamente ao polimorfismo dos genes IL-1A e IL-1B, a frequência do alelo T em toda a população foi de 51,3% e 31,0%, respetivamente, tendo-se verificado valores inferiores na presente investigação, de 18,5% e 14,0%. Por outro lado, a frequência do genótipo TT verificada para ambos os polimorfismos IL-1A e IL-1B foi de 5,3% e 3,5%, enquanto no presente estudo se verificou 0,0% e 1,0%, respetivamente. Embora os valores entre ambos os estudos apresentem alguma discrepância, em nenhum deles se comprovou a existência de uma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos dos genes IL-1A e IL-1B e a periodontite. Em relação ao polimorfismo IL-1RN (intrão 2), a frequência alélica dos alelos 1, 2, 3 e 5 foi, respetivamente, 73,9%, 21,7%, 0,9% e 0,0%, sendo que considerando as frequências dos alelos 2/3/5 em conjunto foi de 22,6%. Em comparação com o presente estudo, a frequência do alelo 1 foi ligeiramente superior, 87,0%, ao passo que a frequência dos alelos 2/3/5 foi inferior, 13,0%. Considerou-se que a presença do genótipo 2/2 poderia constituir um indicador de risco para a PC, contrariamente ao verificado no presente estudo, no qual não se obteve associação nem se observaram diferenças significativas entre os grupos periodontite e saúde periodontal.

Para além dos estudos previamente referidos, vários outros estudos de caso-controle realizados em populações distintas, tais como Zuccarello et al. (2014), numa população caucasiana, Isaza-Guzmán et al. (2016), numa população colombiana, Boukourt et al. (2015), numa população argelina, Tanaka et al. (2014), numa população japonesa, entre outros, não encontraram associação entre a presença dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com a PC, coincidindo com os resultados obtidos na presente investigação.

Ambos os estudos de Boukourt et al. (2015) e Wagner et al. (2007), realizados numa população argelina e caucasiana, respetivamente, utilizaram a mesma técnica de genotipagem com base no ensaio Taqman[®] para a avaliação dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, assim como no presente estudo.

O estudo de Wagner et al. (2007) abrangeu um total de 194 indivíduos caucasianos não fumadores, comparativamente à presente investigação que englobou um total de 100 indivíduos caucasianos fumadores e não fumadores. Relativamente à idade dos pacientes, a idade média do grupo com PC foi 55 anos e do grupo saúde 50, tendo, assim, apresentado valores semelhantes ao presente estudo, de 61,2 e 55,5 anos, respetivamente. No que concerne à distribuição por género, verificou-se uma percentagem de género masculino e feminino, no grupo periodontite, de 56,0% e 44,0%, respetivamente, ao passo que no presente estudo as percentagens foram ligeiramente diferentes, de 46,8% e 53,2%, sendo mais elevada a percentagem do género feminino. No grupo saúde, a frequência de género masculino e feminino foi de 60,0% e 40,0%, ao passo que no nosso estudo foi de 36,8% e 63,2%, não sendo, portanto, coincidente. Relativamente às frequências genóticas demonstradas para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, no estudo de Wagner et al. (2007), o genótipo TT foi o mais prevalente no grupo periodontite (55,0%) e o segundo mais prevalente no grupo saúde (33,0%), enquanto no presente estudo o genótipo TT esteve ausente. O genótipo CT foi encontrado com frequências de 35,0% e 46,0% no grupo doença e saúde, respetivamente, sendo que neste estudo se verificaram percentagens ligeiramente superiores no grupo doença, de 41,9%, e inferiores no grupo saúde, de 28,9%. Por outro lado, o genótipo CC revelou uma frequência de 10,0% e 21,0% no grupo doença e saúde, ao passo que no presente estudo se verificaram frequências superiores, de 58,1% e 71,1%, respetivamente. Em relação ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, nesse mesmo estudo, a frequência genótica para o genótipo TT é bastante díspar, relativamente aos valores encontrados na presente investigação. O genótipo TT apresenta uma frequência, no grupo periodontite e saúde, de 37,0% e 9,0%, contrariamente ao

presente estudo, cujo genótipo TT só esteve presente no grupo doença com uma percentagem residual (1,6%). O genótipo CT evidencia percentagens de 37,0% e 34,0% no grupo doença e saúde, ao passo que no presente estudo apresenta valores de 32,3% e 15,8% para o grupo doença e saúde, respetivamente. O genótipo CC esteve presente em menos pacientes do grupo doença (26,0%) comparativamente com indivíduos saudáveis (57,0%), tendo-se observado uma semelhança no presente estudo, no qual a percentagem deste genótipo foi 66,1% e 84,2% no grupo periodontite e saúde, respetivamente.

Os resultados obtidos no estudo de Wagner et al. (2007) vão de encontro ao estudo de Kornman et al. (1997), em que se verificou uma associação entre os polimorfismos nos genes IL-1A e IL-1B em pacientes não fumadores e a periodontite. Contudo, não se verificou, em termos estatísticos, a mesma associação neste estudo, apesar dos genótipos CT e TT e o alelo T (alelo mutado) apresentarem uma maior frequência no grupo periodontite do que no grupo saúde periodontal, para os genes IL-1A e IL-1B.

Kornman et al. (1997) foi o primeiro estudo desenvolvido com o propósito de compreender a relação entre a presença de determinados polimorfismos genéticos e o risco de aparecimento de periodontite. Concluíram que a presença simultânea dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ contribuíam para o aparecimento da periodontite severa em indivíduos caucasianos não fumadores, tendo definido o termo “genótipo positivo” a presença de, pelo menos, um alelo 2 (alelo alterado) em ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴. Nesse sentido, no presente estudo, a frequência de genótipo positivo, considerando toda a amostra, foi de 18,0%, sendo apenas 4 indivíduos (10,5%) pertencentes ao grupo saúde periodontal e 14 indivíduos (22,6%) ao grupo periodontite. Contrariamente à percentagem evidenciada neste estudo, considerando toda a amostra, outros estudos demonstraram outras frequências, nomeadamente 29,1% (Kornman et al., 1997) 29,2% (Trevilatto et al., 2011), 38,9% (Cullinan et al., 2001) e 42,9% (Papapanou et al., 2011). Kornman et al. (1997) consideraram que na presença deste genótipo positivo a incidência de casos graves aumentava, do mesmo modo que Nikolopoulos et al. (2008), na sua meta-análise, concluíram também que na presença deste genótipo existia um risco aumentado de desenvolver PC. Muitos dos estudos realizados relativos a este tema refletem falta de evidências, tornando-se incapazes de concluir acerca desta associação (Huynh-Ba et al., 2007; Kiani et al., 2009).

No que concerne à análise comparativa entre estudos, verificou-se uma elevada heterogeneidade das populações avaliadas no que se refere à etnia, o que se acredita possuir uma relação direta com a prevalência destes polimorfismos genéticos. Não

existem estudos na população portuguesa que tentem relacionar a presença destes polimorfismos com a periodontite. Provavelmente a população portuguesa poderá ter características próprias, em termos de origens étnicas, que possam justificar as diferenças encontradas comparativamente a outras populações europeias.

Nesta investigação, as variáveis género, idade e tabagismo foram avaliadas para garantir uma homogeneidade entre os indivíduos pertencentes aos grupos saúde periodontal e periodontite. Existe uma grande heterogeneidade na literatura acerca da relação de potenciais fatores de risco/variáveis de confusão para a patogénese da periodontite, sendo que uma grande parte dos estudos não avalia estas variáveis, pelo que os seus resultados devem ser cuidadosamente interpretados (Nikolopoulos et al., 2008; Toy & Uslu, 2019). No presente estudo, incluíram-se pacientes fumadores, embora existam estudos que não referem os hábitos tabágicos dos doentes e outros que não têm em conta este fator de risco na análise dos resultados.

Vários estudos defendem ainda que o tamanho reduzido da amostra pode contribuir para a inconsistência estatística de resultados, na comparação destes polimorfismos em diferentes contextos de doença. No entanto, com amostras maiores a definição de características fenotípicas torna-se mais exigente. Adicionalmente, a análise de estudos de caso-controle individualmente pode também contribuir para o insucesso das suas conclusões. Por último, em muitos estudos, a seleção do grupo de controlo e doença foi realizada por diferentes operadores, podendo existir divergências nas classificações.

Apesar de algumas diferenças encontradas entre o presente estudo e alguns estudos publicados na literatura acerca deste tema, é evidente, perante os resultados obtidos, que os alelos e génotipos alterados para os genes em estudo foram mais prevalentes no grupo periodontite relativamente ao grupo saudável. Essas diferenças, apesar de não serem estatisticamente significativas, poderão indicar uma possível tendência para que indivíduos com essas alterações genéticas sejam mais propensos para o desenvolvimento da periodontite.

Assim, acredita-se que a compreensão da síntese e dos mecanismos reguladores de determinadas citocinas, nomeadamente a IL-1, poderá permitir o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a periodontite. A expressão de citocinas é própria de cada indivíduo, pelo que poderá ser útil a determinação do génotipo de cada paciente previamente ao tratamento (Sripichai & Fucharoen, 2007). Neste sentido, tal como defendem alguns estudos, a inibição da produção de IL-1, através de mecanismos de

regulação e de terapia com inibidores de citocinas em estágios iniciais da doença, poderá auxiliar quer na prevenção como no tratamento de doenças inflamatórias, como a periodontite (Barksby et al., 2007; Deo & Bhongade, 2010). Contudo, estas possíveis áreas de ação, na abordagem terapêutica da periodontite, carecem de mais investigação e pesquisa.

VI. CONCLUSÕES

A literatura disponível fornece evidências que permitem elucidar sobre quais os fatores contributivos para a etiopatogenia da periodontite. A periodontite trata-se de uma doença crônica multifatorial que requer a presença de um determinado biofilme bacteriano para o seu início. Adicionalmente, a resposta mediada pelo hospedeiro, face à agressão a que está sujeito, resulta na concretização de várias reações, nomeadamente a produção de citocinas inflamatórias.

Neste sentido, têm vindo a ser realizados vários estudos para tentar compreender a relação da componente genética com o risco de desenvolvimento de periodontite. A controvérsia entre os estudos realizados relativos aos polimorfismos da IL-1, em várias populações e diferentes etnias, é sugestiva da contribuição de outros fatores, denominados fatores de confusão, que podem também contribuir para a suscetibilidade à doença. Em relação ao presente estudo, tendo em consideração apenas os indivíduos fumadores, observou-se a presença de alelos alterados apenas no grupo doença, apesar de não ter sido estatisticamente significativo.

Considerando os resultados obtidos com a presente investigação, não se comprovou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intron 2) e a periodontite. Apesar de se ter verificado um aumento da presença do alelo alterado (alelo T), bem como dos genótipos CT e TT no grupo doença, relativamente ao grupo saúde periodontal, não se pode concluir uma associação com a periodontite. Não se comprovaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos quanto à presença do genótipo positivo, embora a presença deste genótipo seja consideravelmente mais elevada no grupo doença, quando comparada com o grupo saúde. No entanto, as diferenças encontradas entre os grupos foram estatisticamente significativas para a presença mais elevada do genótipo CC (sem alteração) no gene IL-1B no grupo saúde, comparativamente ao grupo doença. Assim, os resultados poderão indicar uma possível tendência para que indivíduos com alterações genéticas nos genes IL-1A e IL-1B sejam mais suscetíveis para o desenvolvimento de periodontite.

Com o avanço do conhecimento adquirido sobre a temática da relação de fatores genéticos e o desenvolvimento de doenças, nomeadamente a periodontite, torna-se imprescindível compreender o perfil de suscetibilidade individual de cada paciente e,

assim, obter uma maior previsibilidade nas técnicas de diagnóstico e tratamento individuais.

VII. PERSPETIVAS FUTURAS

Torna-se fulcral a realização de novos estudos com padronização de metodologias que culminem em maiores níveis de evidência, tais como estudos de coorte/longitudinais.

Tratando-se a periodontite de uma doença multifatorial, é fundamental, para além do estudo da componente genética, a inclusão de fatores de risco/ambientais que possam contribuir para a sua patogénese (exemplos: tabagismo, condições sistémicas, níveis de índice de placa e índice gengival, entre outros), bem como a compreensão de perfis microbiológicos específicos.

Adicionalmente, é ainda fundamental o desenvolvimento de estudos com maior tamanho da amostra, com o devido controlo das características fenotípicas, no sentido da obtenção de conclusões mais robustas em diferentes populações. A realização de novos estudos deve ainda incluir as formas de progressão rápida da periodontite (“Periodontite agressiva” na antiga Classificação de Doenças e Condições Periodontais” de 1999), para tentar compreender se existe alguma relação destas formas da doença com a presença de polimorfismos genéticos.

Por último, deverá ter-se em consideração a miscigenação mesmo dentro da mesma população para que, desta forma, se possa reduzir ao máximo a heterogeneidade entre estudos.

É imperiosa a continuação da procura de evidências acerca deste tema, uma vez que permanece controverso, podendo, caso se verifique associação, auxiliar num melhor diagnóstico e tratamento de pacientes com periodontite.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Koofee, D. A. F., & Mubarak, S. M. H. (2020). Genetic Polymorphisms. In M. Çalışkan, O. Erol, & G. C. Öz (Eds.), *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms* (pp. 1-15). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88063>
- Alawaji, Y. N., Alshammari, A., Mostafa, N., Carvalho, R. M., & Aleksejuniene, J. (2022). Periodontal disease prevalence, extent, and risk associations in untreated individuals. *Clinical and Experimental Dental Research*, 8(1), 380-394. <https://doi.org/10.1002/cre2.526>
- Almeida, R. F., Pinho, M. M., Lima, C., Faria, I., Santos, P., & Bordalo, E. C. (2006). Associação entre doença periodontal e patologias sistémicas. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 22(3), 379-390. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v22i3.10250>
- Aral, K., Milward, M. R., Kapila, Y., Berdeli, A., & Cooper, P. R. (2020). Inflammasomes and their regulation in periodontal disease: A review. *Journal of Periodontal Research*, 55(4), 473-487. <https://doi.org/10.1111/jre.12733>
- Armitage, G. C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1-6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Ashby, M. T., Kreth, J., Soundarajan, M., & Sivuilu, L. S. (2009). Influence of a model human defensive peroxidase system on oral streptococcal antagonism. *Microbiology (Reading)*, 155(11), 3691-3700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031310-0>
- Bakhtiari, M., Park, J., Ding, Y.-C., Shleizer-Burko, S., Neuhausen, S. L., Halldórsson, B. V., Stefánsson, K., Gymrek, M., & Bafna, V. (2021). Variable number tandem repeats mediate the expression of proximal genes. *Nature Communications*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22206-z>
- Barksby, H. E., Lea, S. R., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical & Experimental Immunology*, 149(2), 217-225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03441.x>

- Boukourt, K. N., Saidi-Ouahrani, N., Boukerzaza, B., Ouhaibi-Djellouli, H., Hachmaoui, K., Benaissa, F. Z., Taleb, L., Drabla-Ouahrani, H., Deba, T., Ouledhamou, S. A., Mehtar, N., & Boudjema, A. (2015). Association analysis of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the Algerian population. *Archives of Oral Biology*, *60*(10), 1463-1470. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.018>
- Brodzikowska, A., Górska, R., & Kowalski, J. (2019). Interleukin-1 Genotype in Periodontitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *67*(6), 367-373. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00555-4>
- Cai, Z., Lin, S., Hu, S., & Zhao, L. (2021). Structure and Function of Oral Microbial Community in Periodontitis Based on Integrated Data. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.663756>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions — Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, *89*(1), S1-S8. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0157>
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, *45*(20), S68-S77. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>
- Chen, Y.-J., Han, Y., Mao, M., Tan, Y.-Q., Leng, W.-D., & Zeng, X.-T. (2015). Interleukin-1 β rs1143634 polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(2), 2308-2316. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25932167/>

- Churg, A., Zhou, S., Wang, X., Wang, R., & Wright, J. L. (2009). The Role of Interleukin-1b in Murine Cigarette Smoke–Induced Emphysema and Small Airway Remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(4), 482-490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>
- Cullinan, M. P., Westerman, B., Hamlet, S. M., Palmer, J. E., Faddy, M. J., Lang, N. P., & Seymour, G. J. (2001). A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(12), 1137-1144. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2001.281208.x>
- da Silva, F. R. P., Vasconcelos, A. C. C. G., França, L. F. C., Di Lenardo, D., Rodrigues, L. S., do Nascimento, M. L. L. B., & Vasconcelos, D. F. P. (2017). Relationship between -889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis with new published findings. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 22(1), e7-e14. <https://doi.org/10.4317/medoral.21233>
- da Silva, F. R. P., Vasconcelos, A. C. C. G., França, L. F. C., Di Lenardo, D., Nascimento, H. M. S., & Vasconcelos, D. F. P. (2018). Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: Results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. *Gene*, 668, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.05.067>
- Danis, V. A., Millington, M., Hyland, V. J., & Grennan, D. (1995). Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clinical & Experimental Immunology*, 99(2), 303-310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb05549.x>
- de Carvalho, F. M., Tinoco, E. M. B., Govil, M., Marazita, M. L., & Vieira, A. R. (2009). Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(6), 468-473. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01410.x>

- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260-265. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>
- Deng, J.-S., Qin, P., Li, X.-X., & Du, Y.-H. (2012). Association between interleukin-1 β C (3953/4)T polymorphism and chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis. *Human Immunology*, 74(3), 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.018>
- Deng, J.-S., Qin, P., Li, X.-X., & Du, Y.-H. (2013). Association between interleukin-1 β C (3953/4)T polymorphism and chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis. *Human Immunology*, 74(3), 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.018>
- Deo, V., & Bhongade, M. L. (2010). Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dentistry Today*, 29(9), 60-69. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20973418/>
- Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20(5), 1-13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14989423/>
- Ding, C., Zhao, L., Sun, Y., Li, L., & Xu, Y. (2012). Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: A meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 585-593. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.01.016>
- Feng, X., & Liu, J. (2020). Association between IL-1A (-889C/T) polymorphism and susceptibility of chronic periodontitis: A meta-analysis. *Gene*, 729(6). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144227>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 62(1), 59-94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>

- Global Burden of Disease 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390(10100), 1211-1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- Gonçalves, P. F., Harris, T. H., Elmariah, T., Aukhil, I., Wallace, M. R., & Shaddox, L. M. (2018). Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. *Journal of Periodontal Research*, 53(2), 164-173. <https://doi.org/10.1111/jre.12505>
- Graves, D. (2008). Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 79(8), 1585-1591. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080183>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391-401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Greenstein, G., & Hart, T. C. (2002). A Critical Assessment of Interleukin-1 (IL-1) Genotyping When Used in a Genetic Susceptibility Test for Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 73(2), 231-247. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.2.231>
- Gross, A. J., Paskett, K. T., Cheever, V. J., & Lipsky, M. S. (2017). Periodontitis: A global disease and the primary care provider's role. *Postgraduate Medical Journal*, 93(1103), 560-565. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2017-134801>
- Hajishengallis, G., Sojar, H., Genco, R. J., & DeNardin, E. (2004). Intracellular Signaling and Cytokine Induction upon Interactions of *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae with Pattern-Recognition Receptors. *Immunological Investigations*, 33(2), 157-172. <https://doi.org/10.1081/IMM-120030917>
- Hegde, R., & Awan, K. H. (2019). Effects of periodontal disease on systemic health. *Disease-a-Month*, 65(6), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.09.011>

- Heitz-Mayfield, L. J. A. (2005). Disease progression: Identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 196-209. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00803.x>
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F. E., Vernal, R., Sorsa, T., & Gamonal, J. (2011). Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90(10), 1164-1170. <https://doi.org/10.1177/0022034511401405>
- Holtfreter, B., Albandar, J. M., Dietrich, T., Dye, B. A., Eaton, K. A., Eke, P. I., Papapanou, P. N., Kocher, T., & Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. (2015). Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(5), 407-412. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12392>
- Humar, A., St. Louis, P., Mazzulli, T., McGeer, A., Lipton, J., Messner, H., & MacDonald, K. S. (1999). Elevated Serum Cytokines Are Associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(2), 484-488. <https://doi.org/10.1086/314602>
- Huynh-Ba, G., Lang, N. P., Tonetti, M. S., & Salvi, G. E. (2007). The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(4), 305-317. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01055.x>
- Isaza-Guzmán, D. M., Hernández-Viana, M., Bonilla-León, D. M., Hurtado-Cadauid, M. C., & Tobón-Aroyave, S. I. (2016). Determination of NLRP3 (rs4612666) and IL-1B (rs1143634) genetic polymorphisms in periodontally diseased and healthy subjects. *Archives of Oral Biology*, 65, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.01.013>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

- Karasneh, J. A., Ababneh, K. T., Taha, A. H., Al-Abbadi, M. S., & Ollier, W. E. (2011). Investigation of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms in Jordanian patients with chronic and aggressive periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 56(3), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.001>
- Karimbux, N. Y., Saraiya, V. M., Elangovan, S., Allareddy, V., Kinnunen, T., Kornman, K. S., & Duff, G. W. (2012). Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Chronic Periodontitis in Adult Whites: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 83(11), 1407-1419. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110655>
- Kiani, Z., Tavakkol-Afshari, J., Hojjat, H., Arab, H. R., Radvar, M., Sadeghizadeh, M., & Ebadian, A. R. (2009). Polymorphism of IL-1 α (-889) Gene and Its Association with Aggressive Periodontitis. *Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology*, 8(2), 95-98. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19671938/>
- Kinane, D. F., & Hart, T. C. (2003). GENES AND GENE POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASE. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(6), 430-449. <https://doi.org/10.1177/154411130301400605>
- Kinane, D. F., & Lappin, D. F. (2002). Immune Processes in Periodontal Disease: A Review. *Annals of Periodontology*, 7(1), 62-71. <https://doi.org/10.1902/annals.2002.7.1.62>
- Kinane, D. F., Shiba, H., & Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 39(1), 91-117. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00118.x>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1-14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Koch, A., & de Andrade, F. M. (2008). A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: Uma revisão. *Revista brasileira de análises clínicas*, 40(1), 17-23. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-510670>
- Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. -Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson Jr, T. G., Higginbottom, F. L., & Duff, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb01187.x>

- Kornman, K. S., Newman, M. G., Moore, D. J., & Singer, R. E. (1994). The Influence of Supragingival Plaque Control on Clinical and Microbial Outcomes Following the Use of Antibiotics for the Treatment of Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 65(9), 848-854. <https://doi.org/10.1902/jop.1994.65.9.848>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kumar, S. (2019). Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dental Clinics of North America*, 63(1), 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.005>
- Laine, M. L., Crielaard, W., & Loos, B. G. (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology 2000*, 58(1), 37-68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00415.x>
- Linhartova, P. B., Danek, Z., Deissova, T., Hromcik, F., Lipovy, B., Szaraz, D., Janos, J., Fassmann, A., Bartova, J., Drizhal, I., & Holla, L. I. (2020). Interleukin Gene Variability and Periodontal Bacteria in Patients with Generalized Aggressive Form of Periodontitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1-24. <https://doi.org/10.3390/ijms21134728>
- Mesa, F., Lanza, E., García, L., Marfil-Alvarez, R., & Magan-Fernandez, A. (2017). Polymorphism IL-1RN rs419598 reduces the susceptibility to generalized periodontitis in a population of European descent. *PLOS ONE*, 12(10), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186366>
- Michaud, D. S., Fu, Z., Shi, J., & Chung, M. (2017). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiologic Reviews*, 39(1), 49-58. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxx006>

- Montes, C. C., Alvim-Pereira, F., De Castilhos, B. B., Sakurai, M. L. L., Olandoski, M., & Trevilatto, P. C. (2009). Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clinical Oral Implants Research*, 20(2), 208-217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01629.x>
- Moreira, P. R., de Sa, A. R., Xavier, G. M., Costa, J. E., Gomez, R. S., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2005). A functional interleukin-1beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*, 40(4), 306-311. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00801.x>
- Nagpal, R., Yamashiro, Y., & Izumi, Y. (2015). The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/793898>
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 1(2), 72-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28539867/>
- Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
- Nicklin, M. J., Weith, A., & Duff, G. W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, beta and the interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*, 19(2), 382-384. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1076>
- Nikolopoulos, G. K., Dimou, N. L., Hamodrakas, S. J., & Bagos, P. G. (2008). Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: A meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(9), 754-767. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01298.x>
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 34(3), 235-249. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/765622/>

- Papapanou, P. N., Neiderud, A.-M., Sandros, J., & Dahlén, G. (2001). Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status: A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(5), 389-396. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028005389.x>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), S173-S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Pierce, K. E., & Wangh, L. J. (2004). Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays. *BioTechniques*, 36(1), 44-46. <https://doi.org/10.2144/04361BM04>
- Pociot, F., MØlvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., & Nerup, J. (1992). A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*, 22(6), 396-402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01480.x>
- Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education*, 28(1-4), 44-50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>
- Reuter, M., Küpper, Y., Schmitz, A., Breuer, J. P., Wend, U., & Hennig, J. (2005). Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. *Journal of Genetics*, 84(3), 341-345. <https://doi.org/10.1007/BF02715807>
- Sakellari, D., Katsares, V., Georgiadou, M., Kouvatsi, A., Arsenakis, M., & Konstantinidis, A. (2006). No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(11), 765-770. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00983.x>
- Salazar-Pelaéz, L. M., Grisales, R. O. F., Yepes, O. E. Z., Vargas, K. O., & Calle, D. T. (2012). Il-1 gene polymorphisms and the risk of chronic periapical periodontitis in

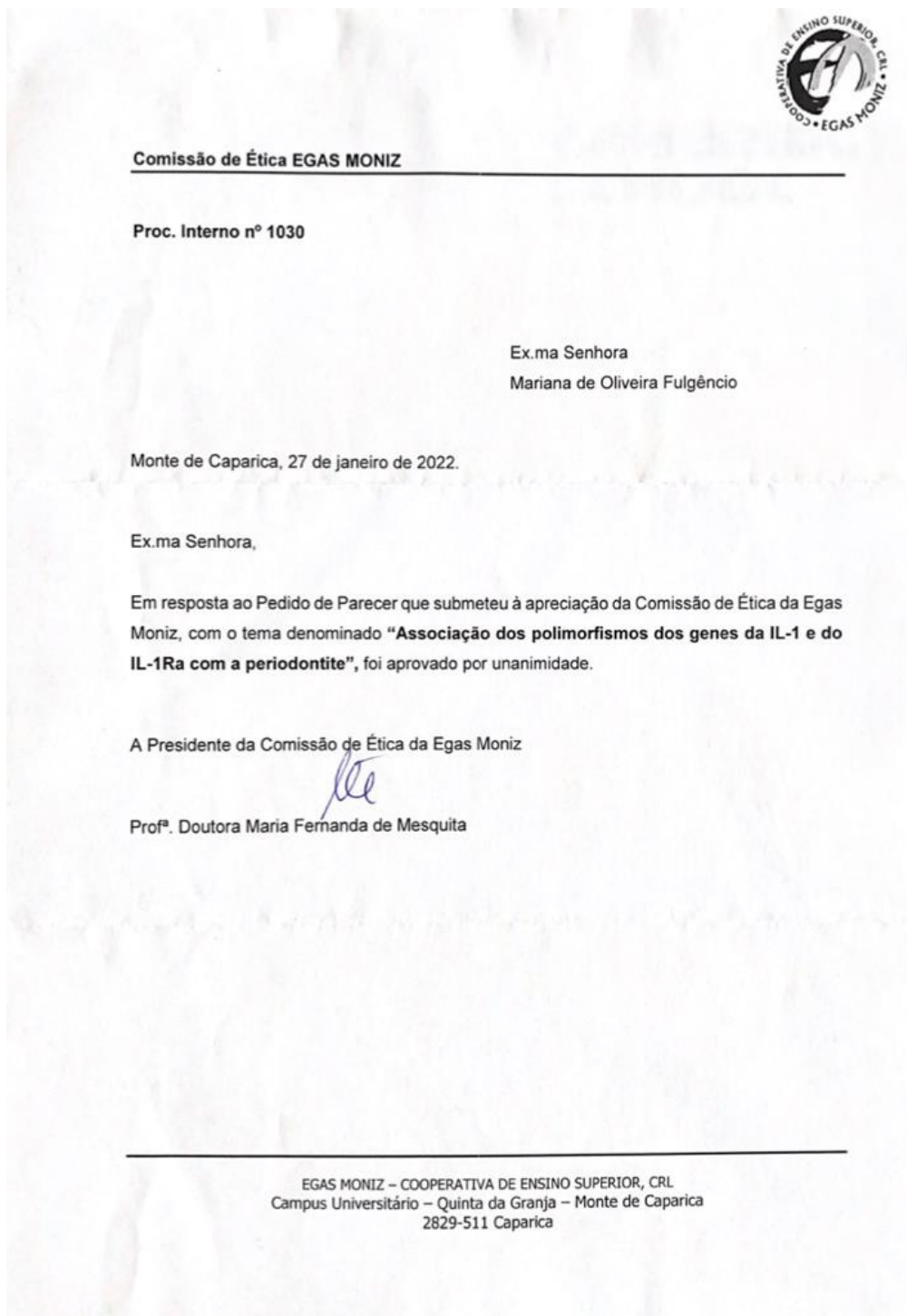
- a population from Antioquia, Colombia. *Archives of Oral Research*, 8(1), 19-30.
<https://doi.org/10.1902/jop.2012.110655>
- Santtila, S., Savinainen, K., & Hurme, M. (1998). Presence of the IL-1RA Allele 2 (IL1RN*2) is Associated with Enhanced IL-1b Production In Vitro. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47(3), 195-198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00300.x>
- Sartoretto, L. M., & Farias, P. C. M. (2010). Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. *Unoesc & Ciência – ACET*, 1(2), 155-162.
https://www.researchgate.net/publication/277065907_Diversidade_genetica_e_tecnicas_biotecnologicas
- Shaddox, L. M., Huang, H., Lin, T., Hou, W., Harrison, P. L., Aukhil, I., Walker, C. B., Klepac-Ceraj, V., & Paster, B. J. (2012). Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 91(10), 927-933.
<https://doi.org/10.1177/0022034512456039>
- Shaddox, L. M., Morford, L. A., & Nibali, L. (2021). Periodontal health and disease: The contribution of genetics. *Periodontology 2000*, 85(1), 161-181.
<https://doi.org/10.1111/prd.12357>
- Shirodaria, S., Smith, J., McKay, I. J., Kennett, C. N., & Hughes, F. J. (2000). Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *Journal of Dental Research*, 79(11), 1864-1869.
<https://doi.org/10.1177/00220345000790110801>
- Slots, J. (1999). Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000*, 20(1), 7-13.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00155.x>
- Sripichai, O., & Fucharoen, S. (2007). Genetic Polymorphisms and Implications for Human Diseases. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 90(2), 394-398.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17375650/>

- Stanko, P., & Holla, L. I. (2014). Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A Review. *Biomedical Papers*, 158(1), 35-38. <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.005>
- Suzuki, S., & Yamada, S. (2022). Epigenetics in susceptibility, progression, and diagnosis of periodontitis. *Japanese Dental Science Review*, 58, 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2022.06.001>
- Tadjoedin, F. M., Fitri, A. H., Kuswandani, S. O., Sulijaya, B., & Soeroso, Y. (2017). The correlation between age and periodontal diseases. *Journal of International Dental and Medical Research*, 10(2), 327-332. <https://scholar.ui.ac.id/en/publications/the-correlation-between-age-and-periodontal-diseases>
- Takashiba, S., & Naruishi, K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 94-106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00142.x>
- Tanaka, K., Miyake, Y., Hanioka, T., & Arakawa, M. (2014). Relationship between IL1 gene polymorphisms and periodontal disease in Japanese women. *DNA and Cell Biology*, 33(4), 227-233. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2202>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S149-S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>
- Toy, V., & Uslu, M. (2019). Do genetic polymorphisms affect susceptibility to periodontal disease? A literature review. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 22(4), 445-453. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_462_18
- Trevilatto, P. C., Pardo, A. P. S., Scarel-Caminaga, R. M., de Brito, R. B., Alvim-Pereira, F., Alvim-Pereira, C. C., Probst, C. M., Garlet, G. P., Sallum, A. W., & Line, S. R. P. (2011). Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Archives of Oral Biology*, 56(1), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.09.004>

- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619-626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- Verma, K., Dalal, J., & Sharma, S. (2014). SCIENTIFIC CONCEPTS OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(8), 3086-3095. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(8\).3086-95](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(8).3086-95)
- Vijayalakshmi, R., Geetha, A., Ramakrishnan, T., & Emmadi, P. (2010). Genetic polymorphisms in periodontal diseases: An overview. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 568-574. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74226>
- Wagner, J., Kaminski, W. E., Aslanidis, C., Moder, D., Hiller, K. A., Christgau, M., Schmitz, G., & Schmalz, G. (2007). Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(10), 823-827. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01132.x>
- Walker, N. J. (2002). A Technique Whose Time Has Come. *Science*, 296(5567), 557-559. <https://doi.org/10.1126/science.296.5567.557>
- Wankhede, A. N., Wankhede, S. A., & Wasu, S. P. (2017). Role of genetic in periodontal disease. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization*, 9(2), 53-58. https://doi.org/10.4103/jicdro.jicdro_10_17
- Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., & Galicia, J. C. (2007). The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*, 43, 102-132. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00164.x>
- Zuccarello, D., Bazzato, M. F., Ferlin, A., Pengo, M., Frigo, A. C., Favero, G., Foresta, C., & Stellini, E. (2014). Role of familiarity versus interleukin-1 genes cluster polymorphisms in chronic periodontitis. *Gene*, 535(2), 286-289. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.016>

IX. ANEXOS

Anexo 1 (Carta de aprovação da Comissão de Ética do IUEM)



Anexo 2 (Consentimento Informado)



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, ____ de _____ 2022

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Unidade Curricular de Orientação Tutorial de Projeto Final do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), sob a orientação do Prof. Doutor Ricardo Alves e coorientação do Mestre José Maria Cardoso e da Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, solicita-se autorização para a participação no estudo "Associação dos polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra com a periodontite". Este estudo está integrado num projeto CiiEM Investiga com o título "Associação dos polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra com a peri-implantite". Será realizado em pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz com o objetivo de avaliar a eventual relação entre a existência de polimorfismos nos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN e a presença de periodontite entre pacientes com periodontite diagnosticada (inflamação e perda óssea à volta dos dentes) e pacientes com saúde periodontal (tecidos em redor do dente normais).

Para a análise genética será usado na parte interna da bochecha, um dispositivo semelhante a um cotonete, para a obtenção de células da mucosa oral.

Além da avaliação clínica será efetuado um breve questionário acerca de dados relevantes da história clínica. O tempo estimado para a recolha dos dados é de aproximadamente 10 minutos.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. Após tratamento dos dados obtidos as amostras serão eliminadas. O tempo previsto para a sua eliminação será de 2 anos. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Anexo 3 (Questionário)



Questionário _____

Data: __/__/__

Idade

Preencha com uma cruz (X) ou com a informação pedida.

Género	M	F
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Gravidez	S	N
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Amamentação	S	N
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pais e avós de origem caucasiana

S	N

Apresenta alguma doença imune ou inflamatória?

(Doenças genéticas, Doenças que afetem a mucosa oral e o tecido gengival, Doenças que afetem o tecido conjuntivo, Doenças endócrinas e metabólicas, Infecção por HIV, Diabetes mellitus, Artrite etc.)

S	N

Se sim qual? _____

História de Hepatite?

S	N

Se sim qual? _____

Hábitos Tabágicos	Sim	Não	Média de Cigarros por dia
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Ex-fumador

Anexo 4 (Autorização para utilização de figuras)



Mikael Kubista

para mim ▾

Mariana,
You are welcome!
Good luck
Mikael

[Signup for TATAA Newsletter!](#)



Mikael Kubista Ph.D.

From: Mariana Fulgêncio <marianaofulgencio@gmail.com>

Sent: Sunday, September 11, 2022 9:30 PM

To: Mikael Kubista <mikael.kubista@tataa.com>

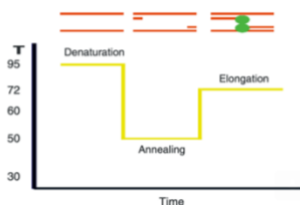
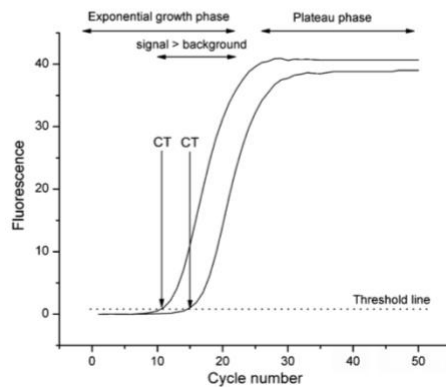
Subject: Solicitation for the use of private property from the article "The real-time polymerase chain reaction"

Dear M. Kubista,

My name is Mariana Fulgêncio and I am currently finishing the writing of my master's thesis, to finish my degree in Dentistry at IUEM, Portugal. I am sending this email regarding in order to ask your permission to use the two pictures attached below, in the following article "The real-time polymerase chain reaction" since I'm discussing the topic of real time pcr and pcr in my thesis.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicina*, 67(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

The pictures I would like to use are the following one:



Thank you for your time and consideration,

Best regards,

Mariana Fulgêncio