

Adriana Machado Saraiva

**Avaliação de polimorfismos gênicos e
da expressão fenotípica de moléculas
envolvidas com a resposta imune na doença
periodontal**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Adriana Machado Saraiva

**Avaliação de polimorfismos gênicos e
da expressão fenotípica de moléculas
envolvidas com a resposta imune na doença
periodontal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Dra Paula Rocha Moreira

Co-orientadora: Dra Walderez Ornelas Dutra

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Este projeto tem a colaboração dos seguintes pesquisadores:

Dr. Kenneth John Gollob, Instituto de Estudo e Pesquisa, Hospital Santa Casa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; INCT-DT, Center for Infections Disease Research, Biosciences Division; SRI International, Melo Park, CA, USA.

Dr. José Eustáquio da Costa, Departamento de Cirurgia, Clínica e Patologia Odontológicas, Faculdade de Odontologia / UFMG, Brasil.

“...re intellecta, in verbis simus faciles...”

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

À Profa. Paula Rocha Moreira por saber dividir seus conhecimentos de forma tão especial. Agradeço a oportunidade de ter passado esta fase de minha vida sob sua dedicada e competente orientação. Obrigada por ter expandido o horizonte dos meus conhecimentos.

À Profa. Walderez Ornelas Dutra por permitir que este trabalho fosse desenvolvido. Obrigada por contribuir com sua grande experiência.

Aos Profs. José Eustáquio da Costa e Kenneth John Gollob pela colaboração.

À Profa Micena Alves e Silva pelas contribuições.

À Profa. Juliana Estanislau, Kayla Veruska e colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares pelo apoio e atenção.

Às queridas Érica Leandro e Tatjana Keesen pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção, generosidade, bondade, carinho e amizade.

À Jeane Silva por compartilhar seus conhecimentos de forma tão fraternal.

Aos pacientes que generosamente participaram deste trabalho.

Às agências financiadoras CAPES e CNPq, que viabilizaram este trabalho.

Às amigas de todas as horas Sabrina A Guerra e Carolina O Rodrigues.

À minha querida família e amigos que me apoiam em todos os momentos.

Ao meu pai João Antonio Filocre Saraiva pelos ensinamentos e apoio.

Às queridas irmãs Juliana, Carolina e Marina pelo constante apoio, incentivo e carinho.

Aos sobrinhos Thiago e Patrícia pela alegria.

Ao Alex Simonetti Abreu companheiro e parceiro querido, pela constante ajuda, dedicação, paciência e carinho. Obrigada pelas lindas trilhas de bike, que me permitiram sentir a alegria de estar ao seu lado. Você contribuiu muito, muito, muito e de muitas, muitas, muitas formas para este trabalho.

Em especial a minha querida mãe, Janine Rabelo Machado, que sempre acreditou em mim. Obrigada pelo incondicional apoio. Sua dedicação, presença, incentivo, paciência, alegria e carinho me confortaram durante esta jornada. Seus conselhos me deram força para seguir e enfrentar os desafios. Seu amor me faz ser uma pessoa melhor. Agradeço a Deus a oportunidade de viver ao seu lado.

RESUMO

Periodontite é uma doença multifatorial associada à inflamação, que leva à destruição do periodonto, com conseqüente perda do tecido ósseo alveolar e do órgão dental. A presença de bactéria Gram-negativa é necessária para iniciar e perpetuar a periodontite, mas o papel de fatores fenotípicos e genotípicos na resposta imune é essencial para a manutenção e progressão da doença. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um estudo fenotípico e genotípico de moléculas envolvidas na resposta imune dos indivíduos com diferentes formas da periodontite na população brasileira. O objetivo específico foi investigar a expressão das moléculas HLA-DR, CD69, CD80, CD86, CD28, CTLA4, IL10, TNF- α , IFN- γ e IL17A em linfócitos e monócitos na presença e ausência de LPS; assim como investigar a ocorrência dos polimorfismos gênicos de *IL17A* (rs2275913), *IL17F* (rs763780), *IL23R* (rs11209026), *STAT1* (rs3771300), *STAT4* (rs7574865) e *NFkB1* (rs721412) nas diferentes formas clínicas da periodontite. No estudo fenotípico foi coletado sangue periférico de 86 indivíduos não fumantes e analisados por citometria de fluxo. No estudo genotípico, o raspado de mucosa jugal foi coletado de 181 indivíduos não fumantes, o DNA genômico foi obtido e analisado por PCR *Real-Time*. O grupo de estudo foi composto de indivíduos sem a doença periodontal (controle), com periodontite agressiva (PA) e com periodontite crônica (PC). LPS- *P.gingivalis* foi capaz de aumentar a frequência e intensidade de CD80, TNF- α e IFN- γ e diminuir IL10 por células CD14+ e CD4+. Embora *P.gingivalis* tenha sido capaz de reduzir a expressão de CD86, sua intensidade média de expressão esteve maior em PA comparado a C. Este resultado mostra a importância de CD86 na resposta imune da periodontite. Em todos os grupos e condições de cultura a frequência de CD28- foi maior do que CTLA4+ em células CD4+ e CD8+. LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis* apresentaram diferente influência na expressão de moléculas co-estimuladoras. Maior frequência de células IL17A+CD4+ foi observada no grupo controle. O genótipo A+ de *IL17A* (rs2275913) foi associado à ausência da doença, e a presença do alelo G de *STAT1*(rs3771300) foi associado com a ocorrência de PA, assim como com a gravidade da doença. Nenhuma associação foi encontrada nos polimorfismos de *IL17F*, *IL23R*, *STAT4* e *NFkB1*. Nossos dados sugerem que o alelo A de *IL17A* (rs2275913) esteja associado com a ausência de doença periodontal e o alelo G de *STAT1*(rs3771300) com PA. Os achados fenotípicos produzem novos questionamentos sobre o papel de diferentes subtipos celulares na resposta imune relacionada à periodontite.

ABSTRACT

Periodontitis is a multifactorial disease associated with inflammation, destruction of periodontal attachment, bone and tooth loss. The presence of Gram-negative bacteria is necessary to initiate and perpetuate periodontitis, but the role of phenotypic and genetic factors in the immune response are essential for maintenance and progression of disease. The aim of present study was to perform a phenotypic and genotypic study of molecules involved with immune response in individuals with different forms of periodontitis in Brazilian population. The specific aims were to investigate the expression of molecules HLA-DR, CD69, CD80, CD86, CD28, CTLA4, IL10, TNF- α , IFN- γ and IL17A from lymphocytes and monocytes in presence or absence of LPS; and to investigate the occurrence of the *IL17A* (rs2275913), *IL17F* (rs763780), *IL23R* (rs11209026), *STAT1* (rs3771300), *STAT4* (rs7574865) and *NFkB1* (rs721412) gene polymorphisms in different clinical forms of periodontitis. To phenotypic study peripheral blood was obtained from 86 non-smoker individuals and analyzed by flow cytometry. Genomic DNA was obtained from oral swabs in 181 individuals and analyzed by Real-Time PCR to perform genotypic study. The study group was composed by individuals without periodontitis (control), with aggressive periodontitis (AP) and with chronic periodontitis (CP). LPS-*P.gingivalis* was able to increase the frequency and expression intensity of CD80, TNF- α and IFN- γ and decrease of IL10 from CD14+ and CD4+ cells. Even though the *P.gingivalis* has been able to reduce the expression of CD86, this molecule also was higher in AP than Control. This result shows the importance of CD86 in immune response of periodontitis. In all groups and conditions the frequency of CD28- was higher than CTLA4+ in CD4+ and CD8+ cells. LPS-*E.coli* and LPS-*P.gingivalis* have different influence on co-stimulatory molecules expression. Higher frequency of IL17A+CD4+Tcells was observed in control group. The A+ genotype from *IL17A* (rs2275913) was associated with lack of disease, and the presence of the G allele for *STAT1*(rs3771300) was associated with the occurrence of AP, as well as with severity disease. No association was found considering the *IL17F*, *IL23R*, *STAT4* and *NFkB1* polymorphisms. Our data suggest that the A allele of *IL17A* (rs2275913) is associated with the absence of periodontal disease and G allele for *STAT1*(rs3771300) with AP. The phenotypic findings produced new questions about the role of different cell subtypes in the immune response of periodontitis.

LISTA DE ABREVIATURAS

(A>C)- troca de Adenina por Citosina

(A>G)- troca de Adenina por Guanina

(G>A)- troca de Guanina por Adenina

(G>T)- troca de Guanina por Timina

(T>C)- troca de Timina por Citosina

A-Adenina

AP-1 – *Activator Protein-1*

C- Citosina

CD- *Cluster of Differentiation*

CMSP- Células Mononucleares do Sangue Periférico

CTLA- *Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Antigen*

DNA- *Deoxiribonucleic Acid*

G- Guanina

HLADR- *Human Leukocyte Antigen Domain Receptor*

hsp – *heat shock protein*

ICAM- *Intracellular Molecular Adhesion*

IFN- γ - *Interferon gamma*

Ig- Imunoglobulina

I κ B – *Inhibits NF-kappa B*

IL- Interleucina

JAK – *Janus-kinase*

Kb – kilo base

LPS- Lipopolissacarídeo

MCP- *Monocytes Chemoattractant Protein*

MIP- *Macrophage Inflammatory Protein*

NFkB- *Nuclear Factor-kappa Beta*

NK- *Natural Killer*

PA- *Periodontite Agressiva*

PBS- *Phosphate Buffer Saline*

PC- *Periodontite Crônica*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PI- *Perda de Inserção*

PI3-K- *Phosphoinositide 3-kinase*

R- *Receptor*

RNAm- *Ribonucleic Acid Messenger*

Rs – *reference sequence*

SH-2 – *Src homology domain-2*

SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*

Src – “sarcoma” (família de tirosino quinase)

STAT- *Signal Transducer and Activator*

T- *Timina*

Taq- *Thermus aquatius*

TCR- *T-Cell Receptor*

TF- *Transcription Factor*

Th- *T helper*

TLR- *Toll-Like Receptors*

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil dos indivíduos avaliados no estudo genotípico e fenotípico.....46

Tabela 2: Variáveis relevantes para o modelo de regressão logística binomial para análise de fatores de risco para Doença Periodontal Crônica e Agressiva.....61

Tabela 3: Estimativas de parâmetros para análise de regressão logística binomial.62

Tabela 4: Frequência (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das moléculas de superfície CD80, CD86 e HLA-DR em células CD14+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).66

Tabela 5: Análise da razão entre as frequências (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de células CD14+CD80+/CD14+CD86+ na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).70

Tabela 6: Análise da expressão das citocinas TNF- α e IL10 por células CD14+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo

(Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).....70

Tabela 7: Análise da razão entre as frequências (%) de células CD14+IL10+/CD14+TNF- α + na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).....72

Tabela 8: Análise de frequência (%) de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as moléculas de superfície CD28-, CTLA4 e CD69, dentro da população de linfócitos totais, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).....75

Tabela 9: Análise de frequência (%) de células CD4+ e CD8+ co-expressando TNF- α , IL10 e IFN- γ por linfócitos totais, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).80

Tabela 10: Análise de frequência (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69, em linfócitos CD4+ e CD8+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).....82

Tabela 11: Análise de frequência (%) de TNF- α , IL10 e IFN- γ em linfócitos CD4+ e CD8+ na presença (LPS-*P.gingivalis* e LPS- *E.coli*) e

ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).....87

Tabela 12: Análise da razão entre as frequências (%) de células CD8+CD28-/CD8+CTLA4+, CD4+CD28-/CD4+CTLA4+, CD4+TNF- α +/CD4+IL10+, CD4+IFN- γ +/CD4+IL10+ na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da cascata de sinalização intracelular desencadeada pela via NFkB, com participação de p50.	29
Figura 2: Desenho esquemático da cascata de sinalização intracelular desencadeada pela via STAT, com participação de STAT1 e STAT4.	32
Figura 3: Esquema ilustrativo da técnica de PCR em tempo real.....	49
Figura 4: Perfil de distribuição de CMSP no gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade e no controle de isotipo.....	55
Figura 5: Estratégia de análise utilizada na citometria de fluxo.	56
Figura 6: Estratégia de análise: para cada condição de cultura (contendo ou não estímulos de LPS bacterianos), foram comparadas a frequência e IMF das moléculas de superfície e intracelulares entre as formas clínicas C, PA e PC.....	64
Figura 7: Estratégia de análise: para cada forma clínica (C, PC e PA) foram comparadas a frequência e IMF das moléculas de superfície e intracelulares frente a diferentes condições de cultura, contendo ou não estímulos de LPS bacterianos.	64
Figura 8: Estudo <i>in vitro</i> da IMF de CD86 em células CD14+.....	67

Figura 9: Estudo <i>in vitro</i> da % e IMF de CD80 e CD86 por células CD14+.....	69
Figura 10: Frequência de células TNF- α +CD14+ nos grupos PA e C na ausência de estímulos (Meio). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).	71
Figura 11: Frequência de células TNF α +CD14+ e IL10+CD14+.....	72
Figura 12: Estudo da correlação entre a expressão de citocinas TNF- α e IL10 expressas por células CD14+ ($p<0.05$) no grupo C (A) na presença de todas as condições de cultura e PA (B) apenas na presença de LPS- <i>E.coli</i>	73
Figura 13: Estudo <i>in vitro</i> da % de CD28- e CD69 em células CD8+.	77
Figura 14: Estudo <i>in vitro</i> da % de células CD4+ e CD8+ co-expressando CD69 e CTLA4.	79
Figura 15: Estudo <i>in vitro</i> da % de células CD4+ co-expressando IL10.	81
Figura 16: Estudo <i>in vitro</i> da % de CD69 e CTLA4 em células CD4+ e CD8+.....	84
Figura 17: Estudo <i>in vitro</i> da % e IMF de CD69, CD28 e CTLA4 em células CD4+ e CD8+.....	86
Figura 18: Estudo <i>in vitro</i> da % de TNF- α , IFN- γ e IL10 em células CD4+ e CD8+.....	88

Figura 19: Estudo da correlação entre as células CD4+ expressando as citocinas IL10, TNF- α e IFN- γ nos grupos C, PC e PA, na presença de diferentes condições de cultura.90

Figura 20: Sumário de resultados do estudo fenotípico.111

SUMÁRIO

1.0 - REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.0 – OBJETIVOS	41
2.1 - Objetivo Geral.....	41
2.2 - Objetivos Específicos	41
3.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 - Parte Clínica: estratégia amostral	43
3.2 - Estudo Genotípico.....	46
3.2.1 - Extração do DNA	47
3.2.2 - Técnica de genotipagem por PCR em Tempo-Real	48
3.3 - Estudo Fenotípico	50
3.3.1 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	51
3.3.2 - Cultura das CMSP com LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i>	51

3.3.3 - Imunofluorescência para avaliação da expressão de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas por diferentes subtipos celulares	52
3.3.4 - Aquisição no citômetro de fluxo	53
3.3.5 - Estratégias de análise pelo programa FlowJo	54
3.4 - Análise Estatística	57
4.0 - RESULTADOS.....	59
4.1 - Parte I - Estudo Genotípico	59
4.1.1 - Polimorfismos dos genes <i>IL17A</i> (rs2275913), <i>IL17F</i> (rs763780) e <i>IL23R</i> (rs11209026)	59
4.1.2 - Polimorfismos dos genes <i>NFkB1</i> (rs721412), <i>STAT1</i> (rs3771300) e <i>STAT4</i> (rs7574865)	60
4.1.3 - Análise multivariada	60
4.2 - Parte II - Estudo Fenotípico.....	63
4.2.1 - Caracterização fenotípica dos monócitos de indivíduos dos grupos C, PC e PA.....	65
4.2.1.1 - Avaliação de monócitos <i>CD14+</i> co-expressando as moléculas de superfície <i>CD80</i> , <i>CD86</i> e <i>HLA-DR</i>	65

4.2.1.2. <i>Avaliação de monócitos CD14+ co-expressando as citocinas TNF-α e IL10</i>	70
4.2.2 - <i>Caracterização fenotípica de linfócitos T CD4+ e CD8+ de indivíduos dos grupos C, PC, PA</i>	74
4.2.2.1 - <i>Análise de linfócitos totais</i>	74
4.2.2.1.1. <i>Avaliação de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69</i>	74
4.2.2.1.2 - <i>Avaliação de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as citocinas TNF-α, IL10 e IFN-γ</i>	80
4.2.2.2 - <i>Análise em sub-população de linfócitos CD4+ e CD8+</i>	81
4.2.2.2.1 - <i>Avaliação da expressão das moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69 nas sub-populações de linfócitos CD4+ e CD8+</i>	82
4.2.2.2.2 - <i>Avaliação da expressão das citocinas TNF-α, IL10 e IFN-γ considerando cada sub-população de linfócitos CD4+ e CD8+</i>	86
5.0 – DISCUSSÃO	91
6.0 – CONCLUSÕES	109
7.0- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	112
APÊNDICE.....	164

Apêndice A – Artigos Publicados.....164

Apêndice B – Artigos Submetidos165

1.0 - REVISÃO DE LITERATURA

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial complexa da cavidade bucal causada por bactérias, principalmente Gram-negativas. Clinicamente, a doença se caracteriza por inflamação das estruturas de suporte e proteção do órgão dental (periodonto) e por uma irreversível destruição óssea com eventual perda do dente (ARMITAGE, 1999; CLEREHUGH, 2008; LAINE, LOSS & CRIELAARD, 2004; MEISEL et al., 2004).

É uma doença relativamente comum, cuja ocorrência tem aumentado em todo mundo (LIMA et al., 2010). Estima-se que 30% dos adultos europeus estejam afetados, e destes, 5 a 15% manifestam a forma mais grave da doença (MEISEL et al., 2004). Estudo epidemiológico feito no sul do Brasil (Porto Alegre), mostra que 94% de uma população de 217 indivíduos com mais de 60 anos, apresenta sequelas da doença periodontal (perda de inserção maior que 5mm) com envolvimento de 60% dos seus dentes (GAIO et al., 2012). Este trabalho mostra também que a forma grave e destrutiva da periodontite está disseminada em sua população de estudo, sendo substancialmente maior do que o estimado na população Norte Americana (GAIO et al., 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde, a prevalência da doença periodontal no Brasil é de cerca de 10%. O aumento da prevalência da periodontite e o importante impacto de suas sequelas torna esta doença de interesse na saúde pública mundial.

Estudos avaliando a composição da placa dental identificaram inúmeras bactérias com potencial periodontopatogênico. Mais de 500 espécies já foram descritas, dentre elas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.

actinomycetencomitans) (membro do complexo verde) e os membros do complexo vermelho *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (ALBANDAR, 2002; O'BRIEN-SIMPSON et al., 2004; KADOWAHI et al., 2007; STEIN et al., 2008; CLEREHUGH, 2008). Correlação positiva entre a presença dos membros do complexo vermelho, parâmetros clínicos da periodontite e aumento da expressão de IL1 β e IL8 no fluido crevicular já foram descritos na literatura (TELLES et al., 2011). No entanto, sabe-se que apenas a presença de agentes periodontopatogênicos não é suficiente para o estabelecimento e curso da doença periodontal.

Embora a infecção bacteriana seja um pré-requisito para o início da doença periodontal, seu desenvolvimento, curso e gravidade dependem de inúmeros fatores de risco. Fatores de risco são definidos como características que aumentam a probabilidade de desenvolver uma doença (ALBANDAR, 2002). Na doença periodontal já foram descritos alguns fatores de risco como: hábitos de higiene bucal, etnias, região geográfica, idade, gênero, condições socioeconômicas, condições sistêmicas, consumo de tabaco, perfil genético e resposta imunológica do hospedeiro frente ao agente agressor (ARMITAGE, 1999; ALBANDAR, 2002; SOUZA et al., 2011; MEISEL et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007; CLEREHUGH, 2008; MOREIRA et al., 2009; GAIO, et al., 2012). Fatores intrínsecos ao hospedeiro como genéticos, epigenéticos e perfil de resposta imune têm recebido destaque na literatura como possíveis marcadores de suscetibilidade para a doença periodontal (MARK et al., 2000; GORSKA et al., 2003; DIXON, BAINBRIDGE & DARVEAU, 2004; BERGLUNDH & DONATI, 2005; LOSS, JOHN & LAINE, 2005; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007;

TERVONEN et al., 2007; GOMEZ, DUTRA & MOREIRA, 2009; LAINE et al., 2010; FOLWACZNY et al., 2010; COCHRAN, 2008; LIMA et al., 2010; MARCONCINI et al., 2010; CARDOSO et al., 2010; VIANA et al., 2011).

A doença periodontal é classificada em gengivite e periodontite de acordo com o envolvimento tecidual (ARMITAGE, 1999; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007). A gengivite é uma inflamação restrita ao tecido mole de proteção do periodonto (gengiva) em resposta aos estímulos bacterianos presentes na região do sulco gengival (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Em parte da população, a constante presença de estímulos periodontopatogênicos nesta região desencadeia uma resposta inflamatória capaz de destruir não só o tecido de proteção, mas também o de sustentação, envolvendo tecido conjuntivo e tecido ósseo alveolar. Nestes casos, os indivíduos desenvolvem as periodontites (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

Classicamente, as periodontites são separadas em dois grupos: periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (PA) (ARMITAGE, 1999; CLEREHUGH, 2008). A Periodontite Crônica (**PC**) geralmente é diagnosticada em indivíduos adultos, sendo a forma mais comum da periodontite. Seu perfil de progressão é de lento a moderado, podendo apresentar surtos de progressão mais rápidos. Clinicamente caracteriza-se pela relação direta entre quantidade de biofilme bacteriano e cálculo dentário com o grau de destruição periodontal. Radiograficamente, áreas com reabsorções ósseas localizadas e generalizadas podem ser observadas. A Periodontite Agressiva (**PA**) é geralmente diagnosticada em indivíduos jovens e jovens-adultos, sendo caracterizada por progressão rápida e elevada taxa de destruição óssea. Não é

possível notar clinicamente relação entre quantidade de material bacteriano com o grau de destruição periodontal. Radiograficamente é possível notar envolvimento precoce da área de incisivos e molares (sendo chamada de forma localizada), bem como envolvimento de toda arcada dentária (forma generalizada) (ARMITAGE, 1999; CLEREHUGH, 2008).

A progressão e a gravidade da doença periodontal são determinadas pelo balanço entre o perfil da resposta imune pró- e antiinflamatória do hospedeiro frente aos estímulos periodontopatogênicos (CHOI et al., 2000; BERGLUNGH & DONATI, 2005; GEMMELL YAMAZAKI & SEYMOUR, 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009; LIMA et al., 2010). O processo imunoinflamatório envolvido na doença periodontal inicia-se com a estimulação de enzimas e metabólitos bacterianos sobre o epitélio juncional provocando aumento da sua permeabilidade, permitindo assim a passagem destes e outros produtos bacterianos para dentro do tecido conjuntivo. Neste momento, inicia-se o primeiro mecanismo de resposta imune do hospedeiro na doença periodontal pela ativação da resposta inata. Há formação de edema, aumento do fluxo do fluido gengival, liberação de TNF- α por mastócitos, migração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), e consequente destruição do tecido conjuntivo (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). A permanência das bactérias sobre a superfície dental, na região do sulco gengival, provoca um acúmulo de PMNs na região de epitélio juncional e aumento de linfócitos e macrófagos na região perivascular e no tecido conjuntivo local (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

As células apresentadoras de antígeno (APCs) reconhecem os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), através dos receptores de

membrana CD14 e *Toll-like receptors* (TLRs). O **CD14** é uma glicoproteína encontrada na forma solúvel bem como ancorada à membrana celular, constitutivamente expresso por monócitos e macrófagos. É reconhecido funcionalmente por ser um importante membro do sistema de receptores de lipopolissacarídeos (**LPS**), também capaz de induzir ativação dos TLRs (ITOH et al., 2003).

Os LPS são estruturas glicolípídicas complexas da membrana plasmática bacteriana, formadas por porções hidrofílicas (polissacárides) e hidrofóbicas (chamada de domínio lipídico A). LPS de distintas bactérias como *E.coli* e *P.gingivalis* são capazes de ativar diferentes TLRs devido à estrutura de sua porção lipídica A, determinando suas especificidades (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007).

Devido à alta heterogeneidade da porção lipídica A do LPS- *P.gingivalis*, este é capaz de induzir ativação não só de TLR2, mas também de TLR4 (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007). A via TLR4 ativada por LPS tem sido responsável por induzir a sobrevivência de osteoclastos *in vitro*, sugerindo papel importante na doença periodontal (ITOH et al., 2010). LPS- *P.gingivalis* e IFN- γ aumentam a expressão de TLR2, TLR4, CD14 e MD2 (co-receptor de TLR4), sugerindo que estas moléculas apresentem papel crítico na amplificação da resposta inflamatória no tecido conectivo periodontal em resposta aos antígenos periodontopatogênicos (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007; TRINDADE et al., 2011).

Após o reconhecimento de antígenos por células APCs, há internalização do estímulo, processamento e apresentação de peptídeos na superfície celular por moléculas de MHC. Sabe-se que os TLRs ativados são

capazes de induzir a expressão das moléculas MHC, como **HLA-DR**, em células de Langerhans no tecido gengival, exercendo assim importante papel na mediação da resposta imune inata e adaptativa (DIXON, BAINBRIDGE & DARVEAU, 2004; TAKEDAK, KAISHO & AKIRA, 2003; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). O HLA-DR (MHC de classe II), é um heterodímero reconhecido como marcador de ativação de células APCs como macrófagos (CD14+), células B (CD19+) e dendríticas (CD14- CD19- CD3-) (LUKIC et al., 2006), bem como células epiteliais do tecido gengival (MATSUYAMA et al., 2005).

As células APCs ativadas apresentam os antígenos bacterianos aos linfócitos nos linfonodos regionais, mediando a ativação da resposta imune adaptativa. Durante a ativação linfóide, na superfície de células T é induzida a expressão de **CD69**, uma glicoproteína envolvida na proliferação e indução de sinal para receptores de membrana (HU et al., 2009). Receptores de membrana na superfície de linfócitos T (TCRs) reconhecem este complexo MHC-antígeno, gerando o primeiro sinal de ativação celular; responsável por garantir especificidade da resposta imune subsequente. O segundo sinal de ativação, ainda nos órgãos linfoides, leva a diferenciação, expansão clonal, ativação de cascatas de sinalização intracelulares responsáveis pela transcrição gênica e produção de citocinas e outras moléculas efetoras da resposta imune adaptativa (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Dentre as células T de memória, existem as de “memória efetoras” que migram para a mucosa, aguardando a reinfecção para se ativarem e combaterem rapidamente o microorganismo. (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

Este segundo sinal é mediado por moléculas chamadas co-estimuladoras da família B7 (B7.1 – **CD80**, B7.2 – **CD86**) expressas na superfície de APCs e moléculas **CD28** e **CTLA4** na superfície de linfócitos. CD28 é uma molécula constitutiva de linfócitos humanos, cujo sinal de ativação induz a expressão de moléculas antiapoptóticas, produção de fatores de crescimento e expansão clonal (HARDING et al., 1992; STEIN et al., 2008). Sucessiva estimulação antigênica desencadeia nessas células TCD28+ vários ciclos de replicação celular, fazendo com que percam, irreversivelmente, a expressão de CD28. Além disso, após o segundo sinal de ativação, PI3K se liga à porção YMNM citoplasmática de CD28, mediando interação de inúmeras proteínas a esta porção do CD28, resultando na formação de vesícula de membrana coberta de clatrina, levando à endocitose de CD28 (RIHA & RUDD, 2010). A partir deste momento estas células T de memória efetoras se tornam CD28 negativas (T CD4+CD28- e CD8+CD28-) (STRIOGA, PASUKONIENE & CHARACIEJUS, 2011).

CTLA4 é uma proteína induzida em células recentemente ativadas. Em células T não ativas, CTLA4 está presente em vesículas intracelulares. Na presença de ativação, CTLA4 é transportado para a superfície da membrana celular, onde é estimulada e rapidamente internalizada (BHATIA et al., 2006). Sua função envolve aumento da regulação de IFN- γ , que media a expressão de enzimas relacionadas ao catabolismo de triptofano, suprimindo a proliferação de células T. Além disso, seu papel supressor inclui competir com CD28 na ligação com moléculas B7 (STEIN et al., 2008). O papel supressor dessa molécula sugere uma importante participação no processo de cronificação das doenças inflamatórias (WALUNAS et al., 1994; SOUZA et al., 2007).

Os sinais de ativação celular são capazes de desencadear cascatas de sinalização intracelulares responsáveis pela transcrição de genes e tradução em moléculas efetoras. Inúmeras cascatas de sinalização estão envolvidas com a resposta imune inata e adaptativa, como as vias STAT e NFkB.

NFkB é um complexo fator de transcrição ativado em resposta ao sinal de receptores de membrana como os TCRs, desencadeando a síntese de várias moléculas, como as citocinas. É uma família composta por 5 membros que formam diferentes complexos homo- e hetero-dímeros: NFkB1 (p105 ou p50 - forma madura), NFkB2 (p100 ou p52 - forma madura), RelA (p65), RelB e c-Rel (ZHU & FU, 2010). Nas células T em repouso, os dímeros funcionais de NFkB estão inativos no citoplasma, associados a um inibidor chamado IkB, que impede a entrada de NFkB no núcleo da célula. Com o sinal do receptor de membrana (TCR, por exemplo), enzimas chamadas IkB quinases (IKK) fosforilam a serina de IkB. Esta fosforilação é seguida por inserção de inúmeras proteínas chamadas ubiquitinas. A ubiquitinação de IkB induz sua ativação e proteólise no proteossomo citosólico. Assim, NFkB é liberado e sofre translocação para o núcleo, onde contribui para a ativação transcricional de vários genes de citocinas, receptores e demais moléculas efetoras da resposta imune (Figura 1) (RIHA & RUDD, 2010; GHOSH & HAYDEN, 2008).

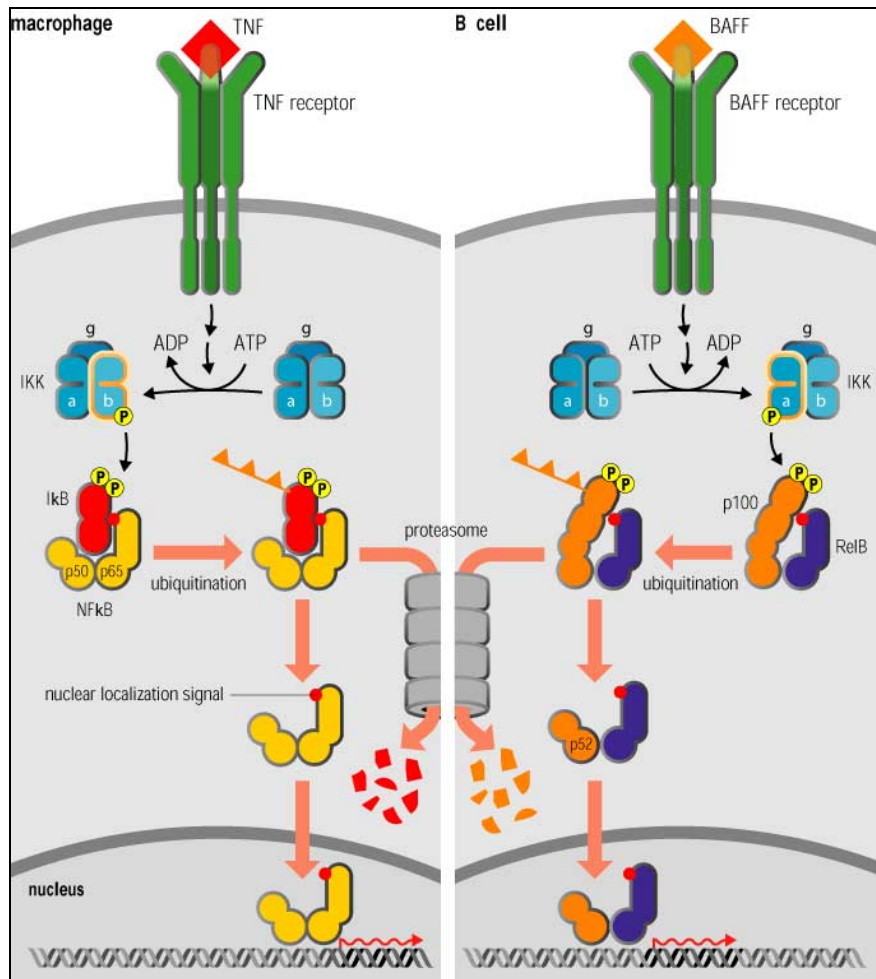


Figura 1: Desenho esquemático da cascata de sinalização intracelular desencadeada pela via NFκB, com participação de p50.

Fonte: http://www.google.com.br/imgres?hl=pt-BR&sa=X&tbo=d&rlz=1C1ARAAenBR430BR430&biw=1366&bih=667&tbn=isch&tbnid=OlexmcdRDARDSM:&imgrefurl=http://www.stat.rice.edu/~siefert/Research/NfKB.html&docid=yE_7 Acesso: 11 de agosto de 2012.

O CD28, em algumas linhagens de células T, é capaz de ativar a via NFκB, induzindo sua ligação ao promotor do gene de IL2. Esta via promove a sobrevivência, produção de citocinas e proliferação de células T, mecanismo este, não ativado pelo sinal de TCRs (RIHA & RUDD, 2010).

Vários estímulos são capazes de ativar esta via NFκB não só pelos TLRs, mas por TCRs, BCL (receptor de células B), receptores de IL12 e TNF-α (ZHU & FU, 2010; GHOSH & HAYDEN, 2008). NFκB está envolvido na ativação de células epiteliais, músculo liso, mastócitos, células dendríticas,

neutrófilos e linfócitos, atuando assim na resposta imune inata e adaptativa (CSISZAR et al., 2008; GHOSH & HAYDEN, 2008). Adicionalmente, há participação na regulação de TNF- α , produção de quimiocinas e moléculas de adesão nas células endoteliais, que favorecem o recrutamento e ativação de células efectoras (CARYOL et al., 2006; GHOSH & HAYDEN, 2008). Estudos mostram que o LPS de *P.gingivalis* induz a via NFkB a produzir moléculas antimicrobianas além de inibir genes envolvidos com apoptose celular (CARYOL et al., 2006). Este perfil antiapoptótico aumenta a sobrevivência de macrófagos no tecido, prolongando o processo inflamatório estabelecido na periodontite crônica (CARYOL et al., 2006).

NFkB1 é um membro importante na formação de dímeros envolvidos na via clássica de NFkB - RelA:p50 e c-RelA:p50 (ZHU & FU, 2010). Em estudo com murinos, sugere-se que NFkB1 e STAT1 estejam envolvidos na produção de óxido nítrico (NO) e IL6 por macrófagos (RAW267) estimulados por LPS de *Prevotella intermedia* (CHOI et al., 2011). Em cultura de linhagem de monócitos humanos, também se mostrou envolvimento das vias NFkB e STAT1 com a produção de IL6, IL8, TNF- α e ICAM-1, sob estímulo de um antígeno de membrana de *Treponema lecithinolytium* (bactéria envolvida na periodontite agressiva) (LEE et al., 2009).

Embora NFkB1 desempenhe um papel importante durante a inflamação e o processo de reabsorção óssea na periodontite crônica, Marconcini e colaboradores (2010) não encontraram associação entre os níveis de expressão gênica de NFkB1 com a doença periodontal na população italiana. Por outro lado, estudo com células de epitélio gengival de indivíduos japoneses mostrou que IL17A é capaz de ativar a via NFkB, pelo dímero NFkB1/NFkB2,

para produzir CXCL8, tendo importante papel para o recrutamento celular na periodontite (TAKAHASHI et al., 2011). Além disso, estímulos derivados da parede de bactérias periodontopatogênicas são capazes de ativar TLR2, levando a ativação da via NFkB, e indução da produção de RANKL e outros mediadores (SCHULZ et al., 2010).

STATs são fatores de transcrição chamados transdutores de sinal e ativadores de transcrição. Já é bem descrito na literatura o importante papel da via JAK/STAT na sinalização celular desencadeada por citocinas e seus receptores. As STATs fazem parte de uma família composta de 7 membros: STAT1 a STAT6, incluindo STAT5A e STAT5B (CHEN & HERSHEY, 2007).

A sinalização via STAT inicia com a ativação de uma enzima chamada JAK (Janus-quinase). As JAKs inativas estão frouxamente ligadas ao domínio citoplasmático dos receptores de citocinas tipo I e II. Assim que subunidades de receptores de membrana se juntam para se ligarem a citocina, as JAKs ligadas a eles se ativam através de transfosforilação. Neste momento as JAKs fosforilam resíduos de tirosina nas porções citoplasmáticas dos receptores. Estas porções dos receptores são reconhecidas por domínios Src de homologia-2 (SH-2) das proteínas de STAT monoméricas citosólicas, que se ligam ao receptor. As STATs são então fosforiladas pelas JAK-quinases associadas ao receptor. O domínio SH-2 de uma STAT se liga ao resíduo fosfotirosina de uma outra STAT, permitindo com que elas se liguem e dissociem do receptor. Os dímeros de STAT migram para o núcleo, se ligam a regiões específicas do DNA e ativam a transcrição gênica (Figura 2) (CHEN & HERSHEY, 2007).

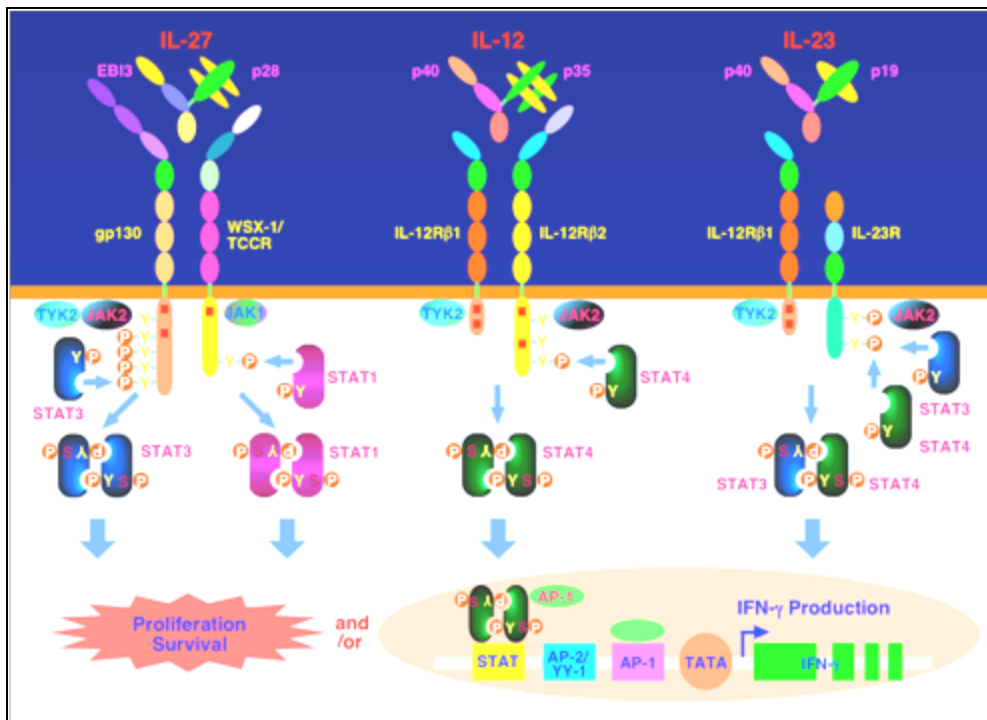


Figura 2: Desenho esquemático da cascata de sinalização intracelular desencadeada pela via STAT, com participação de STAT1 e STAT4.
 Fonte: YOSHIMOTO et al., 2005.

STAT1 está envolvida na ativação da resposta pró-inflamatória (CHEN & HERSHEY, 2007; QUARCOO et al., 2004; KALLIOLIAS & IVASHKIV, 2008; SOUZA et al., 2011), morte celular (KIM & LEE, 2007; STEPHANOU, 2004) e antiproliferação celular (CHE & HERSHEY, 2007; KIM & LEE, 2007). STAT1 desempenha papel importante na mediação do efeito supressor de IL27, na diferenciação de Th17 e Th2 (KALLIOLIA & IVASHKIV, 2008).

Na apoptose, STAT1 tem papel no aumento da expressão de caspase-1 e -3 (KIM & LEE, 2006), indução da liberação de citocromo-c na mitocôndria, ativação dos genes de Fas e FasL, e inibição do promotor do gene antiapoptótico Bcl-2 e Bcl-x (STEPHANOU, 2004; CHEN & HERSHEY, 2007; KIM & LEE, 2007). Estudos em lesão de miocárdio sugerem que a modulação do sinal de STAT pode ser uma importante terapia contra danos teciduais (KIM & LEE, 2007).

O **STAT4** por sua vez desempenha papel na diferenciação de Th1, produção de IFN- γ e IL12 (MARTHUR et al., 2007; WATFORD et al., 2004; DURALI et al., 2003). Embora esta via seja requerida para o desenvolvimento de células T produtoras de IL17, ela não participa na expressão de outros genes associados a Th17 (MARTHUR et al., 2007). Várias citocinas (IL23, IL2, IL15, IL21 e os tipos I e II de IFNs) são capazes de ativar a via STAT4, sendo IL12 a principal ativadora (WATFORD et al., 2004). Sua expressão pode ser encontrada em linfócitos T, B, mastócitos, NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas (MARTHUR et al., 2007; WATFORD et al., 2004; DURALI et al., 2003).

Estudos mostram que a via STAT4 pode desempenhar papel inflamatório ou antiinflamatório dependendo do estímulo que a ative (WATFORD et al., 2004). Vários fatores de transcrição como AP-1 e NF κ B tem sido relacionados com uma interação na região promotora do gene de STAT4, aumentando sua expressão (SIGURDSSON et al., 2008). Em células dendríticas, TNF- α e IL1 são potenciais estimuladores da expressão de STAT4 via ativação de NF κ B (SIGURDSSON et al., 2008). LPS e IL1 β induzem a degradação de I κ B na célula alvo, ativando a via NF κ B, que irá regular genes envolvidos com a resposta imune inflamatória (ITOH et al., 2010).

STAT3 tem sido considerada um regulador negativo da ativação de genes inflamatórios por STAT1, atuando como mediador antiinflamatório, antiapoptótico e proliferativo (CHEN & HERSHEY, 2007; KALLIOLIAS & IVASHKIV, 2008; KIM & LEE, 2007). Embora STAT3 não tenha implicação na diferenciação de células Th, esta molécula é requerida para expressão de IL17A, IL17F e ROR γ t por células Th17 (MARTHUR et al., 2007).

O infiltrado inflamatório presente na periodontite é caracterizado por uma grande quantidade de linfócitos, mostrando o importante papel destas células na resposta local. Acredita-se que um desequilíbrio no perfil de citocinas produzidas por células Th1 e Th2 possa estar relacionado com as diferentes formas da doença periodontal (GRAVES et al., 2001; GEMMELL, YAMAZAKI & SEYMOUR, 2007; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

No fluido gengival de portadores de periodontite há maiores níveis de PGE2, IL1- β , TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL4, indicando uma resposta Th1. Além disso, monócitos de indivíduos com periodontite estimulados com LPS- *P.gingivalis* são capazes de aumentar a expressão de TNF- α e IL1- β quando comparados aos indivíduos sem a doença (HOURI-HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007). Uma resposta imune inata com alta produção de IL12 tem sido associada à resposta Th1 na doença periodontal, enquanto uma fraca participação inata sugere favorecer a resposta Th2 (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Não obstante, citocinas envolvidas na resposta Th2, como IL10 e IL4, têm sido encontradas em cultura de células do sangue periférico, assim como no tecido inflamado de pacientes com periodontite (HOURI-HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007). Acredita-se que uma resposta com perfil Th2 apresente papel protetor para a periodontite, limitando a infecção e a destruição tecidual.

A ativação dos TLRs influencia no perfil de resposta inata e adaptativa na doença periodontal (MAHANONDA & PICHYANGKUL, 2007). Estudo *in vitro* mostra que LPS- *E.coli* é capaz de ativar TLR4 induzindo uma resposta Th1, através do aumento de expressão de IL12p70 e produção de IFN-

γ (MAHANONDA R & PICHYANGKUL S, 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). LPS- *P.gingivalis* por sua vez ativa TLR2 induzindo a produção de inibidores de IL12, indicando resposta Th2 (MAHANONDA R & PICHYANGKUL S, 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

As células Th17 também têm recebido destaque na doença periodontal pela produção de **IL17A**, **IL17F**, IL21 e IL22 (STARNES et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2005; BETTELLI, OUKKA & KUCHROO, 2007; GAFFEN & HAJISHENGALLIS, 2008; KONERMANN et al., 2012; MOUTSOPOULOS et al., 2012). IL17A ou CTLA8 tem sido caracterizada por se envolver na proliferação, maturação e quimiotaxia de neutrófilos (BEKLEN et al., 2007; VERNAL et al., 2005); indução da produção de IL6, TNF- α e IL1 β por macrófagos, osteoclastos e fibroblastos gengivais (VERNAL et al., 2005; JOHNSON, WOOD & SERIO, 2004); regulação da expressão de metaloproteinases e quimiocinas (MCP1, MIP1 e KC) em osteoclastos e fibroblastos gengivais (VERNAL et al., 2005; BEHFARNIA et al., 2010).

A expressão de RNAm de IL17A é aumentada na periodontite quando comparada a gengivite (OHYAMA et al., 2009, HONDA et al., 2008) e a concentração de IL17A e IL23 estão positivamente correlacionadas ao parâmetro clínico de perda de inserção (LESTER et al., 2007). Embora haja divergência sobre o papel modulador ou inflamatório de IL17, sua expressão é frequente na fase destrutiva da periodontite (LESTER et al., 2007), sugerindo que esta molécula tenha um papel importante na gravidade da doença periodontal (LESTER et al., 2007; BEKLEN et al., 2007).

Assim como IL17A, IL17F é produzida por células T ativadas. Ela regula a angiogênese e a produção de IL2, TNF- β e TGF- β por células epiteliais, além

de CXCL1, ICAM1, IL6, IL8 e G-CSF por células epiteliais *in vitro* (CUA & TATO, 2010). Evidências sugerem que IL17A e IL17F estejam relacionadas com várias doenças inflamatórias crônicas (CUA & TATO, 2010; WU et al., 2009; KAWAGUCHI et al., 2001; MACALLISTER et al., 2005).

Um dos principais reguladores da família das IL17 é a citocina IL23 (KOLLS & LINDEN, 2004; BETTELLI, OUKKA & KUCHROO, 2007). Ela é produzida por células apresentadoras de antígeno como as células dendríticas, macrófagos, monócitos, células T e B, além do endotélio (WATFORD et al., 2004). Esta citocina estimula a produção de IL1 β e TNF- α ; regulação de MMP-9; ativação, sobrevivência e expansão de Th17; produção de membros da família das IL17 e proliferação de células T de memória (WATFORD et al., 2004, HONDA et al., 2008).

O eixo IL23/IL17 tem sido chave no desenvolvimento da inflamação crônica durante a resposta do hospedeiro à infecção bacteriana (WATFORD et al., 2004; HONDA et al., 2008; KOLLS & LINDEN, 2004). A concentração de IL23 apresenta uma correlação positiva com a concentração de IL17, IL1 β , IL6, TNF- α , e negativa com IL12, em tecido gengival de indivíduos com a perda de inserção considerada grave (LESTER et al., 2007). Um relativo aumento na expressão do gene de IL23 na periodontite tem sido descrito quando comparado ao indivíduo sem a doença (OHYAMA et al., 2009).

O receptor de IL23 é composto pelas subunidades **IL23R** e IL12R β 1; sendo o IL23R constitutivamente expresso pelas células Th17 (KOLLS & LINDEN, 2004; BETTELLI, OUKKA & KUCHROO, 2007; OHYAMA et al., 2009; DI MEGLIO et al., 2011). Sabe-se que a habilidade de uma célula de responder a citocinas (exemplo: IL23 e IL12) é determinada pelos níveis de expressão do

seu receptor (exemplo: IL23R e IL12R β 1, respectivamente) (OHYAMA et al., 2009).

A expressão dos diversos mediadores inflamatórios pode ser influenciada por fatores de risco genéticos. Estes são avaliados segundo o tipo funcional e sua influência sobre diferentes grupos étnicos (LOSS, JOHN & LAINE, 2005; MOREIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; GONZALES et al., 2007; LAINE, LOSS & CRIELAARD, 2010). Variações no *locus* de um gene, onde pode se encontrar múltiplos alelos, dá-se o nome de polimorfismo. Define-se polimorfismo quando no mínimo dois alelos aparecem em uma frequência superior a 1% na população (MILLER MOHRENWEISER & BELL, 2001; TABOR, RISCH & MYERS, 2002; LOSS, JOHN & LAINE, 2005; LAINE, LOSS & CRIELAARD, 2010).

O SNP- "*single nucleotide polymorphism*", é um tipo de polimorfismo caracterizado pela troca de um único nucleotídeo em um determinado *locus*. Se esta alteração ocorrer em uma região codificadora do gene, pode haver substituição de um aminoácido, resultando em alteração da estrutura da proteína e sua função. Na região promotora, os polimorfismos podem alterar a taxa de transcrição (MILLER, MOHRENWEISER & BELL, 2001). Quando presentes nas regiões não codificadoras (introns) os polimorfismos aparentemente não geram efeitos. No entanto, se presentes nas regiões de emenda ou splicing dos introns, podem produzir proteínas incompletas ou inativas, como resultado de um incorreto *splicing* do RNA mensageiro (MILLER, MOHRENWEISER & BELL, 2001). Acredita-se que os SNPs aconteçam com frequência maior do que outros tipos de polimorfismos (LOSS, JOHN e LAINE,

2005). Estes são usados como marcadores genéticos para identificar diferentes formas, expressões e funções de um gene.

O polimorfismo no gene de ***IL17A rs2275913***, localizado na posição -197 no cromossomo 6p12 se caracteriza pela troca das bases A>G. A literatura destaca que o alelo A de ***IL17A rs2275913*** tem sido associado ao aumento no risco de desenvolvimento e progressão de doenças inflamatórias (ARISAWA et al., 2008). A troca das bases T>C no gene de ***IL17F rs763780***, também localizado no cromossomo 6p12, gera uma troca de Histidina por Arginina na posição 161 na proteína de IL17F (Hist161Arg). Esta alteração na forma de IL17F proporciona um papel protetor desta molécula em várias doenças autoimunes (ARISAWA et al., 2008; KAWAGUCHI et al., 2006; CHEN et al., 2009). Embora pouco se saiba sobre este polimorfismo em doenças humanas, estudos sugerem que a atividade e/ou expressão de IL17F possa ser suprimida na presença do alelo C do polimorfismo rs763780 (KAWAGUCHI et al., 2006).

O polimorfismo no gene ***IL23R rs11209026*** ocorre no exon 9 do cromossomo 1q31 (SILVERBERG et al., 2009) e se refere a uma troca de G>A. Essa troca de bases gera uma troca dos aminoácidos Arginina por Glutamina (p.Arg381Gln; c.1142 G>A) na proteína IL23R, desempenhando assim um papel funcional importante (LIN et al., 2010). Este polimorfismo tem sido associado a várias doenças autoimunes e inflamatórias, inclusive por reduzir a produção de IL17A (SILVERBERG et al., 2009; LIN et al., 2010; BIN et al., 2009; DI MEGLIO et al., 2011). Trabalhos sugerem um possível papel protetor do alelo polimórfico “A” em doenças crônicas inflamatórias na população Norte Americana de descendência alemã e na população Chinesa (LIN et al., 2010; BIN et al., 2009).

A investigação de polimorfismos em genes codificadores dos fatores de transcrição também tem sido alvo de interesse. O polimorfismo do tipo SNP **rs3771300** (T>G) do gene de **STAT1** se encontra dentro de uma região altamente conservada (intron-24) no cromossomo 2q32, distante a 3 pares de bases da região GATA. Acredita-se que sua localização indique um suposto papel na regulação desta via. Na região GATA se liga GATA-3, o maior regulador do fator de transcrição para diferenciação e perpetuação de células Th2 em humanos (PINTO et al., 2007). Estudo realizado com indivíduos asmáticos de Munique sugere que o alelo T do rs3771300 de *STAT1* exerça papel protetor para atopia (hipersensibilidade de reação alérgica aguda), pois diminui os níveis de IgE no soro destes pacientes (PINTO et al., 2007).

O gene *STAT4* está localizado na posição 2q32.2-q32.3, adjacente ao gene *STAT1*, distanciados em aproximadamente 180 kb. Investigação dos diferentes SNPs de **STAT4** revelou forte associação do alelo T referente ao **rs7574865** com a presença de Lúpus Eritematoso, inclusive com sua forma mais grave (KAWASAKI et al., 2008; KORMAN et al., 2008). Esta é uma doença auto-imune em que se destaca alta produção de citocinas Th1, como IFN- γ , sugerindo um possível papel do SNP rs7574865 de *STAT4* na produção desta citocina (KAWASAKI et al., 2008). O SNP rs7574865 de *STAT4* se localiza no intron 3 e se refere a uma troca de T>G (SIGURDSSON et al., 2008). Sugere-se que o alelo ancestral T esteja associado à alta expressão de *STAT4* em osteoblastos de pacientes suecos com Lúpus Eritematoso Sistêmico (SIGURDSSON et al., 2008).

O polimorfismo de **NFkB1 rs721412** está localizado no cromossomo 4, onde há troca de G>A (LIU-MARES et al., 2007). Embora pouco se saiba sobre

este polimorfismo de NFkB1, associações entre rs721412 com as moléculas de FAS e IRF1 (responsáveis por induzir apoptose e supressão de tumor) foram observadas em descendentes europeus (LIU-MARES et al., 2007).

Vários trabalhos mostram que fatores de risco genéticos influenciam no desenvolvimento da doença periodontal, sendo esta classificada como uma doença poligênica (MEISEL et al., 2003; SCAREL-CAMINAGA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; DUTRA et al., 2009; LAINE, LOSS & CRIELAARD, 2010). Estima-se que na periodontite exista mais de 20 genes modificadores de doença (LOSS, JOHN & LAINE, 2005), embora nada se saiba a respeito dos polimorfismos acima citados na doença periodontal. Desta forma, a proposta do presente trabalho foi avaliar a presença de SNPs nos genes das citocinas IL17A e IL17F, do receptor de membrana IL23R e dos fatores de transcrição STAT1, STAT4 e NFkB1 em indivíduos portadores de diferentes formas clínicas e níveis de gravidade da doença periodontal. Este é o primeiro trabalho em parte da população brasileira que avalia tais polimorfismos na periodontite agressiva e crônica.

Uma vez que a resposta inflamatória determina as características destrutivas da doença periodontal, o entendimento do perfil imunológico na doença se faz necessário. Assim, a outra proposta do estudo foi avaliar o perfil fenotípico de moléculas de apresentação de antígenos e ativação celular (HLA-DR e CD69), co-estimulação (CD80, CD86, CD28 e CTLA4) e citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL10 e IL17A) relacionadas às vias de STAT1, STAT4 e NFkB1 em células mononucleares (CD14+, CD4+ e CD8+) do sangue periférico de indivíduos com e sem periodontite frente ao estímulo periodontopatogênico LPS- *P.gingivalis* e estímulo inespecífico LPS- *E.coli*.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar o perfil genotípico e fenotípico de genes relacionados à resposta imune em indivíduos com diferentes formas clínicas e gravidade da periodontite.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a presença dos polimorfismos nos genes das citocinas IL17A (rs2275913) e IL17F (rs763780), do receptor de citocinas IL23R (rs11209026), das moléculas de sinalização intracelular NFkB1 (rs721412), STAT1(rs3771300) e STAT4 (rs7574865) em indivíduos com periodontite crônica, com periodontite agressiva e sem manifestações clínicas da periodontite.
- Avaliar a associação entre os polimorfismos acima citados com a gravidade da doença periodontal.
- Avaliar a ocorrência de múltiplos polimorfismos em indivíduos com periodontite crônica, com periodontite agressiva e sem manifestações clínicas da doença periodontal.
- Avaliar a frequência e intensidade de expressão de moléculas relacionadas a apresentação de antígenos e ativação celular (HLA-DR e CD69), co-estimulação (CD80, CD86, CD28 e CTLA4) e citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL10

e IL17A) relacionadas às vias de STAT1, STAT4 e NFkB1 em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos com periodontite crônica, com periodontite agressiva e sem manifestações clínicas da doença periodontal.

- Frente ao estímulo periodontopatogênico (LPS- *P.gingivalis*), avaliar o perfil de expressão das moléculas HLA-DR, CD80, CD86, CD69, CD28, CTLA4, TNF- α , IFN- γ , IL10 e IL17A, por linfócitos e monócitos do sangue periférico de indivíduos com periodontite crônica, com periodontite agressiva e sem manifestações clínicas da doença periodontal.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Parte Clínica: estratégia amostral

Foram incluídos neste estudo um total de 239 indivíduos, com ambos os gêneros e de etnia múltipla (como se define a a população brasileira) diagnosticados segundo os critérios da Academia Americana de Periodontia (Armitage, 1999), nos grupos de portadores de periodontite agressiva (PA), periodontite crônica (PC) e indivíduos sem a doença periodontal, considerados controle (C). Os pacientes com doença periodontal foram triados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), enquanto os pacientes controles foram triados na Clínica de Especialização em Cirurgia Odontológica/FO-UFMG e na Clínica Integrada de Atenção Primária/FO-UFMG.

Os exames clínicos de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento a sondagem foram feitos de forma manual em todos os indivíduos, utilizando a sonda periodontal número 15 (Hu Friedy, Chicago, IL, USA), como estabelecido pela University of North Caroline (UNC). Foram incluídos no estudo apenas indivíduos que apresentavam mais de 14 dentes (Os exames forma executados pelos alunos de graduação e pós-graduação da FO-UFMG, sendo supervisionados pelo corpo docente, responsável pelo diagnóstico clínico da periodontite. A coleta de amostra deu-se início em 2006, com término em 2011.

Todos os pacientes submetidos à triagem receberam tratamento indicado, independentemente de sua participação na pesquisa. Os pacientes ou representantes legais (daqueles menores de idade) forneceram o consentimento livre e esclarecido para a participação no projeto, de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 196/96 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos. A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG sob parecer CAAE- 0549.0.203.000-11.

Os indivíduos incluídos no grupo PA apresentaram idades de 15 a 53 anos, exibiam forma altamente destrutiva da periodontite, com rápida progressão da doença, ausência de irritantes locais compatíveis com o grau de destruição observado, evidência de início precoce da doença (histórico clínico e radiográfico), e apresentavam profundidade de sondagem (PS) > 4mm e sangramento à sondagem. O grupo PA continha indivíduos com a forma localizada da doença, caracterizada por danos em primeiros molares e incisivos permanentes, e indivíduos com a forma generalizada, caracterizada por perda de estrutura de suporte interproximal em no mínimo três dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos. Os indivíduos incluídos no grupo PC apresentaram idades entre 27 a 70 anos, exibiam presença de grande quantidade de irritantes locais, progressão lenta à moderada da doença, apresentavam profundidade de sondagem > 4mm e sangramento à sondagem. Todos os indivíduos incluídos nos grupos PA e PC estavam clinicamente sadios na época da coleta, com exceção da doença periodontal. Durante o exame clínico foram obtidos dados da história médica e odontológica dos pacientes, achados radiográficos e parâmetros clínicos, incluindo medida

de perda de inserção clínica, profundidade de sondagem, grau de mobilidade dental, sangramento à sondagem e presença de biofilme/cálculo. A classificação quanto à gravidade da doença se baseou no dado da média de perda de inserção clínica (PI). Indivíduos exibindo $PI \geq 5\text{mm}$ foram considerados com periodontite grave e aqueles exibindo $3\text{mm} < PI < 5\text{mm}$ foram considerados com periodontite moderada (MOREIRA et al., 2005). Os indivíduos sem doença periodontal (C) tinham idade entre 14 a 62 anos e no momento da coleta de amostra havia ausência de perda de inserção clínica e nenhum sítio com profundidade de sondagem maior que 3mm. Adicionalmente, estes indivíduos relataram não apresentar alterações sistêmicas.

Um questionário foi aplicado a todos os indivíduos envolvidos neste estudo. Os critérios de exclusão aplicados foram: uso de aparelhos ortodônticos, uso de medicações anti-inflamatórias ou imunossupressoras, uso de antibiótico em menos de 6 meses, diabetes, hepatite, infecção por HIV, discrasias sanguíneas ou imunocomprometidos e gravidez. Uma vez que o tabagismo é um importante fator de risco para a periodontite, os indivíduos foram classificados considerando este hábito (ALBANDAR, 2002; MEISEL et al., 2004). Os tabagistas foram definidos como fumantes (consumo diário de acima de 10 cigarro) e ex-fumantes, já os não tabagistas foram definidos como os que nunca fumaram. Na Tabela 1 foi caracterizado o perfil amostral de cada forma clínica avaliada.

Tabela 1: Perfil dos indivíduos avaliados no estudo genotípico e fenotípico

Parâmetros Clínicos	Controle (C)	Periodontite Crônica (PC)	Periodontite Agressiva (PA)
Número de indivíduos	88	98	53
Idade - anos (média)	14-62 (30.6)	27-70 (49.1)	15-53 (35)
Gênero			
Masculino (%)	37 (42.05)	31 (31.63)	18 (33.96)
Feminino (%)	51 (57.95)	67 (68.37)	35 (66.04)
Tabagismo			
Ex-fumante (%)	6 (6.82)	23 (23.47)	7 (13.21)
Fumante (%)	6 (6.82)	15 (15.31)	5 (9.43)
Não-fumante (%)	76 (86.36)	60 (61.22)	41 (77.36)
Perda de Inserção			
mediana ± desvio padrão		5.17 ± 0.93	5.61 ± 0.88

Conforme será descrito nos próximos tópicos, foram coletadas amostras de raspado de mucosa jugal para a avaliação dos polimorfismos gênicos e para o estudo fenotípico foram coletadas amostras de sangue periférico dos indivíduos C, PC e PA.

3.2 - Estudo Genotípico

Para a execução desta parte do trabalho, o DNA de amostras de raspado de mucosa jugal de indivíduos dos grupos C, PC e PA foi extraído. O DNA obtido foi submetido à técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-Time PCR*) para a avaliação de SNPs nos genes *IL17A*, *IL17F*, *IL23R*, *NFkB1*, *STAT1*, *STAT4*. A análise dos resultados nos permitiu responder as seguintes perguntas: (1) há ocorrência de polimorfismos nos

genes analisados dentro da população estudada? (2) existe alguma associação entre estes polimorfismos e a doença periodontal? (3) há alguma associação dos polimorfismos com o estabelecimento de formas clínicas distintas? (4) há alguma associação dos polimorfismos avaliados com a gravidade da doença periodontal?

A seguir, encontra-se descrita a metodologia que foi aplicada nesta etapa.

3.2.1 - Extração do DNA

Amostras de raspado da mucosa jugal de 181 indivíduos foram coletadas com uma espátula plástica estéril (LABOR IMPORT^(R)) e armazenadas em solução tampão (Krebs). O DNA proveniente do material coletado foi extraído segundo protocolo descrito por BOOM *et al.* (1990) com algumas modificações detalhadas a seguir. Após a centrifugação e o descarte do sobrenadante, foram adicionados 450µl de solução de lise celular e 20µl de suspensão de sílica. O material foi submetido à agitação no vortex e em seguida mantido no banho seco, a 56°C, por 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e a sílica lavada por duas vezes com 450µl de tampão de lavagem. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com etanol 70% e, finalmente, uma lavagem com acetona. O sobrenadante foi descartado e a sílica permaneceu no banho seco por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 100µl de tampão TE (TRIS-EDTA, pH=8) e agitado em vortex. O material permaneceu no banho seco, a 56°C por 12

horas. Após nova agitação, o material foi centrifugado para obtenção do “pellet” e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido e armazenado a -20°C.

3.2.2 - Técnica de genotipagem por PCR em Tempo-Real

A técnica se baseia na amplificação *in vitro* de regiões de interesse do DNA, utilizando iniciadores específicos para determinada sequência correspondente aos SNP dos genes avaliados. As reações foram baseadas no sistema de detecção TaqMan, utilizando primers ou sondas confeccionados pela Applied Biosystems^(R) (*IL17A* rs2275913, c_15879983-10 Assay ID; *IL17F* rs763780, c_2234166-10 Assay ID; *IL23R* rs11209026, c_1272298-10 Assay ID; *NFkB1* rs721412, c_338616-10 Assay ID; *STAT1* rs3771300, c_22274194-10 Assay ID; *STAT4* rs7574865, c_29882391 Assay ID).

Para avaliação de cada SNP foram utilizadas duas sondas, cada uma correspondente a cada alelo do polimorfismo de interesse, marcadas com dois diferentes fluorocromos *reporter* (VIC para um dos alelos e FAM para o outro) na extremidade 5'. Na extremidade 3' encontra-se o “*quencher*” não fluorescente. Assim que a replicação do DNA amostral se inicia, as sondas se ligam aos seus nucleotídeos correspondentes na fita de DNA simples. No momento em que a Taq Polimerase encontra a porção 5' da sonda (ligada ao DNA), a sonda é degradada através de uma reação exonuclease (5'-3') e o fluorocromo ligado a sua porção 5' é liberado, cujo comprimento de onda emitido por ele é detectado pela máquina de *RealTime* PCR (Figura 3 A). Desta forma a fluorescência emitida pelo *reporter* pode ser reconhecida e sua intensidade quantificada em função do número de cópias amplificadas. Assim é

possível identificar os diferentes genótipos (homozigoto e heterozigoto) de cada polimorfismo e categorizar as amostras (Figura 3 B).

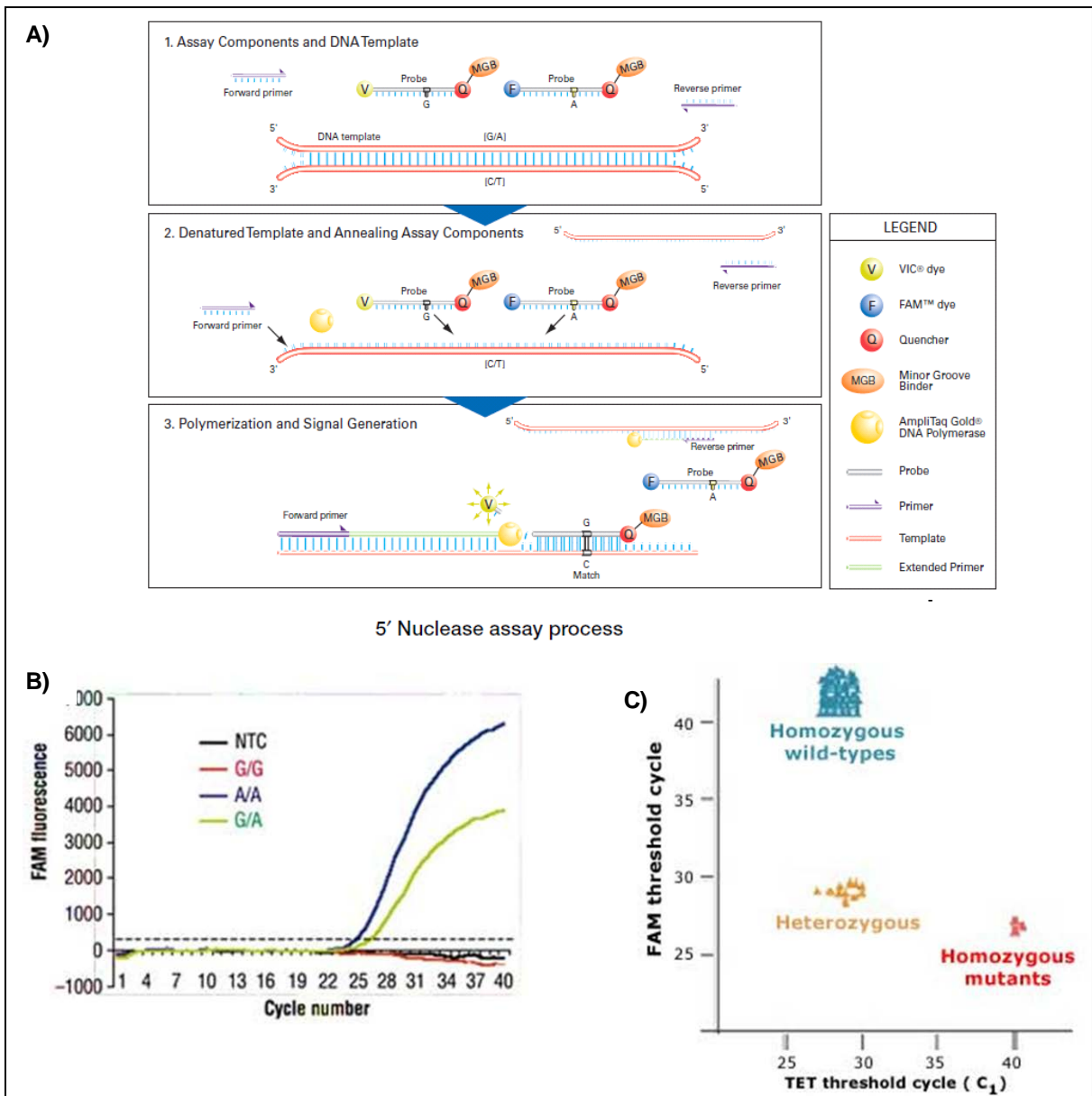


Figura 3: Esquema ilustrativo da técnica de PCR em tempo real.

A) Desenho esquemático do processo de PCR em tempo real, utilizando o sistema TaqMan; B) Gráfico mostrando a detecção das fluorescências emitidas pela reação de PCR. C) Gráfico dotplot representando os diferentes genótipos encontrados.

Fonte: <<http://www.bio-rad.com>> Acesso 11 de agosto de 2012.

As reações foram realizadas no termociclador C1000™ Thermal Cycler/CFX96 (Bio-Rad Laboratories, USA), usando um volume final de 20 µl, contendo: 50ng de DNA, 10µl de Genotyping Assay Master Mix e 0.5 µl de

sonda. O protocolo utilizado para a amplificação da sequência gênica foi: 40 ciclos de 95°C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

3.3 - Estudo Fenotípico

Para a realização desta etapa, foram coletadas amostras do sangue periférico de 86 indivíduos distribuídos em: 32 no grupo C, 27 no grupo PC e 27 no grupo PA. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas do sangue total por gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA) e cultivadas na ausência e presença de estímulos. Os estímulos utilizados foram LPS de *P.gingivalis* (Invivogen^(R)) e de *E.coli* (Sigma^(R)). A avaliação do perfil fenotípico das CMSP foi feita através de marcações específicas, conforme detalhado a seguir, e analisadas por citometria de fluxo. As principais perguntas que buscamos responder nesta etapa foram: (1) a presença de estímulo periodontopatogênico interfere no perfil da resposta imune celular em cultura? (2) existe diferença na expressão de moléculas envolvidas com a resposta imune entre indivíduos doentes e não doentes? (3) se existe, estará ela restrita a alguma forma clínica ou a algum tipo celular?

3.3.1 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Para a obtenção das CMSP, o sangue foi coletado em tubos *vacutainer* heparinizados e diluído em PBS (Sigma^(R)) na proporção 1:1, para melhor recuperação das células. O sangue diluído foi então cuidadosamente colocado sobre a solução de Ficoll-Hypaque (na proporção 1:2) (GE Healthcare, Piscataway, USA) e os tubos centrifugados à temperatura ambiente (20°C) por 40 minutos a 1200 rpm, para a formação do gradiente de densidade. Este fracionamento em gradiente de Ficoll forma um anel esbranquiçado situado entre o plasma e a camada de Ficoll, onde se encontram as células mononucleares. Estas células foram, então, retiradas com o uso de uma pipeta Pasteur e lavadas com PBS (Sigma^(R)), em 3 centrifugações de 1200 rpm, 4°C por 10 minutos cada. Feito isso, as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS (Sigma^(R)). Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi então diluída em corante Azul de Tripán, na proporção 1:20, para contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Esse procedimento permitiu fazer o ajuste na concentração de células para a marcação com anticorpos monoclonais; de modo que foi obtido uma suspensão de 1×10^7 células/ml.

3.3.2 - Cultura das CMSP com LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*

As culturas foram realizadas em placa de 96 poços, contendo 2×10^5 CMSP, 160 µl de meio RPMI completo (1% antibiótico e antimicótico, 1% de L-glutamina, 5% de soro humano inativado) e 10 ng do LPS bacteriano, como previamente padronizado no Laboratório de Biologia das Interações Celulares.

As células foram plaqueadas de acordo com os seguintes tratamentos: (1) CMSP + meio, (2) CMSP + meio + LPS de *P.gingivalis*, (3) CMSP + meio + LPS de *E.coli*. Em todas as condições, as CMSP foram mantidas a 37⁰C e 5% CO₂, por um período de 14 horas. Após este período, as células foram submetidas às marcações para moléculas de superfície e intracitoplasmáticas.

3.3.3 - Imunofluorescência para avaliação da expressão de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas por diferentes subtipos celulares

A marcação por imunofluorescência seguiu o protocolo estabelecido por Dutra *et al.* (2000). Após o período de 14 horas, as CMSP foram retiradas da cultura e centrifugadas por 8 minutos, 1300 rpm, à 4⁰C. As células foram incubadas com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos para marcação de molécula de superfície, por 15 minutos, à 4⁰C. Posteriormente as células foram lavadas 2x com PBS (Sigma^(R)), seguida de centrifugação (8 minutos, 1300 rpm, 4⁰C). Em seguida, as amostras foram fixadas com formaldeído a 2%, por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Para a marcação intracitoplasmática das citocinas, após a incubação por 14 horas, 1mg/ml de Brefeldina A foi adicionado às culturas para impedir a secreção das moléculas, concentrando-as no aparelho de Golgi das células. As placas foram novamente incubadas por 4 horas. Após este período, as células em cultura foram submetidas ao protocolo de marcação de moléculas de superfície, seguida de lavagem com PBS (Sigma^(R)), centrifugadas (8 minutos a 1300 rpm, 4⁰C) e incubadas por 10 minutos com solução de permeabilização [0.5% de saponina em PBS (Sigma^(R))] à temperatura ambiente. Após

centrifugação, as células foram novamente incubadas com anticorpos monoclonais anti- TNF- α , anti-IL10, anti-IFN- γ e anti-IL17A, por 30 minutos, a 4^oC. Em seguida, as células foram lavadas por 2x com PBS (Sigma^(R)) e centrifugadas por 8 minutos, a 1300 rpm, 4^oC. As amostras foram resuspendidas em tampão [PBS (Sigma^(R)) 0.1% BSA/0.1% azida (Sigma^(R))] e lidas em citômetro de fluxo (FACScan Becton-Dickenson^(R)). Para todos os ensaios foram realizadas marcações com isotipo (IgG1 e IgG2) associado aos mesmos fluorocromos utilizados para as marcações de superfície e intracelulares, para estabelecimento de controle de fluorescência.

Os anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados no estudo fenotípico foram: IgG1/IgG2 com FITC/PE; anti-CD14 FITC/PE; anti-CD8 FITC; anti-CD4 Cy; anti-TNF- α PE; anti-IL10 PE; anti-IFN- γ PE; IL17A PE; anti-CD80 PE; anti-CD86 PE; anti-CTLA4 PE; anti-CD28 PE; anti-HLA-DR FITC/PE.

3.3.4 - Aquisição no citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo utilizado neste estudo foi FACScan (Becton-Dickson^(R)) equipado com sistema de computador contendo o software CellQuest™ ou BD FACSDiva™ 6.0 software (San Jose, CA, USA). Este equipamento permite a avaliação básica de 5 parâmetros: tamanho (FCS) e granulosidade (SSC) – obtidos pelas características morfológicas das células, independente de qualquer fluorescência, além das fluorescências do tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2) e tipo 3 (FL3). FL1, FL2 e FL3 correspondem a sinais luminosos emitidos pela excitação do isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e cy-chrome (CY), respectivamente. Estes parâmetros são

detectados utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. O emprego de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos permitem identificar, em uma mesma célula, estruturas distintas, reconhecidas pelos anticorpos específicos.

Durante a aquisição dos dados foram coletados de 20000 a 30000 eventos por amostra para análise dos marcadores de superfície e intracelulares. Os dados adquiridos no citômetro de fluxo foram analisados no programa FlowJo.

3.3.5 - Estratégias de análise pelo programa FlowJo

Como primeira etapa do processo de análise foram determinadas as populações celulares de interesse, monócitos e linfócitos, segundo o perfil de tamanho e granulosidade. Definidas as populações de interesse, procedeu-se às análises de fluorescência. Através de anticorpos IgG de camundongos do mesmo isotipo dos anticorpos utilizados nas marcações, conjugados com os fluorocromos FITC e PE, foi possível identificar o parâmetro de fluorescência estabelecido pelo controle de isotipo (Figura 4).

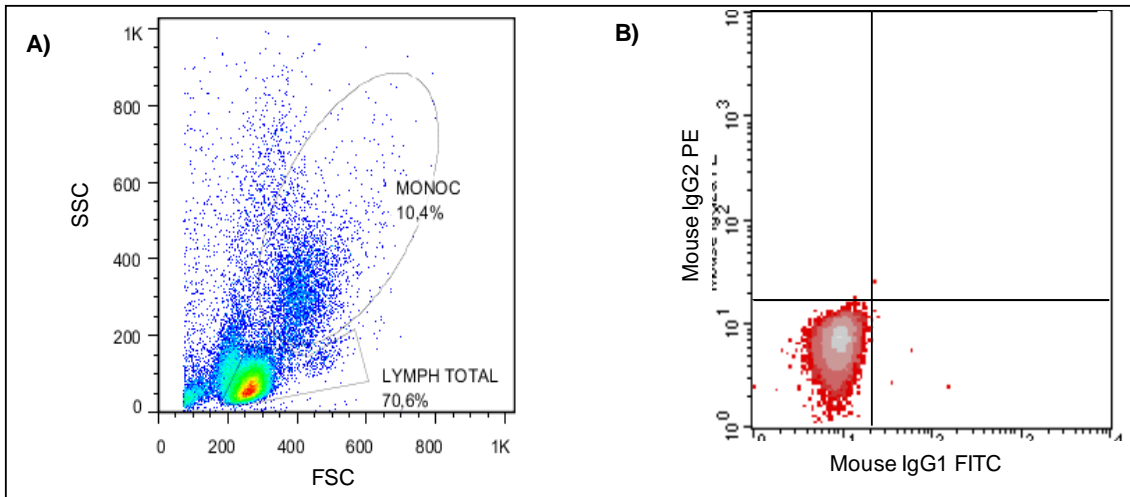


Figura 4: Perfil de distribuição de CMSP no gráfico de tamanho *versus* granulosidade e no controle de isotipo.

A) Regiões de monócitos, representado no gráfico como MONOC, e de linfócitos totais, representado no gráfico como LYMPH TOTAL, no gráfico de tamanho x granulosidade. B) Distribuição das CMSP marcadas com anticorpos não relacionados associados aos fluorocromos FITC e PE para estabelecimento do controle de isotipo.

Como mostrado na Figura 5B, quadrantes foram posicionados segundo o controle de isotipo para a determinação da frequência de células simples-positivo (quadrantes superior esquerdo e inferior direito), duplo-positivo (quadrante superior direito) e duplo-negativo (quadrante inferior esquerdo). Definidos os quadrantes, histogramas foram obtidos para aquisição dos dados de percentagem da frequência de células marcadas com diferentes fluorocromos bem como valores absolutos de intensidade média de fluorescência (IMF) de cada anticorpo (Figura 5C). Duas estratégias de análise da população de linfócitos foram abordadas, conforme descrito a seguir e ilustradas na Figura 5.

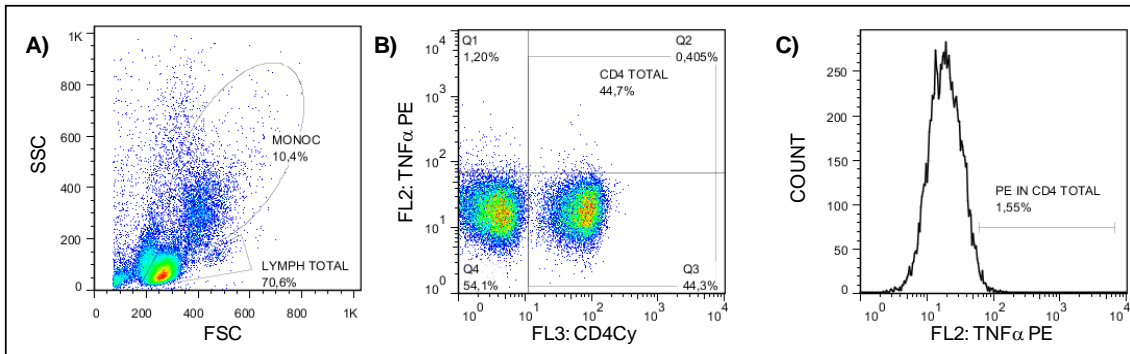


Figura 5: Estratégia de análise utilizada na citometria de fluxo.

Gráficos do tipo dot-plot mostrando a seleção das células de interesse (A e B) e gráfico do tipo histograma (C) mostrando a seleção de células co-expressando diferentes marcadores celulares. O caso representado se refere a análise de célula CD4+ co-expressando TNF- α .

1) Com o objetivo de estabelecer, dentro da grande população de linfócitos, a frequência e IMF de determinada molécula por células T CD4+ ou CD8+, considerou-se a população de linfócitos totais como 100% das células avaliadas. Para estudo da frequência de células duplo positivas, considerou o valor de Q2 para a população CD4+ (Figura 5B). Para o estudo de IMF da molécula de interesse, foi criado histograma a partir de Q2 (Figura 5C)

2) Com o objetivo de estabelecer a frequência e IMF de determinada molécula, dentro de cada sub-população de linfócitos T CD4+ ou CD8+, considerou-se cada população celular (CD4+ ou CD8+) como 100% das células avaliadas (Q2 + Q3) (Figura 5B), que recebeu o nome de CD4 total ou CD8 total. A partir da população selecionada, construiu-se o histograma para estabelecimento dos parâmetros de frequência e IMF de cada molécula de interesse. No esquema da figura 5C a frequência foi representada como PE IN CD4 TOTAL (1.55%) e o IMF foi representado como TNF- α PE: Mean (22.0).

3.4 - Análise Estatística

No estudo genotípico, o teste do Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar a distribuição dos genótipos entre os grupos C, PC e PA através de tabelas de contingência 3 x 2. A distribuição dos alelos e dos genótipos +/- entre os grupos (C vs PC, C vs PA, PC vs PA), assim como as análises considerando a gravidade da doença, foram realizadas através de tabelas de contingência 2 x 2. O teste exato de Fisher foi aplicado quando os valores observados foram inferiores a 5 eventos. Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) foram calculados nas tabelas de contingência 2x2. Estas análises foram realizadas usando o programa de estatística JMP (SAS, Cary, NC, USA). Para a análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizamos o programa BioStat e para estudo de desequilíbrio de ligação e análise de haplótipo utilizamos Haploview 4.2 (Broad Institute, Los Angeles, CA).

No estudo fenotípico, teste de Kolmogorov Smirnov foi aplicado para avaliar a distribuição normal dos dados. Para avaliação dos dados entre amostras independentes (formas clínicas sob o mesmo estímulo), com distribuição não normal, foram usados os testes Kruskal Wallis (para mais de 2 grupos) e Mann Whitney (até 2 grupos); e para os dados com distribuição normal, foram usados os testes Tukey (para mais de 2 grupos) e t-teste (até 2 grupos). Para avaliação dos dados entre amostras dependentes (estímulos na mesma forma clínica), com distribuição não normal, foram usados os testes Friedman (para mais de 2 grupos) e Wilcoxon (até 2 grupos), e para os dados com distribuição normal, foram usados os testes Bonferroni (para mais de 2 grupos) e t-teste (até 2 grupos). Com o objetivo de entender o perfil

imunológico de monócito e linfócitos na doença periodontal foi feita análise da razão e correlação entre as marcações. Para o estudo de correlação utilizamos o teste de Spearman para dados com distribuição não normal e Pearson para dados com distribuição normal. Os testes estatísticos foram realizados através dos programas GraphPad Prism 5.1 e JMP 5.0.1. Para todas as análises considerou-se o valor de p significativo < 0.05 .

4.0 - RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas partes. A Parte I: “Estudo genotípico” corresponde aos achados referentes ao estudo dos polimorfismos nos genes *IL17A* (rs2275913), *IL17F* (rs763780), *IL23R* (rs11209226), *STAT1* (rs3771300), *STAT4* (rs7574865) e *NFkB1* (rs721412). Conforme permitido pela Resolução 04/2000 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, os resultados referentes à Parte I estão expostos na forma de artigos científicos. A Parte II: “Estudo fenotípico” corresponde aos resultados obtidos no estudo da expressão de diferentes moléculas de superfície e intracitoplasmáticas envolvidas na resposta imune. Estes resultados estão dispostos na forma tradicional.

4.1 - Parte I - Estudo Genotípico

4.1.1 - Polimorfismos dos genes *IL17A* (rs2275913), *IL17F* (rs763780) e *IL23R* (rs11209026)

Os resultados referentes a estes polimorfismos foram compilados na forma de artigo científico aceito para a publicação no periódico *Human Immunology* (DOI: 10.1016/j.humimm.2012.10.026) (Anexo I).

4.1.2 - Polimorfismos dos genes *NFkB1* (rs721412), *STAT1* (rs3771300) e *STAT4* (rs7574865)

Os resultados referentes a *STAT1* (rs3771300) foram compilados na forma de artigo científico e submetidos ao periódico *Inflammation Research* (Anexo II). Considerando os polimorfismos *STAT4* (rs7574865) e *NFkB1* (rs721412), não foi possível encontrar associação dos genótipos ($p=0.57$, $p=0.6$; respectivamente) e alelos ($p=0.73$, $p=0.17$; respectivamente) entre as formas clínicas C, PC e PA. Notou-se uma alta frequência do genótipo GG de *STAT4* (rs7574865) e do genótipo AA de *NFkB1* (rs721412) em todos os grupos.

4.1.3 - Análise multivariada

A análise de regressão logística binomial é uma ferramenta de modelagem estatística, que consiste em relacionar a variável categórica denominada “resposta” com as variáveis “explicativas” que influenciam a ocorrência de determinado evento. Neste trabalho foi utilizado o modelo de regressão logística binária em que a variável resposta é dicotômica, “ausência” e “presença” de periodontite, com o objetivo de estimar a associação de fatores de risco genéticos relacionados à doença periodontal crônica e agressiva em indivíduos não fumantes. As variáveis de referência foram categorizadas em “1”, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Variáveis relevantes para o modelo de regressão logística binomial para análise de fatores de risco para Doença Periodontal Crônica e Agressiva.

Variável	Definição	Categorização
Doença Periodontal	Dependente	1- Ausência 0- Presença
Polimorfismos Gênicos	Independente	
<i>IL17A</i> (rs2275913)		0- alelo G 1- alelo A
<i>IL17F</i> (rs763780)		0- alelo T 1- alelo C
<i>IL23R</i> (rs11209026)		0- alelo G 1- alelo A
<i>STAT1</i> (rs3771300)		0- alelo T 1- alelo G
<i>STAT4</i> (rs7574865)		0- alelo T 1- alelo G
<i>NFkB1</i> (rs721412)		0- alelo G 1- alelo A

Na regressão binária univariada, observou-se associação apenas para *IL17A* (Wald= 7.237; p=0.007), sugerindo que o alelo A de *IL17A* (rs2275913) possa representar um fator de proteção para PA. Através deste modelo é possível dizer que indivíduos que possuem o alelo A de *IL17A* (rs2275913) apresentam um risco (OR) 0.213 de não desenvolver PA. Os valores de regressão binária univariada foram representados na tabela 3.

Tabela 3: Estimativas de parâmetros para análise de regressão logística binomial.

Variável Independente	C versus PC						C versus PA					
	B	Erro Padrão	Wald	p	OR	IC 95%	B	Erro Padrão	Wald	p	OR	IC 95%
<i>IL17A</i>	0.694	0.417	2.774	0.096	2.003	0.885-4.534	1.547	0.575	7.237	0.007	0.213	1.522-14.49
<i>IL17F</i>	0	0.844	0	1	1	0.191-5.228	-0.243	0.948	0.066	0.798	0.784	0.122-5.031
<i>IL23R</i>	0.408	0.583	0.49	0.484	0.665	0.212-2.085	-0.606	0.663	0.836	0.36	0.545	0.149-2.0
<i>STAT1</i>	-0.111	0.422	0.069	0.792	0.895	0.391-2.046	-1.153	0.621	3.442	0.064	0.316	0.093-1.067
<i>STAT4</i>	0.377	0.453	0.692	0.405	1.458	0.6-3.547	-20.531	40193	0	1	0	0
<i>NFkB1</i>	0.476	0.624	0.582	0.445	1.61	0.474-5.472	1.067	0.664	2.579	0.108	2.905	0.79-10.678

B (coeficiente), OR (Odds Ratio), IC (Intervalo de Confiança)

Para o estabelecimento de um modelo de regressão múltipla foram incluídas as variáveis que apresentaram valor de “p” < 0.25 na análise de regressão binária univariada. Para o estudo em PC poderia se considerar apenas *IL17A*, não sendo suficiente para estabelecer um modelo múltiplo. Para o estudo em PA, foram consideradas as variáveis *IL17A*, *STAT1* e *NFkB1*. Este modelo identificou que apenas *IL17A* apresentou associação com a proteção para a doença, não sendo possível notar associações múltiplas dos genes com PA.

4.2 - Parte II - Estudo Fenotípico

O estudo fenotípico teve como objetivo caracterizar o perfil celular e estabelecer possíveis diferenças na expressão de moléculas relacionadas com o mecanismo de apresentação de antígenos e ativação celular (HLA-DR e CD69); co-estimulação (CD80, CD86, CD28 e CTLA4) e citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL10 e IL17A) por monócitos CD14+ e linfócitos CD4+ e CD8+ do sangue periférico de indivíduos dos grupos C, PC e PA sob diferentes estímulos. A fim de avaliar o perfil fenotípico entre indivíduos portadores ou não da doença periodontal, as análises também foram realizadas considerando indivíduos não doentes (ND - Controle) e doentes (D - somatório dos grupos PC e PA).

Os dados significativos referentes ao estudo de IL17A foram inseridos no artigo do Anexo I.

Com o objetivo de melhor compreender os resultados, duas estratégias de análise foram estabelecidas:

a) para cada condição de cultura (Meio, LPS- *E.coli* , LPS- *P.gingivalis*), a frequência e IMF das moléculas supracitadas foram comparadas entre os grupos C, PC e PA. Esquema representado na Figura 6.

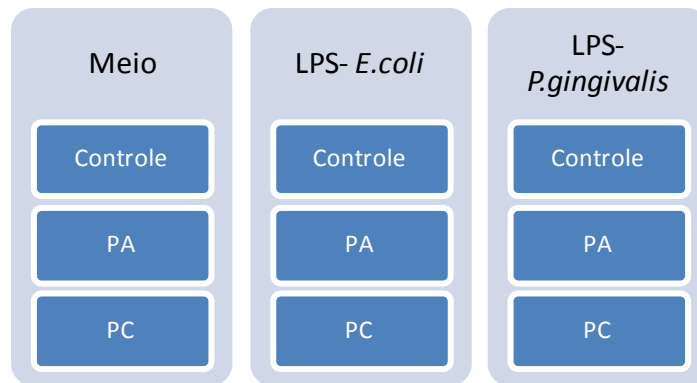


Figura 6: Estratégia de análise: para cada condição de cultura (contendo ou não estímulos de LPS bacterianos), foram comparadas a frequência e IMF das moléculas de superfície e intracelulares entre as formas clínicas C, PA e PC.

b) para cada forma clínica avaliada (C, PC e PA) foram comparadas as possíveis influências dos diferentes estímulos sobre a frequência e a IMF das moléculas supracitadas. Esquema representado na Figura 7.

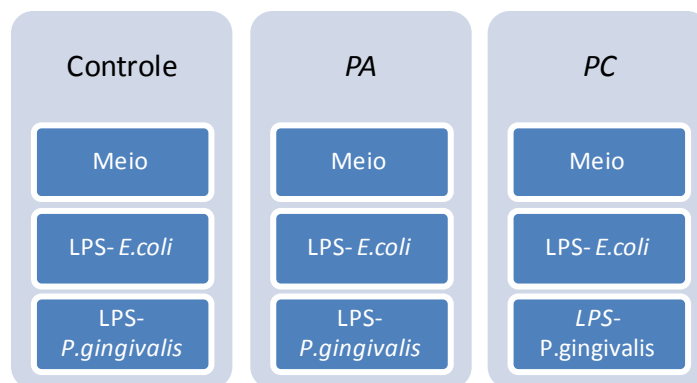


Figura 7: Estratégia de análise: para cada forma clínica (C, PC e PA) foram comparadas a frequência e IMF das moléculas de superfície e intracelulares frente a diferentes condições de cultura, contendo ou não estímulos de LPS bacterianos.

4.2.1 - Caracterização fenotípica dos monócitos de indivíduos dos grupos C, PC e PA

4.2.1.1 - Avaliação de monócitos CD14+ co-expressando as moléculas de superfície CD80, CD86 e HLA-DR

Os valores de frequência e de IMF das moléculas de superfície CD80, CD86 e HLA-DR expressas por monócitos CD14+, dentro de cada grupo (C, PC e PA) nas diferentes condições de cultura foram descritos na Tabela 4. Os resultados significativos foram, a seguir, descritos no texto e detalhados nas Figuras 8 e 9.

Tabela 4: Frequência (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das moléculas de superfície CD80, CD86 e HLA-DR em células CD14+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Parâmetro	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E. coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
% CD80	C	47.34 ± 7.11	59.32 ± 6.92	52.71 ± 7.5
	PC	41.87 ± 7.38	62.12 ± 8.54	54.06 ± 8.91
	PA	47.79 ± 6.55	68.16 ± 4.60	55.51 ± 6.32
IMF CD80	C	47.75 ± 8.33	66.49 ± 9.30	54.82 ± 8.60
	PC	55.50 ± 10.42	90.0 ± 16.29	77.0 ± 15.36
	PA	62.68 ± 8.66	83.06 ± 9.70	73.39 ± 10.61
% CD86	C	98.42 ± 0.44	96.20 ± 1.10	97.46 ± 1.05
	PC	97.20 ± 0.92	92.77 ± 3.38	96.15 ± 1.52
	PA	98.58 ± 0.35	95.09 ± 1.51	97.93 ± 0.47
IMF CD86	C	223.30 ± 19.64	135.11 ± 13.90	139.49 ± 13.60
	PC	296.23 ± 52.93	147.25 ± 18.0	181.06 ± 23.73
	PA	306.36 ± 38.30	171.69 ± 20.09	200.11 ± 18.63
% HLA-DR	C	91.71 ± 2.79	92.44 ± 1.57	94.17 ± 1.15
	PC	85.05 ± 4.11	86.17 ± 4.65	84.30 ± 4.64
	PA	89.9 ± 1.94	89.96 ± 2.34	89.54 ± 2.29
IMF HLA-DR	C	245.83 ± 33.98	223.34 ± 30.84	217.36 ± 27.43
	PC	151.51 ± 33.04	170.37 ± 27.92	167.96 ± 34.46
	PA	227.49 ± 60.28	225.39 ± 48.46	232.56 ± 58.39

Os valores representados se referem à média e ao (±) erro padrão.

Inicialmente, para cada condição de cultura, avaliou-se a diferença de expressão das moléculas CD80, CD86 e HLA-DR por células CD14+ entre os grupos C, PC e PA. Foram observados resultados significantes apenas em relação à IMF de CD86.

Na condição Meio, observou-se no grupo PA maior IMF de CD86 comparado com grupo C ($p= 0.0474^a$, Figura 8). Este resultado demonstra que monócitos do grupo PA apresentam um maior perfil de ativação basal

comparado ao C. Resultado semelhante foi observado na análise do grupo D (PA + PC) versus ND (C) ($p= 0.0475$).

Nas análises considerando o mesmo estímulo bacteriano pode-se avaliar se a expressão das moléculas é influenciada de forma diferente entre os grupos. Semelhante aos resultados encontrados na ausência de estímulos (Meio), os indivíduos do grupo PA expressaram maior IMF de CD86 comparado ao grupo C, na presença do estímulo de LPS- *P.gingivalis* ($p= 0.0136$ ^b, Figura 8).

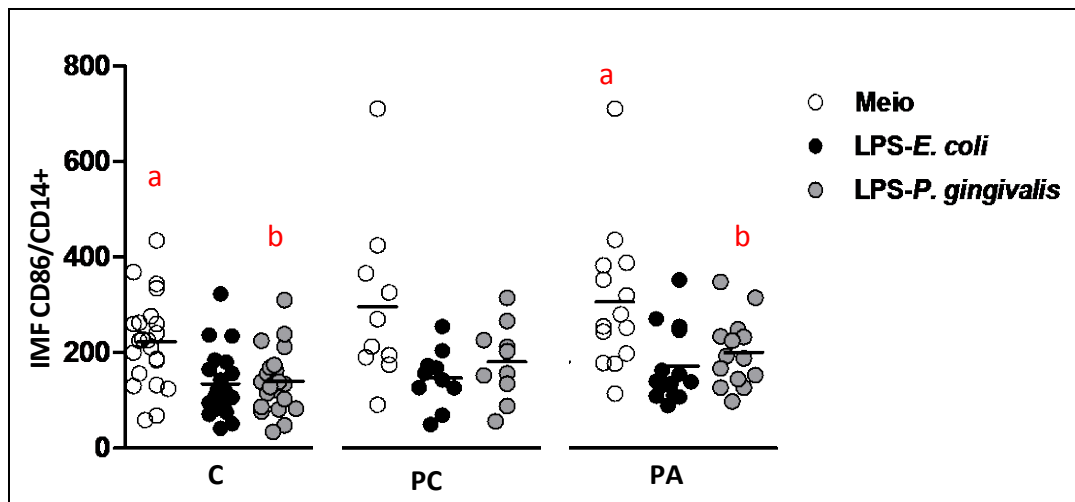


Figura 8: Estudo *in vitro* da IMF de CD86 em células CD14+. Comparação da expressão de CD86 entre as formas clínicas C, PC e PA dentro de cada condição de cultura (Meio, LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).

Posteriormente, para cada grupo (C, PC e PA), avaliou-se a diferença de expressão das moléculas CD80, CD86 e HLA-DR por células CD14+ entre as diferentes condições de cultura.

No grupo C, observou-se uma diferença significativa entre os tratamentos, com destaque para redução na IMF de CD86 na presença de

ambos os estímulos bacterianos ($p= 0.0003^a$, Figura 9 A). O estímulo LPS- *P.gingivalis* diminuiu a IMF de CD86 ($p<0.0001^b$, Figura 9 A) e aumentou a frequência de células CD80 ($p= 0.0186^i$, Figura 9 B) quando comparado ao Meio.

No grupo PC, comparando-se os três tratamentos (Meio, LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*), houve diferença significativa na IMF de CD86 ($p=0.0211^c$, Figura 9 A). O estímulo LPS- *P.gingivalis* diminuiu a IMF de CD86 ($p= 0.0182^d$, Figura 9 A) enquanto aumentou a frequência e a IMF de CD80 ($p= 0.0252^j$, Figura 9 B; $p= 0.0103^m$, Figura 9 C, respectivamente), quando comparado com Meio. O estímulo LPS- *E.coli* exerceu maior influência na diminuição da IMF de CD86 ($p= 0.0436^e$, Figura 9 A) e no aumento da frequência e da IMF de CD80 ($p= 0.0364^k$, Figura 9 B, e $p= 0.0054^n$, Figura 9 C, respectivamente) quando comparado ao LPS- *P.gingivalis*.

No grupo PA, comparando-se os três tratamentos (Meio, LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*), observou-se diferença significativa na frequência e IMF de CD86 ($p= 0.0002$ e $p= 0.0042^f$, Figura 9 A, respectivamente). O estímulo LPS- *P.gingivalis* diminuiu a IMF de CD86 ($p= 0.0038^g$, Figura 9 A) e aumentou a IMF de CD80 ($p= 0.0475^o$, Figura 9 C), quando comparados com Meio. O LPS- *E.coli* diminuiu a IMF de CD86 ($p=0.0195^h$, Figura 9 A) e aumentou a frequência e IMF de CD80 ($p= 0.0014^l$, Figura 9 B, e $p= 0.0077^p$, Figura 9 C, respectivamente) comparado ao LPS- *P.gingivalis*.

No grupo D, LPS- *P.gingivalis* aumentou tanto a frequência quanto a IMF de CD80 ($p= 0.0057$ e $p= 0.001$, respectivamente), enquanto diminuiu a IMF de

CD86 ($p= 0.0001$), quando comparado ao Meio. Por sua vez, LPS- *E.coli* aumentou a frequência e IMF de CD80 ($p<0.0001$ em ambas as comparações) enquanto diminuiu de CD86 ($p= 0.0261$ e $p= 0.0014$, respectivamente) quando comparado ao LPS- *P.gingivalis*.

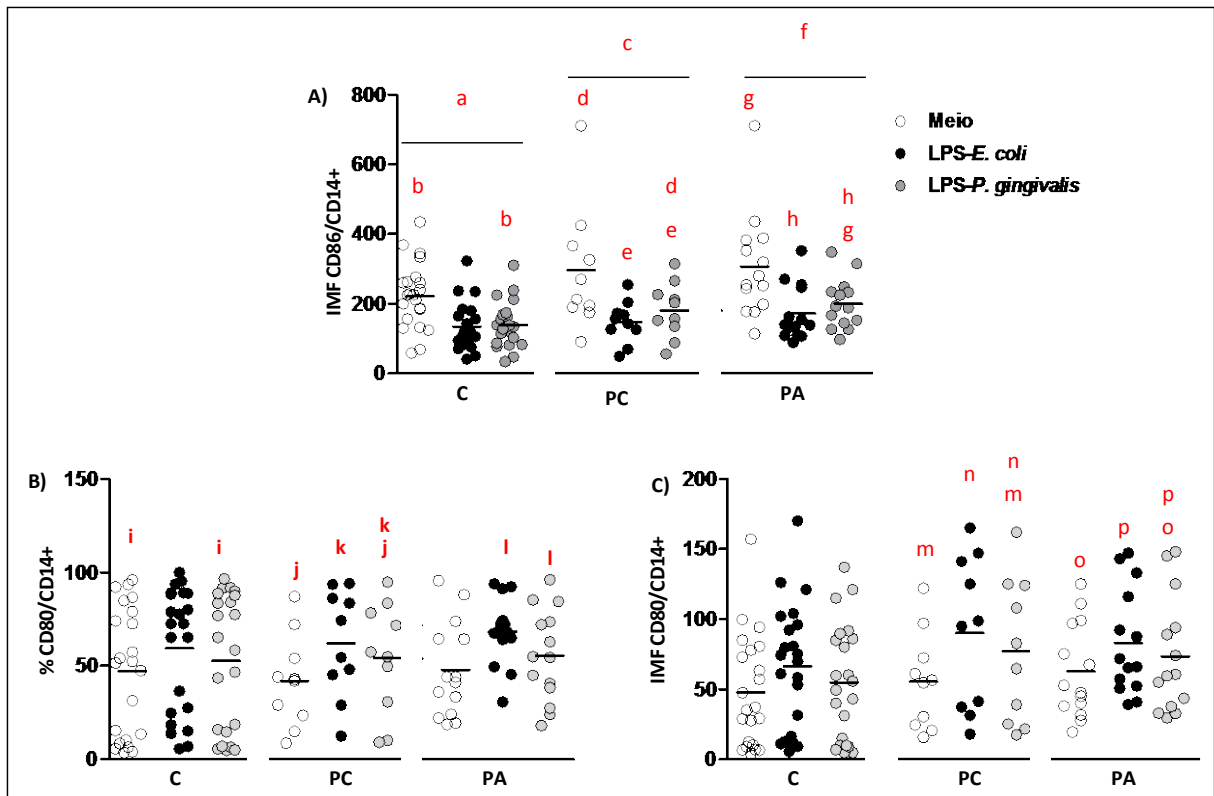


Figura 9: Estudo *in vitro* da % e IMF de CD80 e CD86 por células CD14+. Análise da influência do estímulo periodontopatogênico, LPS- *P.gingivalis*, dentro de cada forma clínica C, PC e PA. Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).

Com o objetivo de fazer um balanço entre células CD14+ co-expressando CD86 e CD80, foi feita a análise da razão da frequência e da IMF destas moléculas. Os resultados mostrados na Tabela 5 não revelaram diferença significativa na razão entre CD14+CD86+/CD14+CD80+ entre os grupos.

Tabela 5: Análise da razão entre as frequências (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de células CD14+CD80+/CD14+CD86+ na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Razão	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P.gingivalis</i>
% CD14+CD86+/CD14+CD80+	C	6.34 ± 1.66	3.45 ± 0.93	5.59 ± 1.45
	PC	3.57 ± 0.95	1.97 ± 0.4	3.33 ± 1.15
	PA	2.71 ± 0.39	1.5 ± 0.12	2.23 ± 0.33
IMF CD14+CD86+/CD14+CD80+	C	12.2 ± 3.16	3.52 ± 0.7	4.98 ± 0.93
	PC	6.42 ± 0.98	2.18 ± 0.43	3.42 ± 0.86
	PA	5.81 ± 0.88	2.16 ± 0.15	3.28 ± 0.45

Os valores representado se referem a média e (±) erro padrão.

4.2.1.2. Avaliação de monócitos CD14+ co-expressando as citocinas TNF- α e IL10

Os resultados referentes à expressão de TNF- α e IL10 por monócitos CD14+, dentro de cada grupo (C, PC e PA) nos diferentes tratamentos foram compilados na Tabela 6. Os resultados significativos foram a seguir descritos no texto e detalhados nas Figuras 10 e 11.

Tabela 6: Análise da expressão das citocinas TNF- α e IL10 por células CD14+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P.gingivalis</i>
% TNF-α+CD14+	C	29.04 ± 7.62	30.22 ± 7.20	27.11 ± 7.57
	PC	12.48 ± 3.23	13.59 ± 3.26	9.89 ± 1.63
	PA	7.19 ± 1.48	10.76 ± 1.83	9.86 ± 1.75
% IL10+CD14+	C	31.14 ± 8.12	33.86 ± 7.49	29.45 ± 7.96
	PC	12.53 ± 3.52	15.33 ± 2.81	10.0 ± 2.66
	PA	13.08 ± 4.59	13.91 ± 2.43	10.27 ± 2.42

Os valores se referem à média e ao (±) erro padrão.

Para cada condição de cultura, avaliou-se a frequência de expressão de TNF- α e IL10 por células CD14+ entre os grupos C, PC e PA. Resultado significativo foi encontrado apenas na ausência de estímulo (Meio), onde PA expressou menos TNF- α comparado ao grupo C ($p=0.0349$, Figura 10).

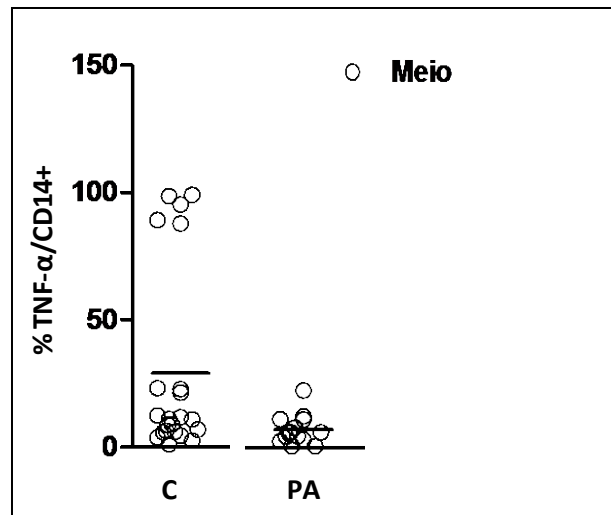


Figura 10: Frequência de células TNF- α /CD14+ nos grupos PA e C na ausência de estímulos (Meio). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).

Considerando cada grupo, avaliou-se a diferença de expressão das citocinas TNF- α e IL10 por células CD14+ entre os tratamentos. No grupo C, o LPS- *P.gingivalis* não exerceu influência na frequência de células CD14+TNF- α + quando comparado ao Meio, mas o LPS- *E.coli* aumentou a frequência de células CD14+TNF- α + quando comparado a LPS- *P.gingivalis* ($p=0.0231$ ^a, Figura 11 A).

Em todas as formas clínicas estudadas, o LPS- *P.gingivalis* foi capaz de reduzir a frequência de células CD14+IL10+, sendo significativo quando

comparado com LPS- *E.coli* (C: $p= 0.0178$ ^b; PC: $p= 0.0137$ ^c; PA: $p= 0.0245$ ^d,
 Figura 11 B).

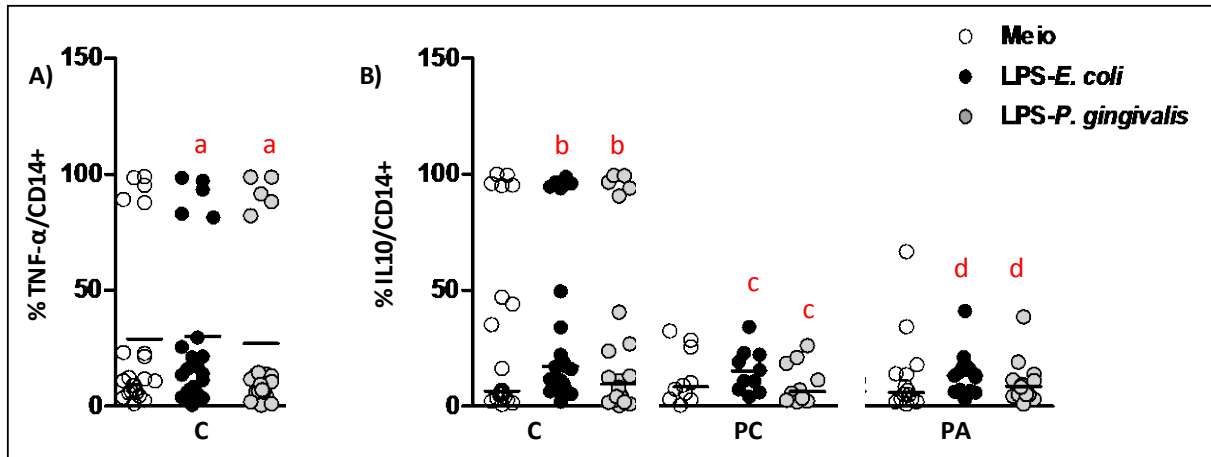


Figura 11: Frequência de células TNF α +CD14+ e IL10+CD14+. Análise da influência do estímulo periodontopatogênico, LPS- *P.gingivalis*, dentro de cada forma clínica estudada (C, PC e PA). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).

Os resultados mostraram também que há, em todas as condições de cultura e grupos, uma maior frequência de células CD14+IL10+ do que CD14+TNF- α + (Tabela 5). No estudo da razão IL10/TNF- α expressos por CD14, não foi possível encontrar diferença entre as formas clínicas. No entanto, no grupo PA houve uma tendência moduladora, tanto em Meio quanto na presença de LPS- *P.gingivalis*, quando comparado a C e PC (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da razão entre as frequências (%) de células CD14+IL10+/CD14+ TNF- α + na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Razão	Forma clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P.gingivalis</i>
CD14+IL10+/CD14+TNF- α +	C	1.5 \pm 0.41	1.54 \pm 0.22	1.31 \pm 0.29
	PC	1.87 \pm 0.83	2.68 \pm 1.33	1.91 \pm 1.05
	PA	3.02 \pm 1.21	1.79 \pm 0.37	2.07 \pm 0.57

Os valores representado se referem a média e (\pm) erro padrão.

Com o objetivo de avaliar o grau de associação entre as citocinas IL10 e TNF- α expressas por células CD14+ foi feita a análise de correlação entre as moléculas (Figura 12). No grupo C foi encontrada uma correlação positiva entre as células CD14+ expressando IL10 e TNF- α sob as condições Meio (Figura 12 A), LPS- *P.gingivalis* (Figura 12 C) e LPS- *E.coli* (Figura 12 B).

No grupo PA, observou-se correlação positiva entre as células CD14+ produtoras de IL10 e TNF- α na presença de LPS- *E.coli* (Figura 12 D).

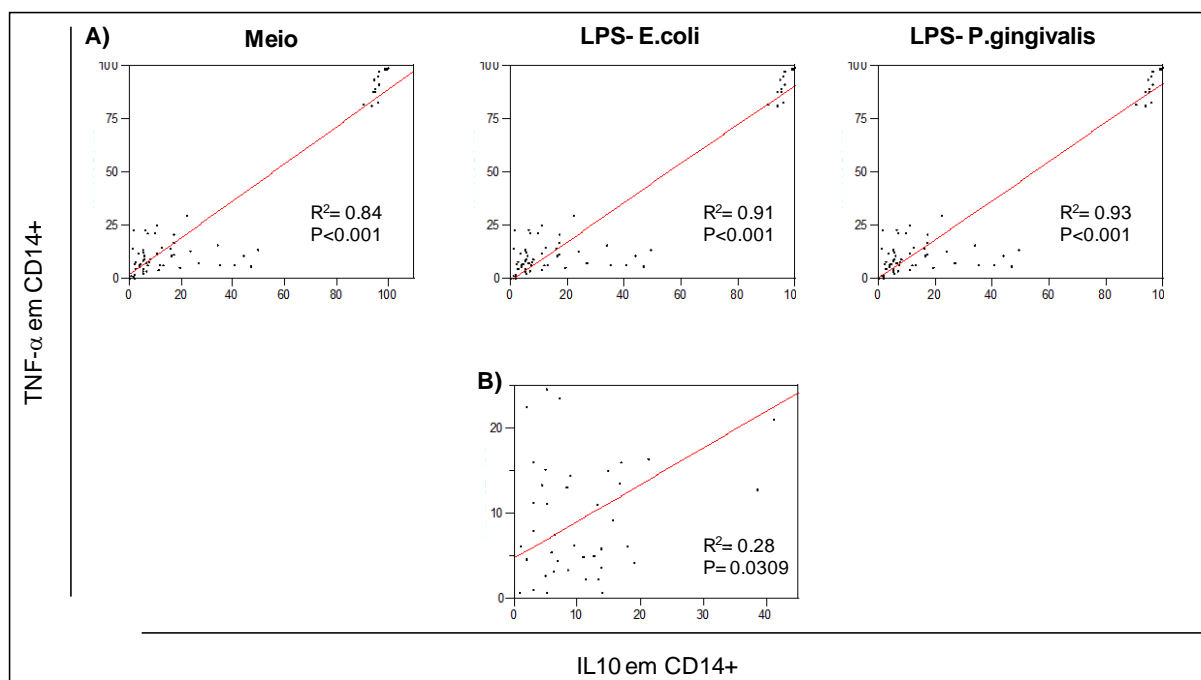


Figura 12: Estudo da correlação entre a expressão de citocinas TNF- α e IL10 expressas por células CD14+ ($p < 0.05$) no grupo C (A) na presença de todas as condições de cultura e PA (B) apenas na presença de LPS- *E.coli*.

4.2.2 - Caracterização fenotípica de linfócitos T CD4+ e CD8+ de indivíduos dos grupos C, PC, PA

Os resultados foram subdivididos em Análise em linfócitos totais e Análise em sub-populações CD4+ e CD8+; conforme previamente explicado em Material e Métodos.

4.2.2.1 - Análise de linfócitos totais

4.2.2.1.1. Avaliação de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69

Os valores de frequência das moléculas de superfície CD28-, CTLA4 e CD69 expressas por linfócitos CD4+ e CD8+, dentro de cada grupo (C, PC e PA) nas diferentes condições de cultura foram compilados na Tabela 8. Os resultados significativos foram a seguir descritos no texto e detalhados nas Figuras 13 e 14.

Tabela 8: Análise de frequência (%) de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as moléculas de superfície CD28-, CTLA4 e CD69, dentro da população de linfócitos totais, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
% CD4+ CD28-	C	2.23 ± 0.41	2.75 ± 0.61	2.91 ± 0.72
	PC	1.90 ± 0.42	2.13 ± 0.45	2.40 ± 0.42
	PA	1.84 ± 0.23	1.76 ± 0.17	1.69 ± 0.21
% CD8+ CD28-	C	17.46 ± 2.04	16.85 ± 1.61	18.16 ± 2.35
	PC	17.87 ± 3.32	12.17 ± 1.46	14.24 ± 1.86
	PA	9.32 ± 1.65	8.87 ± 1.60	10.43 ± 2.35
%CD4+CTLA4+	C	1.25 ± 0.40	1.15 ± 0.43	0.88 ± 0.30
	PC	0.59 ± 0.22	1.08 ± 0.23	0.96 ± 0.24
	PA	0.43 ± 0.07	0.97 ± 0.21	0.91 ± 0.24
%CD8+CTLA4+	C	0.44 ± 0.13	0.78 ± 0.31	0.55 ± 0.21
	PC	0.37 ± 0.15	0.52 ± 0.17	0.32 ± 0.11
	PA	0.21 ± 0.07	0.45 ± 0.21	0.38 ± 0.17
% CD4+ CD69+	C	0.83 ± 0.29	0.96 ± 0.21	0.66 ± 0.12
	PC	0.46 ± 0.13	0.63 ± 0.18	0.52 ± 0.18
	PA	0.49 ± 0.09	0.85 ± 0.22	0.67 ± 0.24
% CD8+ CD69+	C	1.36 ± 0.24	2.55 ± 0.52	1.74 ± 0.36
	PC	1.33 ± 0.78	1.07 ± 0.23	0.92 ± 0.22
	PA	0.48 ± 0.11	1.15 ± 0.35	0.92 ± 0.25

Os valores representados se referem a média e (±) erro padrão.

Para cada condição de cultura, avaliou-se a diferença na frequência das moléculas de superfície supracitadas por células CD4+ e CD8+ entre os grupos C, PC e PA.

Na condição sem estímulo (Meio), uma menor frequência de células CD8+CD28- foi encontrada no grupo PA quando comparado aos grupos C ($p=0.0036^a$, Figura 13 A) e PC ($p=0.0029^e$, Figura 13 A). Menor frequência de células CD8+CD69+ também esteve presente no grupo PA comparado ao C

($p= 0.01$ ^g, Figura 13 B), bem como nos indivíduos D comparados aos ND ($p= 0.0016$ ^k, Figura 13 D).

Considerando-se os estímulos de LPS- *E.coli* e de LPS- *P.gingivalis*, uma maior frequência de células CD8+CD28- foi encontrada no grupo C quando comparado ao grupo PA ($p= 0.0021$ ^b; $p= 0.007$ ^d, Figura 13 A, respectivamente) e quando comparado ao grupo D (PC+PA) ($p= 0.0027$ ^h; $p= 0.0455$ ⁱ, Figura 13 C, respectivamente).

O estímulo de LPS- *E.coli* exerceu grande influência na expressão das moléculas CD28 e CD69 entre os grupos. Maior frequência de células CD8+CD28- foi observada em C comparado com PC ($p= 0.0242$ ^c, Figura 13 A). Por sua vez, PC apresentou maior frequência de células CD8+CD28- comparado com PA ($p= 0.0407$ ^f, Figura 13 A). O grupo ND expressou maior frequência de CD8+CD69+ quando comparado com o grupo D ($p= 0.0146$ ^j, Figura 13 D). Ao compararmos os três grupos, houve diferença na frequência de células CD8+CD28- ($p= 0.0062$) e de CD8+ CD69+ ($p= 0.0495$).

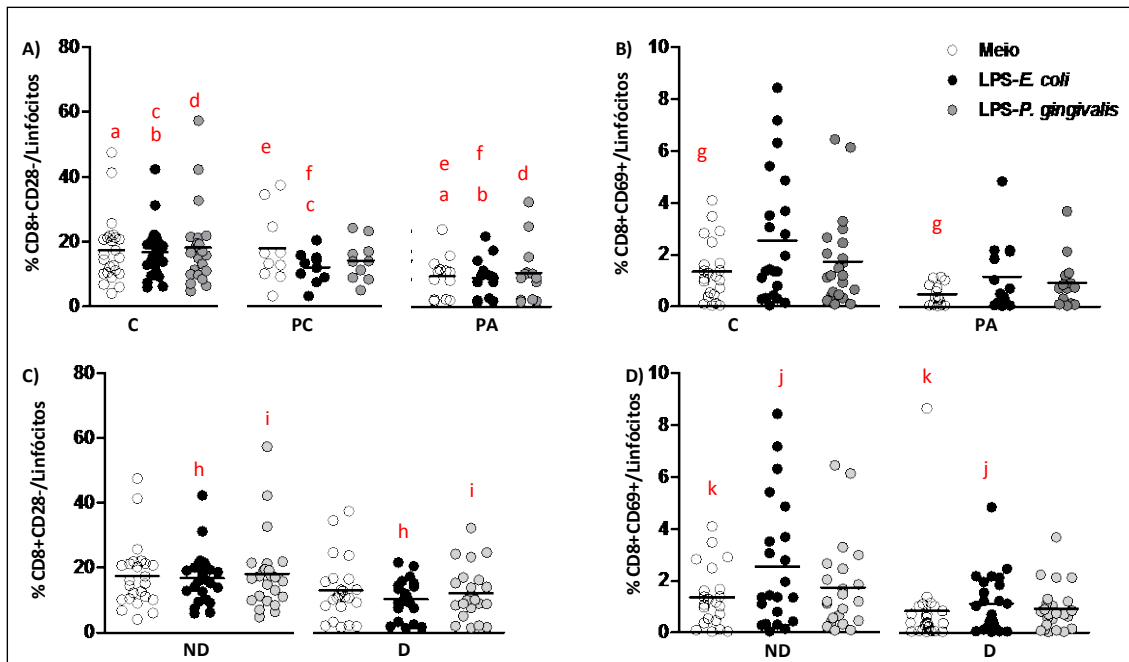


Figura 13: Estudo *in vitro* da % de CD28- e CD69 em células CD8+. Análise de comparação entre as formas clínicas C, PC e PA na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulos (Meio). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p < 0.05$).

Posteriormente, para cada grupo (C, PC e PA) comparou-se a expressão das moléculas entre os diferentes estímulos. No grupo C, embora os estímulos bacterianos sejam capazes de aumentar a frequência de CD8+CD69+, sua maior percentagem esteve presente sob estímulo de LPS- *E.coli* quando comparado a LPS- *P.gingivalis* ($p = 0.0122^a$, Figura 14 A).

No grupo PC, uma menor frequência destas células CD8+CTLA4+ foi observado sob estímulo de LPS- *P.gingivalis* quando comparado com LPS- *E.coli* ($p = 0.0488^c$, Figura 14 B).

Nos indivíduos do grupo PA, o LPS- *P.gingivalis* induziu aumento na frequência de células CD4+CTLA4+ e CD8+CD69+ comparados ao Meio ($p = 0.0295^f$, Figura 14 E, e $p = 0.0394^b$, Figura 14 A, respectivamente).

No grupo D, LPS- *P.gingivalis* aumentou a frequência de células CD4+CTLA4+ comparado com Meio ($p=0.0212^e$, Figura 10 D). Além disso, LPS- *E.coli* induziu uma maior frequência de células CD4+CD69+ comparado com LPS- *P. gingivalis* ($p= 0.0357^d$, Figura 10 C).

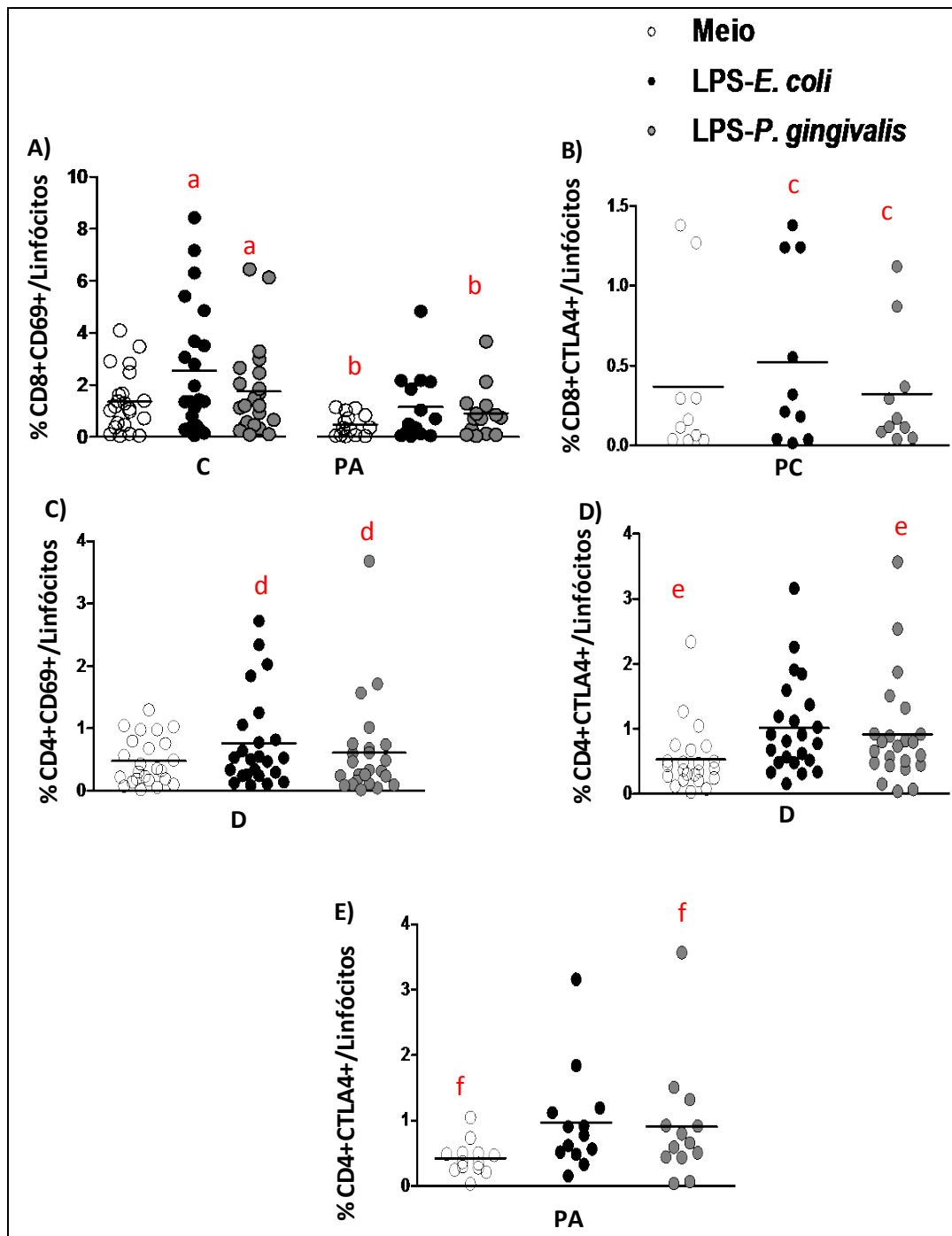


Figura 14: Estudo *in vitro* da % de células CD4+ e CD8+ co-expressando CD69 e CTLA4. Análise da influência do estímulo periodontopatogênico, LPS- *P. gingivalis*, levando-se em conta cada forma clínica estudada (C, PC e PA). Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p < 0.05$).

4.2.2.1.2 - Avaliação de linfócitos CD4+ e CD8+ co-expressando as citocinas TNF- α , IL10 e IFN- γ

Os valores de frequência de cada citocina supracitada expressa por linfócitos CD4+ e CD8+, dentro de cada grupo (C, PC e PA) e sob a influência das diferentes culturas foram compilados na Tabela 9. Os resultados significativos foram a seguir descritos no texto e detalhados na Figura 15.

Tabela 9: Análise de frequência (%) de células CD4+ e CD8+ co-expressando TNF- α , IL10 e IFN- γ por linfócitos totais, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
%CD4+TNF- α +	C	0.37 \pm 0.07	0.25 \pm 0.05	0.30 \pm 0.07
	PC	0.35 \pm 0.09	0.28 \pm 0.07	0.31 \pm 0.07
	PA	0.31 \pm 0.09	0.30 \pm 0.1	0.33 \pm 0.13
%CD4+IL10+	C	0.37 \pm 0.08	0.44 \pm 0.08	0.31 \pm 0.06
	PC	0.48 \pm 0.13	0.50 \pm 0.15	0.52 \pm 0.18
	PA	0.61 \pm 0.14	0.48 \pm 0.10	0.44 \pm 0.08
%CD4+INF- γ +	C	0.62 \pm 0.18	0.41 \pm 0.11	0.62 \pm 0.22
	PC	0.73 \pm 0.25	0.46 \pm 0.12	0.38 \pm 0.07
	PA	0.35 \pm 0.14	0.51 \pm 0.18	0.37 \pm 0.11
%CD8+IFN- γ +	C	0.26 \pm 0.06	0.21 \pm 0.06	0.20 \pm 0.05
	PC	0.29 \pm 0.07	0.25 \pm 0.05	0.24 \pm 0.05
	PA	0.18 \pm 0.03	0.18 \pm 0.03	0.19 \pm 0.03

Os valores representado se referem a média e (\pm) erro padrão.

Nas comparações entre os diferentes grupos dentro de cada estímulo, nenhum resultado significativo foi observado.

Como próxima estratégia de análise, para cada grupo C, PC e PA avaliou-se a diferença de expressão das citocinas supracitadas por células CD4+ e CD8+ entre os diferentes estímulos.

No grupo C, os estímulos bacterianos exerceram influências distintas sobre as células CD4+IL10+ ($p= 0.0276^a$, Figura 15 A). Enquanto o LPS-*P.gingivalis* diminuiu, o LPS-*E.coli* aumentou a frequência destas células ($p= 0.0149^b$, Figura 15 A).

No grupo PA, LPS-*P.gingivalis* foi capaz de reduzir a frequência das células CD4+IL10+ ($p= 0.0383^c$, Figura 15 A) comparado com Meio. O mesmo pode ser observado no grupo D ($p= 0.032$).

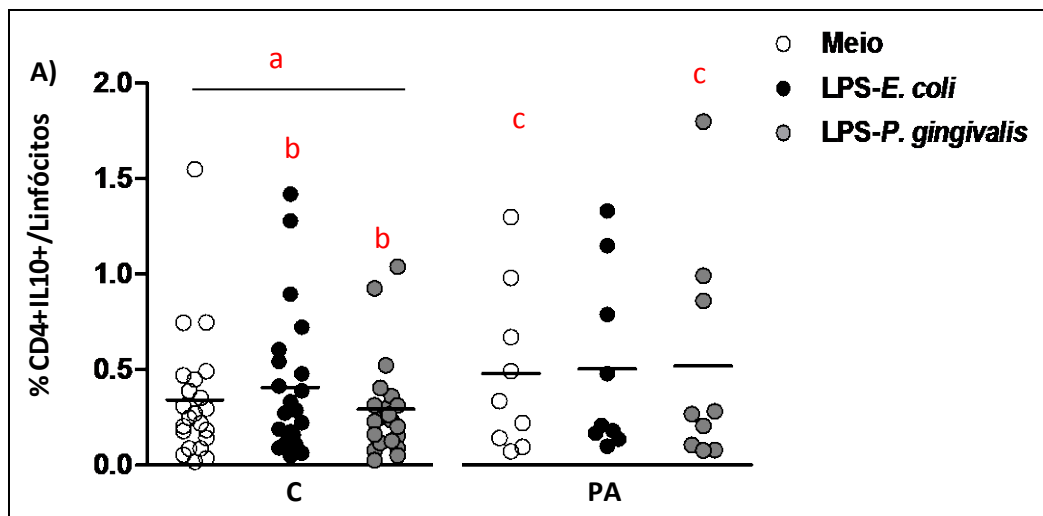


Figura 15: Estudo *in vitro* da % de células CD4+ co-expressando IL10. Análise da influência do estímulo periodontopatogênico, LPS-*P.gingivalis*, dentro de cada forma clínica C e PA. Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p<0.05$).

4.2.2.2 - Análise em sub-população de linfócitos CD4+ e CD8+

4.2.2.2.1 - Avaliação da expressão das moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69 nas sub-populações de linfócitos CD4+ e CD8+

Os valores de frequência e IMF de cada molécula supracitada expressa por cada subtipo de linfócitos CD4+ e CD8+ foram compilados na Tabela 10. Os resultados significativos foram a seguir descritos no texto e detalhados nas Figuras 16 e 17.

Tabela 10: Análise de frequência (%) e Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das moléculas de superfície CD28, CTLA4 e CD69, em linfócitos CD4+ e CD8+, na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
% CD28- em CD4+	C	2.92 (0.63)	3.22 (0.80)	3.89 (0.95)
	PC	2.80 (0.74)	2.38 (0.41)	3.05 (0.72)
	PA	2.09 (0.39)	1.63 (0.34)	1.88 (0.43)
IMF CD28 em CD4+	C	47.69 (6.75)	44.85 (7.06)	49.08 (7.57)
	PC	47.61 (7.80)	54.45 (8.92)	53.97 (8.84)
	PA	64.38 (7.96)	63.64 (7.40)	65.07 (7.84)
% CD28- em CD8+	C	35.09 (3.02)	37.35 (3.05)	35.71 (3.42)
	PC	44.49 (6.70)	43.06 (7.57)	45.11 (7.51)
	PA	36.69 (3.44)	33.38 (2.24)	33.34 (3.23)
IMF CD28 em CD8+	C	21.02 (3.61)	18.45 (2.95)	19.82 (2.96)
	PC	23.36 (4.53)	22.78 (4.02)	20.37 (4.17)
	PA	26.09 (3.02)	25.79 (2.76)	25.72 (3.28)
% CTLA4 em CD4+	C	3.14 (0.76)	3.34 (0.84)	2.78 (0.68)
	PC	17.69 (10.36)	18.01 (10.5)	19.48 (10.84)
	PA	35.92 (12.47)	36.88 (12.31)	36.99 (12.37)
IMF CTLA4 em CD4+	C	3.37 (0.3)	3.51 (0.26)	3.5 (0.27)
	PC	4.27 (0.34)	4.56 (0.43)	4.24 (0.37)
	PA	4.25 (0.27)	4.59 (0.29)	4.68 (0.34)
% CTLA4 em CD8+	C	5.09 (2.23)	5.55 (2.02)	3.67 (1.16)
	PC	3.18 (1.09)	3.51 (1.21)	3.48 (1.33)
	PA	3.34 (0.68)	2.05 (0.52)	2.69 (0.48)

Tabela 16 - Continuação

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
IMF CTLA4 em CD8+	C	3.49 (0.34)	3.63 (0.35)	3.33 (0.29)
	PC	4.3 (0.44)	4.5 (0.37)	4.32 (0.38)
	PA	4.34 (0.29)	4.3 (0.3)	4.24 (0.26)
% CD69+ em CD4+	C	1.36 (0.23)	1.98 (0.31)	1.31 (0.19)
	PC	1.63 (0.55)	1.60 (0.57)	1.31 (0.51)
	PA	1.17 (0.55)	1.90 (0.58)	1.36 (0.37)
IMF CD69 em CD4+	C	3.45 (0.22)	3.52 (0.22)	3.35 (0.18)
	PC	4.00 (0.28)	4.17 (0.32)	4.06 (0.31)
	PA	3.92 (0.25)	4.14 (0.24)	4.01 (0.24)
% CD69+ em CD8+	C	7.10 (1.38)	7.68 (1.18)	7.39 (1.28)
	PC	5.40 (1.38)	5.88 (1.35)	6.02 (1.43)
	PA	4.82 (0.84)	4.45 (0.65)	6.61 (1.33)
IMF CD69 em CD8+	C	5.10 (0.50)	5.49 (0.48)	4.92 (0.33)
	PC	5.75 (0.48)	6.07 (0.47)	5.66 (0.40)
	PA	5.16 (0.38)	5.61 (0.43)	5.54 (0.46)

Os valores representados se referem a média e (\pm) erro padrão.

Considerando-se cada condição de cultura, os dados revelaram que tanto na ausência (Meio) quanto na presença de estímulos (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) o grupo PA apresentou uma maior frequência de células CD4+ expressando CTLA4+ comparado com o grupo C ($p= 0.0031^e$, $p= 0.0023^f$ e $p= 0.002^g$, Figura 16 C). Também foi encontrada diferença quando se avaliou as três formas clínicas ao mesmo tempo, considerando cada condição de cultura separadamente - Meio, LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis* ($p= 0.0134$, $p= 0.0107$ e $p= 0.0097$, respectivamente).

Sob o estímulo de LPS- *P.gingivalis*, comparando as três formas clínicas, foi observada diferença na IMF de CTLA4 dentro da sub-população de células CD4+ ($p= 0.0408$, Figura 16 B). Observou-se maior IMF de CTLA4+

dentro da sub-população CD4+ como da CD8+ nos indivíduos PA ($p= 0.0436^a$, Figura 16 A, e $p= 0.0158^d$, Figura 16 B, respectivamente) e D (PC+PA) ($p= 0.0144$ e $p= 0.0157$, respectivamente Figura 16 A e B) comparados com C. Ainda dentro das células CD4+, LPS- *P. gingivalis* também aumentou IMF de CD69 no grupo D ($p= 0.0162^i$, Figura 16 D) e, no grupo PA ($p= 0.0399$) comparados ao grupo C.

Sob estímulo de LPS- *E.coli*, os grupos PC e PA apresentaram um aumento na IMF de CTLA4 por células CD4+ ($p= 0.0489^c$ e $p= 0.0149^b$, Figura 16 B, respectivamente) comparados com o grupo C. Diferença na IMF de CTLA4+ dentro da sub-população CD4+ entre os grupos também foi observada ($p= 0.0274$). Avaliando os indivíduos quanto à presença da doença periodontal, o grupo D expressou maior IMF de CTLA4 ($p= 0.007$) e CD69 em células CD4+ ($p= 0.0374^h$, Figura 16 D) comparado com os ND.

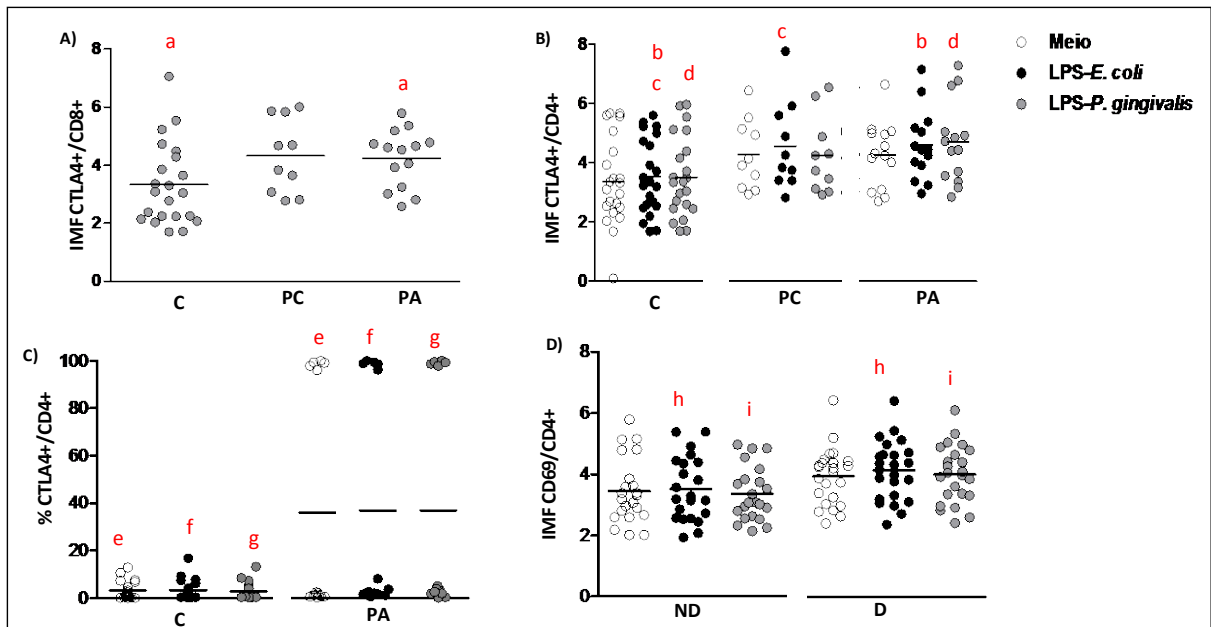


Figura 16: Estudo *in vitro* da % de CD69 e CTLA4 em células CD4+ e CD8+. Análise de comparação entre as formas clínicas C, PC e PA na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulos (Meio). Os resultados significativos estão representados por pares de letras ($p < 0.05$).

Como próxima estratégia de análise, para cada grupo (C, PC e PA) avaliou-se a diferença de expressão das moléculas de superfície supracitadas entre os diferentes estímulos por cada subgrupo de células CD4+ e CD8+.

No grupo C, os estímulos bacterianos diminuíram a IMF de CD28 nas células CD8+ quando comparado com Meio. Essa modulação foi menos intensa sob estímulo de LPS- *P.gingivalis*, embora ainda significativo ($p=0.0233^a$, Figura 17 A). Já nas células CD4+, LPS- *P.gingivalis* aumentou a IMF de CD28, quando comparado a LPS- *E.coli* ($p=0.0276^c$, Figura 17 C). Entre os estímulos bacterianos, LPS- *E.coli* aumentou a IMF de CTLA4 em CD8+ comparado a LPS- *P.gingivalis* ($p=0.0398^b$, Figura 17 B). A frequência de células CD69+ em CD4+ apresentou-se maior sob estímulo de LPS- *E.coli* quando comparado a Meio ($p=0.0181$) e LPS- *P.gingivalis* ($p=0.0102^f$, Figura 17 E). Diferença entre todas as condições de cultura também foi encontrada ($p=0.0309^e$, Figura 17 E).

No grupo PA, sob estímulos bacterianos, a frequência de CTLA4 diminuiu nas células CD8+ e aumentou nas células CD4+. LPS- *E.coli* diminuiu a frequência de CTLA4 em CD8, enquanto LPS- *P.gingivalis* aumentou CTLA4 em CD4+, quando comparados a Meio ($p=0.004^d$, Figura 17 D, e $p=0.0245^g$, Figura 17 F).

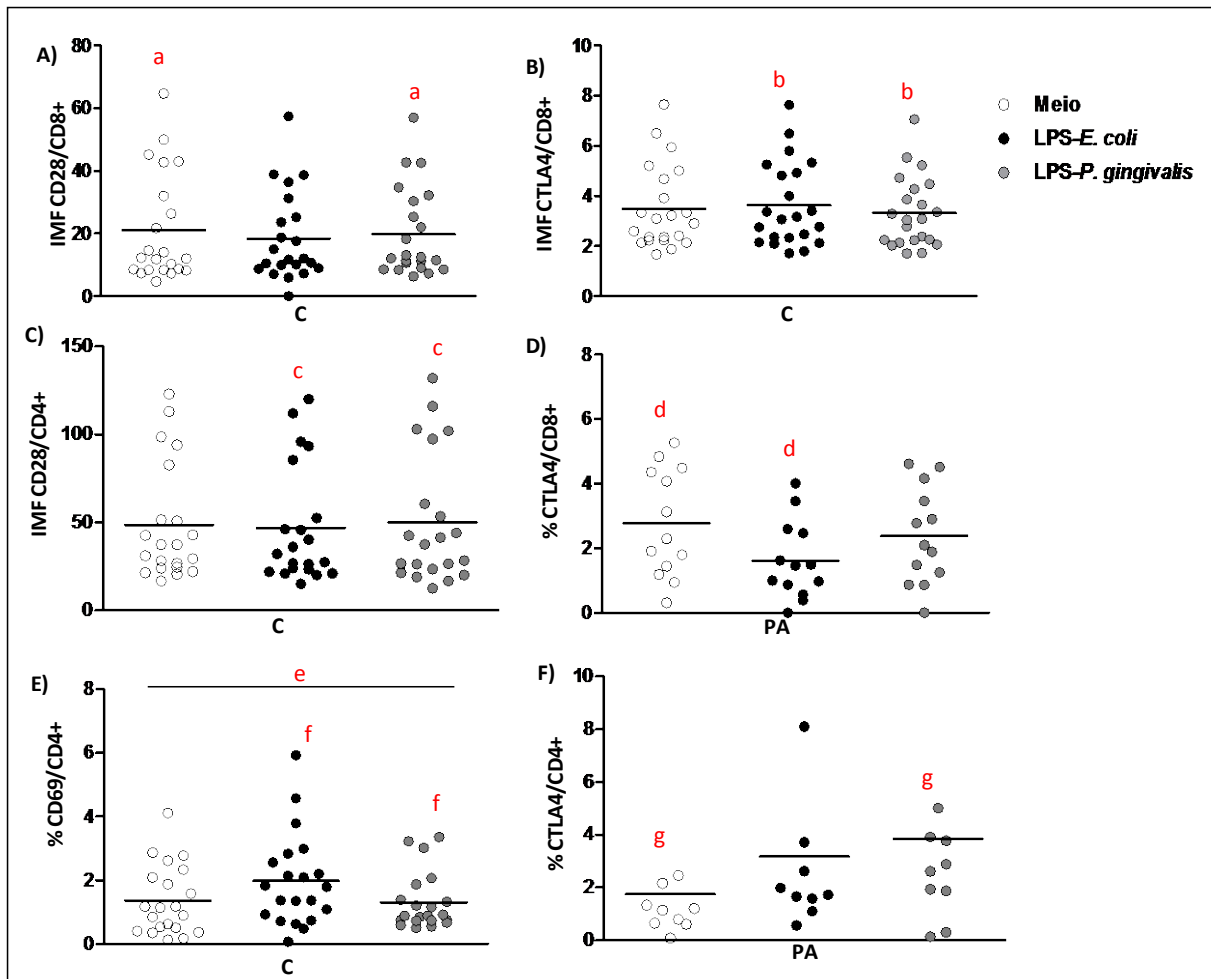


Figura 17: Estudo *in vitro* da % e IMF de CD69, CD28 e CTLA4 em células CD4+ e CD8+. Análise da influência do estímulo periodontopatogênico, LPS- *P.gingivalis*, dentro de cada forma clínica C, PC e PA. Os resultados significativos estão representados por pares de letras ($p < 0.05$).

4.2.2.2.2 - Avaliação da expressão das citocinas TNF- α , IL10 e IFN- γ

considerando cada sub-população de linfócitos CD4+ e CD8+

Os valores de frequência de cada citocina supracitada expressa por cada subtipo de linfócitos CD4+ e CD8+, dentro de cada grupo (C, PC e PA) e sob a influência das diferentes culturas foram compilados na Tabela 11. Os resultados significativos foram descritos a seguir no texto e detalhados nas Figuras 18 e 19.

Tabela 11: Análise de frequência (%) de TNF- α , IL10 e IFN- γ em linfócitos CD4+ e CD8+ na presença (LPS-*P.gingivalis* e LPS- *E.coli*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Frequência	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P.gingivalis</i>
% TNF- α + em CD4+	C	1.50 \pm 0.29	0.91 \pm 0.14	1.24 \pm 0.25
	PC	1.71 \pm 0.42	1.27 \pm 0.25	1.75 \pm 0.35
	PA	1.67 \pm 0.45	1.19 \pm 0.32	1.45 \pm 0.39
% IL10+ em CD4+	C	1.38 \pm 0.25	1.54 \pm 0.28	1.32 \pm 0.24
	PC	1.95 \pm 0.65	1.91 \pm 0.65	2.31 \pm 0.67
	PA	2.06 \pm 0.41	2.56 \pm 0.68	1.64 \pm 0.28
% INF- γ + em CD4+	C	1.51 \pm 0.26	1.24 \pm 0.19	1.35 \pm 0.28
	PC	2.35 \pm 0.65	1.94 \pm 0.40	1.65 \pm 0.43
	PA	1.44 \pm 0.40	2.02 \pm 0.53	1.50 \pm 0.35
% IFN- γ + em CD8+	C	1.97 \pm 0.55	1.57 \pm 0.43	1.58 \pm 0.41
	PC	1.94 \pm 0.45	1.55 \pm 0.48	1.71 \pm 0.48
	PA	1.58 \pm 0.31	1.65 \pm 0.27	2.15 \pm 0.49

Os valores representados se referem a média e (\pm) erro padrão.

Considerando-se a estratégia de análise para cada condição de cultura, avaliou-se a diferença na frequência das moléculas supracitadas, entre os grupos C, PC e PA, em cada sub-população de células CD4+ e CD8+. Nenhum resultado significativo foi encontrado.

Como próxima estratégia de análise, para cada grupo (C, PC e PA) avaliou-se a diferença de expressão das citocinas supracitadas entre diferentes estímulos em cada subgrupo de células CD4+ e CD8+.

No grupo C, o estímulo de LPS- *P.gingivalis* diminuiu a frequência de células IFN- γ + em células CD8+ comparado com Meio ($p= 0.0478^a$, Figura 18 A). No grupo PC, o LPS- *E.coli* provocou uma redução significativa na frequência de expressão de TNF- α dentro da sub-população de células CD4+ comparado a LPS- *P.gingivalis* ($p= 0.0483^b$, Figura 18 B).

No grupo PA, o estímulo de LPS- *P.gingivalis* diminuiu a frequência de células IL10+ na população CD4+ comparado ao Meio ($p= 0.0488^d$, Figura 18 D). LPS- *E.coli* foi capaz de aumentar a frequência de expressão de IFN- γ + por células CD4+ ($p= 0.0369^c$) comparado a LPS- *P.gingivalis*,

No grupo D, houve uma maior frequência de expressão de IFN- γ + dentro da sub-população CD4+, sob estímulo de LPS- *E.coli* do que LPS- *P. gingivalis* ($p= 0.0191$).

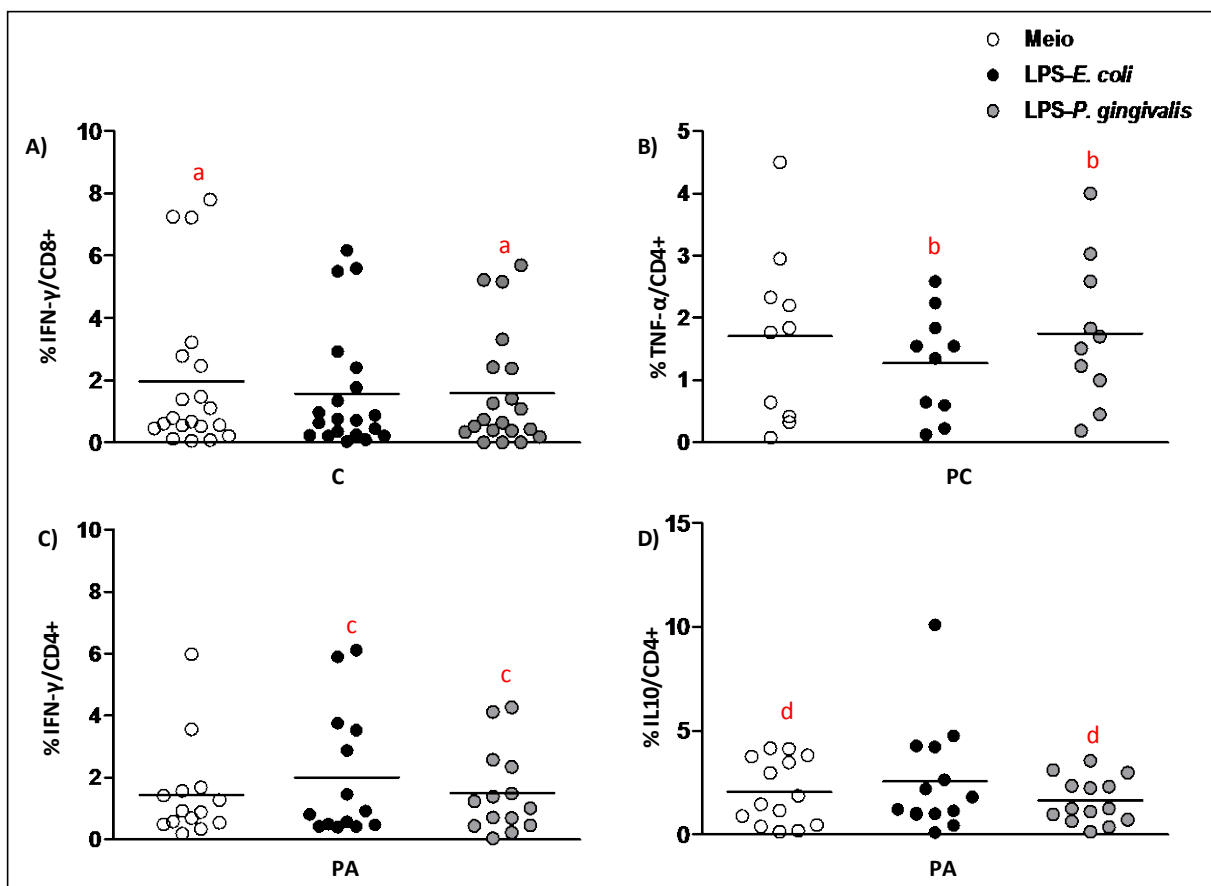


Figura 18: Estudo *in vitro* da % de TNF- α , IFN- γ e IL10 em células CD4+ e CD8+. Análise da influência de diferentes estímulos dentro de cada forma clínica C, PC e PA. Os resultados significativos foram representados por pares de letras ($p < 0.05$).

Com o objetivo de avaliar o balanço entre linfócitos expressando moléculas de superfície relacionadas com ativação e modulação, bem como citocina pró-inflamatória e moduladora, foi feita análise da razão de células expressando CD28-/CTLA4, TNF- α /IL10 e IFN- γ /IL10. Os valores das razões estão representados na Tabela 12.

Tabela 12: Análise da razão entre as frequências (%) de células CD8+CD28-/CD8+CTLA4+, CD4+CD28-/CD4+CTLA4+, CD4+TNF- α /CD4+IL10+, CD4+IFN- γ /CD4+IL10+ na presença (LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis*) e ausência de estímulo (Meio), nas formas clínicas C (Controle), PC (Periodontite Crônica) e PA (Periodontite Agressiva).

Razão	Forma Clínica	Meio	LPS- <i>E.coli</i>	LPS- <i>P. gingivalis</i>
% CD28-/CTLA4+ em CD8+	C	26.79 \pm 6.64	40.36 \pm 12.79	36.03 \pm 18.16
	PC	28.68 \pm 10.4	45.37 \pm 20.12	31.48 \pm 9.02
	PA	25.18 \pm 11.48	27.13 \pm 5.59	19.61 \pm 4.77
% CD28-/CTLA4+ em CD4+	C	10.54 \pm 7.25	3.41 \pm 1.12	3.78 \pm 1.06
	PC	6.73 \pm 3.1	3.88 \pm 2.41	4.39 \pm 2.59
	PA	5.2 \pm 2.01	1.24 \pm 0.41	3.63 \pm 1.86
% TNF- α /IL10+ em CD4+	C	1.47 \pm 0.29	0.84 \pm 0.15	1.16 \pm 0.23
	PC	2.65 \pm 1.38	0.97 \pm 0.19	1.5 \pm 0.5
	PA	1.23 \pm 0.35	0.61 \pm 0.11	1.0 \pm 0.28
% IFN- γ /IL10+ em CD4+	C	1.93 \pm 0.42	1.37 \pm 0.27	1.52 \pm 0.25
	PC	4.83 \pm 2.54	2.58 \pm 0.93	2.27 \pm 0.94
	PA	1.63 \pm 0.68	1.41 \pm 0.44	1.28 \pm 0.31

Os valores representado se referem a média e (\pm) erro padrão.

O estudo das razões entre moléculas de superfície e citocinas expressas por células CD8+ e CD4+ não mostrou diferença significativa entre as formas clínicas nem entre os estímulos.

Para avaliar o grau de associação entre as citocinas IL10, TNF- α e IFN- γ nas células CD4+ e CD8+ foi feita análise de correlação. Esta parte do estudo também levou em conta a presença e ausência de estímulos bacterianos relacionados ou não com a doença periodontal (Figura 19).

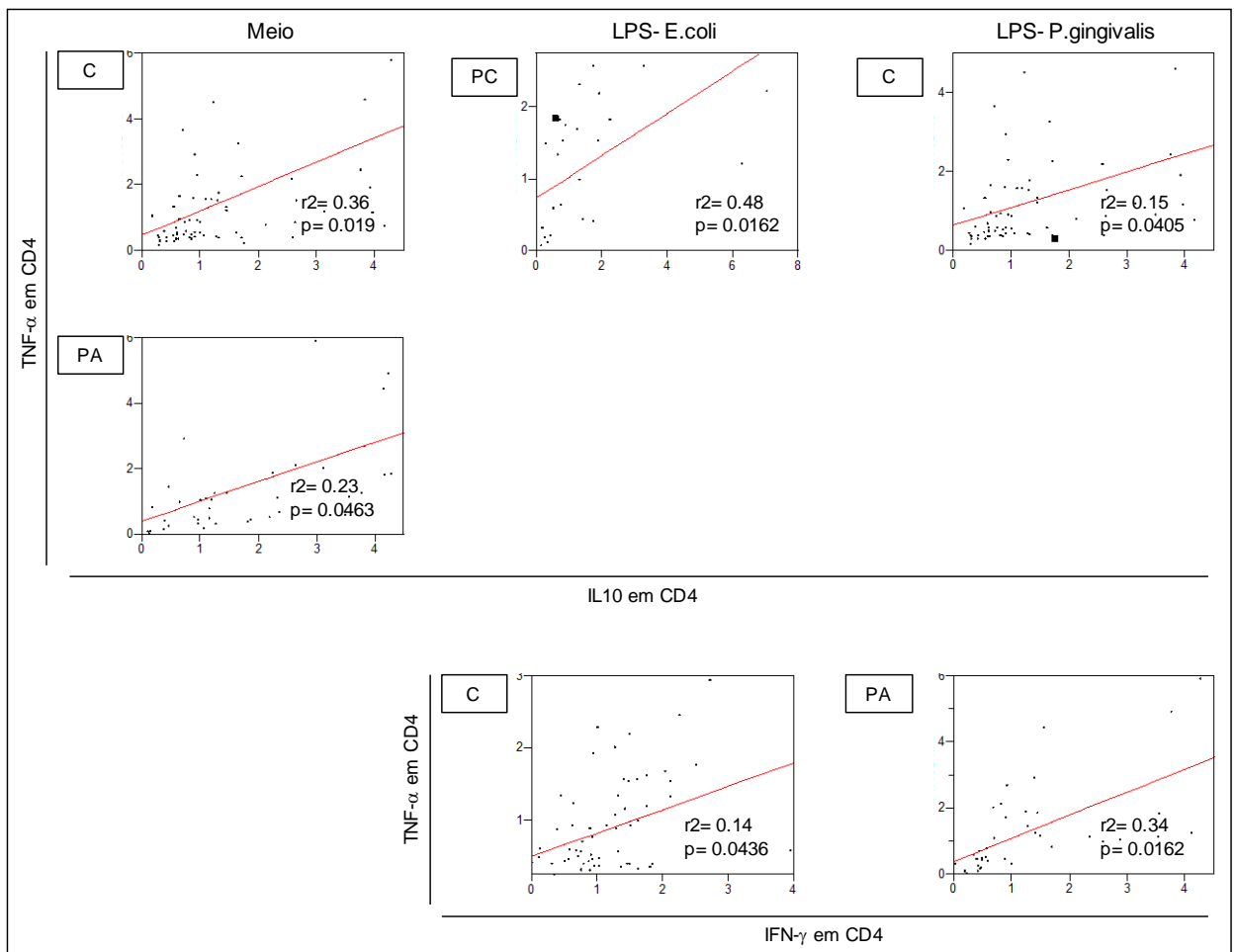


Figura 19: Estudo da correlação entre as células CD4+ expressando as citocinas IL10, TNF- α e IFN- γ nos grupos C, PC e PA, na presença de diferentes condições de cultura.

Correlação positiva entre células TNF- α + e IL10+ expressas pelo subtipo celular CD4+ pôde ser observada no grupo C em Meio e LPS- *P.gingivalis*, no grupo PC, apenas sob estímulo de LPS- *E.coli* e em PA na condição Meio. Correlação positiva entre TNF- α e IFN- γ pôde ser encontrada nos grupos C e PA, nas condições LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis* respectivamente (Figura 19).

5.0 – DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença infecciosa-inflamatória, de etiologia multifatorial, caracterizada pela destruição das estruturas de suporte e proteção do órgão dental, podendo levar a perda deste órgão. Embora as bactérias Gram-negativas específicas, sejam fundamentais para o início e progressão da doença periodontal (HELLER et al., 2012), estes fatores sozinhos não são capazes de explicar diferenças interpessoais no desenvolvimento e curso da doença (BEHFARNIA et al., 2010).

Fatores relacionados ao hospedeiro, como os genéticos e a natureza da resposta imunológica, têm sido identificados como importantes na determinação do desenvolvimento e consequências da doença periodontal (ALAYAN et al., 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Vários modelos de estudos em animais e humanos tentam desvendar os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite, determinando importantes papéis de diferentes tipos celulares (GEMMELL, YAMAZAKI & SEYMOUR, 2007; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009).

Os primeiros trabalhos avaliando células de Langerhans no tecido gengival da bolsa periodontal mostraram que essas células possivelmente exerciam importante papel de apresentação de antígeno no local da inflamação, já que expressavam HLA-DR (NUNES et al., 1994; MATSUYAMA et al., 2005).

Embora Stein (2008), num estudo de meta-análise, relata vários trabalhos mostrando associação de HLA-DR com a doença periodontal crônica e agressiva, nossos resultados não mostraram diferença na IMF de HLA-DR por células CD14+ do sangue periférico entre portadores de periodontite comparados ao controle, e nem entre as distintas formas clínicas da doença. Também não houve diferença na IMF de HLA-DR quando as células foram submetidas a estímulos de LPS de *P.gingivalis* e *E.coli*. No entanto a literatura mostra que outros estímulos bacterianos (super-antígenos) são capazes de se ligar diretamente a estrutura externa de HLA-DR aumentando sua expressão na superfície celular (MATSUYAMA et al., 2005).

Outras moléculas de membrana importantes para uma ótima ativação celular, expressas por monócitos, são as co-estimuladoras CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2). Nossos resultados mostraram um perfil predominante de células CD14+ expressando CD86 em todas as formas clínicas e sob todas as condições de cultura. Enquanto nos grupos C, PC e PA a maior frequência de CD14+CD80+ foi de 59.32%, 62.12% e 68.16%, respectivamente, a menor frequência de CD14+CD86+ foi de 96.2%, 92.77% e 95.09%, respectivamente. No tecido gengival humano com periodontite, Gemmell (2007) também encontrou uma maior percentagem de macrófagos e células B expressando CD86+ do que CD80+.

CD86 é constitutivamente expresso na superfície de células APCs, enquanto a expressão de CD80 é induzida (BHATIA et al., 2006), o que fundamenta nossos achados. Além disso, CD86 é rapidamente estimulada e

regulada pela ligação com CD28; enquanto CD80 tem indução lenta, porém, mais prolongada do que CD86 (BHATIA et al., 2006).

Os resultados obtidos mostraram que o estímulo periodontopatogênico LPS-*P. gingivalis* foi capaz de aumentar a frequência de células CD80 nos grupos C e PC, bem como IMF nos grupos PC e PA quando comparado ao Meio. CD80 ao se ligar a CD28 desencadeia uma resposta pró-inflamatória (GEMMELL et al., 2001; BHATIA et al., 2006). A resposta pró-inflamatória é caracterizada pela expressão e produção de moléculas como TNF- α , IFN- γ , IL6 e IL1 já descritas na doença periodontal. Assim, segundo nossos resultados e demais relatos na literatura, pode-se sugerir que LPS- *P.gingivalis* esteja favorecendo para uma resposta pró-inflamatória em PA pela indução da molécula CD80.

No entanto, curiosamente, nossos achados revelam que LPS-*P.gingivalis* diminuiu a IMF de CD86 quando comparado a Meio (em todas as formas clínicas). Assim, é possível pensar que há um mecanismo de modulação bacteriana sobre a expressão de CD86. Gemmell (2007) sugere que o comprometimento na função de apresentação de antígeno induzida por *P.gingivalis* na periodontite, possa estar relacionada com a regulação da expressão do gene de CD86 (GEMMELL, YAMAZAKI & SEYMOR, 2007).

Mesmo que tenhamos encontrado resultados que reforçam um possível papel modulador de *P.gingivalis* sobre CD86, o valor da sua IMF ainda esteve significativamente maior na forma clínica PA do que C (em todas as condições de cultura). Assim os resultados sugerem um possível papel de CD86 no

estabelecimento da resposta imunológica em PA. A literatura menciona sobre a promoção de CD86 para resposta antiinflamatória, o que pôde ser confirmado pelos nossos resultados de razão CD14+IL10/TNF- α , cujos valores foram superiores a 1, indicando o predomínio de células CD14+IL10+ coerente como uma maior frequência de CD14+CD86.

Embora nosso trabalho tenha focado na análise de expressão de HLA-DR e CD86 apenas por células CD14+, a literatura mostra que células T de memória também são capazes de expressar tais moléculas (GEMMELL et al., 2007). Assim as APCs tradicionais podem contar com células T de memória como colaboradoras na apresentação de antígenos e co-estimulação de células T *naive* do sangue periférico.

Os linfócitos recebem grande destaque no estudo imunopatológico da periodontite, já que correspondem à grande massa celular envolvida na resposta imune adaptativa (BERGLUNGH & DONATI, 2005; HADDAD, WILENSKY & SHAPIRA, 2007; OHLRICH EJ, CULLINAN MP & SEYMOUR GJ, 2009; GONZALES et al., 2011).

Considerando toda a população de linfócitos, a frequência de células CD8+CD69+, na ausência de estímulo, e de CD8+CD28-, tanto na ausência quanto na presença de LPS- *P.gingivalis* e LPS- *E.coli*, estiveram diminuídas no grupo PA comparadas ao C e ao PC. Este resultado pode estar relacionado ao processo de cronificação da doença, que é mais evidente em PC do que PA. No entanto, nosso resultado de PA versus C contradiz a literatura, que mostra que a perda de CD28 e presença de CD69, nas células de humanos,

são consequências de ativação por estimulação antigênica (RIHA & RUDD, 2010; STRIOGA, PASUKONIENE & CHARACIEJUS, 2011). Mas, pode se pensar, talvez, em um relativo prejuízo na expressão de CD69 por célula CD8+ nos indivíduos PA comparados a C.

Levando-se em conta a influência dos estímulos em cada forma clínica, LPS- *P.gingivalis* foi capaz de aumentar a frequência de CD8+CD69+ no grupo PA comparado ao Meio. Desta forma, mesmo que PA expresse menos CD8+CD69+ do que as outras formas clínicas, suas células são capazes de responder ao estímulo periodontopatogênico LPS- *P.gingivalis* aumentando significativamente a frequência de CD8+CD69+. Segundo a literatura, o aumento de CD8+CD69+ corresponderia a uma elevação no perfil citolítico das células CD8+ permitindo participação na lise de tecido e células infectadas ou danificadas pela bactéria periodontopatogênica (GEMMELL et al., 2007).

LPS- *P.gingivalis* também foi capaz de aumentar a expressão tanto de CD4+CTLA4+ quanto CD14+CD80+, comparados ao Meio, no grupo PA. Uma vez que CD80 tem maior avidéz de ligação a CTLA4 do que CD28 pode ser que o estímulo LPS- *P.gingivalis* induza a modulação da resposta imune no processo de segundo sinal de ativação celular, através do aumento de CD80 e CTLA4, na tentativa de conter a resposta do hospedeiro.

Sabe-se que células T CD4+ que apresentam papel supressor, chamadas de Treg, expressam grande quantidade de CD25 e CTLA4 na sua superfície e FOXP3 como fator de transcrição (NAKAJIMA et al., 2005; GARLET et al., 2010). Estas células correspondem a 5-15% da população de

células T CD4+ no sangue periférico e estímulo de *P.gingivalis* é capaz de aumentar a expressão de CTLA4 e CD25 nesta população celular (T CD4+CD25+FOXP3+) (NAKAJIMA et al., 2005; AOYAGI et al., 2000). Embora em nosso trabalho não tenha sido feita a caracterização das células Treg na doença periodontal, os achados referentes ao aumento de CD4+CTLA4+ frente a estímulo de *P.gingivalis* foram coerentes com a literatura (NAKAJIMA et al., 2005; AOYAGI et al., 2000) .

As células Treg também estão presentes no tecido gengival de indivíduos com periodontite crônica, e sua frequência aumenta junto com o aumento de células B no infiltrado inflamatório (NAKAJIMA et al., 2005). Trabalhos sugerem que as células Treg estejam responsáveis por controlar a resposta imune aos agentes bacterianos na cavidadeboca e que elas podem estar envolvidos com o papel protetor para a destruição tecidual na periodontite (NAKAJIMA et al., 2005; GARLET et al., 2010).

Acredita-se que as células Treg podem agir de forma direta através do contato célula-célula mediada por CTLA4 e TGF-b na superfície celular, ou de forma indireta pela liberação de TGF-b e IL10 (SHEVACH, 2009). Estudo feito com modelo de periodontite em camundongo mostra correlação positiva entre expressão de IL10 e CTLA4 com a quantidade de células CD4+FOXP3+. Além disso, estas células são capazes de migrar para o tecido periodontal após estimulação por *A.actinomycetemcomitans*, mostrando papel imunorregulador na lesão periodontal (GARLET et al., 2010).

Avaliando apenas os indivíduos PA, pudemos observar que LPS-*P.gingivalis* aumentou a frequência e IMF de CD4+CTLA4+ e diminuiu a frequência de CD4+IL10+, quando comparado ao Meio. Ou seja, LPS-*P.gingivalis* diminuiu a ativação pelo aumento de CTLA4, conseqüentemente reduziu a produção de IL10.

Considerando nossa análise apenas em cada subgrupo de linfócitos CD4+ e CD8+, foi possível observar na ausência e presença de estímulos uma maior frequência de células CD4+ expressando CTLA4+ nos grupos PA e D (PC + PA) comparado ao C. Este achado está de acordo com a literatura, que mostra alta frequência de células imunossupressoras CD4+ expressando CTLA4+ em doenças autoimunes, bem como em lesões de periodontite (NAKAJIMA et al., 2005). Além disso, LPS-*P.gingivalis* e LPS-*E.coli* aumentaram a intensidade de fluorescência de CD69 nas células CD4+ no grupo doente comparado ao Controle.

A ação de células supressoras na periodontite pode ter efeito como tentativa de controle da resposta inflamatória com o objetivo de estabelecer homeostasia, bem como ação supressora direta sobre subtipos celulares agravando a resposta inflamatória no local. O papel das células supressoras Treg (CD4+CD25+FOXP3+) e CD4+CTLA4+ ainda não está bem definido na doença periodontal (GARLET et al., 2010).

Nossos resultados de razão da frequência CD28-/CTLA4+, expressos por células CD4+, mostraram uma tendência de redução no perfil de ativação celular na presença de estímulo periodontopatogênico comparado ao Meio em

toda população (C, PC e PA). Por estes resultados, embora não se tenha encontrado diferença estatística entre os grupos e condições de cultura, foi possível notar que na ausência de estímulos o grupo PA parece tender para um perfil de células CD4+ mais modulador comparado ao C.

Respostas celulares e humorais contra auto-antígenos tem sido observadas em lesões de periodontite, como por exemplo, a expressão de hsp60 (self-heat-shock protein 60) e anticorpos contra colágeno tipo I (HONDA et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2005). Honda et al. (2006) além de encontrar maior expressão de mRNA de hsp60 do que IL1b na periodontite, encontrou grande expressão de mRNA de TGF- β , principal mediador da expressão de FOXP3 em células CD4+CD25+CTLA4+ (possíveis Treg), em indivíduos com a doença. Assim a literatura sugere evidências de resposta autoimune na periodontite, propondo que o balanço entre diferentes subtipos celulares e seus produtos possa resultar em diferentes expressões da doença (HONDA et al., 2006).

Neste sentido, o balanço na produção de citocinas em resposta à infecção é necessário para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada. IFN- γ , por exemplo, é capaz de aumentar a atividade fagocítica por neutrófilos e macrófagos, contendo a infecção. Nossos resultados não mostraram diferença na frequência de IFN γ + por células CD8+ entre doentes e não doentes no estado basal. Contudo, o LPS- *P.gingivalis* foi capaz de reduzir a frequência de IFN- γ + por células CD8+ no grupo Controle. Pode-se sugerir uma possível ação moduladora de LPS- *P.gingivalis* sobre a expressão de IFN- γ por células CD8+, com intuito de inibir o potencial citolítico de células da

resposta adaptativa. Para explicar este resultado podemos pensar em várias hipóteses como a presença de fatores genéticos relacionados ao bloqueio do sinal de *P.gingivalis* responsáveis pela diminuição de expressão de IFN- γ .

Na doença periodontal, o papel de IFN- γ ainda não está bem definido. Sabe-se que é uma citocina produzida por células Th1 e que é capaz de induzir a produção de PGE2, IL1b e TNF- α , por macrófagos, favorecendo um perfil pró-inflamatório. Ao mesmo tempo interfere no sinal RANK-RANKL, inibindo a osteoclastogênese (HONDA et al., 2006).

Behfarnia et al. (2010) mostrou uma correlação negativa entre IFN- γ e periodontite; resultado que contradiz trabalho de Honda (2006). Behfarnia et al. (2010) encontrou, em tecido gengival de periodontite crônica, redução dos níveis de expressão de IFN- γ e IL4 e aumento de IL17A, comparado ao tecido sem periodontite. Estudos imunohistológicos mostram que as lesões de periodontite crônica se caracterizam por um aumento na proporção de células B, sugerindo uma forte participação de células Th2 e suas citocinas (GEMMEL, YAMAZAKI & SEYMOUR, 2002; OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009) quando comparado ao Controle.

Trabalhos têm mostrado que LPS- *P.gingivalis* é capaz de se ligar ao receptor TLR2 desencadeando uma resposta Th2, o que fundamenta nossos resultados de aumento de CD4+IL10+ (em linfócitos totais) na presença de LPS- *P.gingivalis* comparado a Meio, no grupo PC (MAHANONDA R & PICHYANGKUL S, 2007; GAFFEN SL & HAJISHENGALLIS G, 2008). Ohlrich (2009) relata que é possível que uma co-infecção bacteriana module a resposta

imune, devendo ser avaliado o balanço Th1/Th2. Importante pensar que a ação de células imunossupressoras como CD4+IL10+ e CD4+CTLA4+ podem interferir na modulação de outros subtipos celulares, dificultando para uma resposta resolutive da infecção/inflamação.

Em um estudo com cultura de células de tecido gengival de portadores de periodontite, Moutsopoulos et al. (2012) não observou diferença na expressão de IL12 entre indivíduos com gengivite e periodontite. Mas PBMC de indivíduos saudáveis, sob estímulo de *P.gingivalis* (ATCC 33277), foi capaz de aumentar o nível de expressão do RNA mensageiro de IL12p40. A IL12 é uma citocina formada por duas subunidades IL12p35 e IL12p40, produzida por APCs, reconhecida como importante citocina na diferenciação de células CD4 em Th1 produtora de IFN- γ .

LPS- *E.coli* é capaz de se ligar e ativar TLR4 e induzir uma resposta Th1, enquanto LPS- *P.gingivalis* se liga e ativa TLR2 induzindo resposta Th2 (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Quando ativado, TLR4 induz a expressão de IL12p70 e IP10 (proteína indutora de IFN- γ), caracterizando uma resposta Th1. Por outro lado, TLR2 inibe IL12p40 (proteína importante na mediação da resposta IL12 - Th1), mostrando um perfil característico de células Th2 (OHLRICH, CULLINAN & SEYMOUR, 2009). Comparando os possíveis efeitos entre os diferentes estímulos em nosso trabalho, LPS- *E.coli* aumentou a frequência de células IFN- γ + por células CD4+ no grupo PA enquanto reduziu a frequência TNF- α por CD4+ no grupo PC comparado a LPS- *P.gingivalis*. Sobre as células CD14 LPS- *E.coli* aumentou a expressão de TNF- α no grupo C, bem como de IL10 nos grupos C, PC e PA, comparado a LPS- *P.gingivalis*.

Estes resultados mostram uma significativa diferença da resposta celular frente aos estímulos bacterianos.

As células Th17 e seus produtos também tem recebido importante destaque na resposta imune a danos teciduais na periodontite. Moutsopoulos et al. (2012) mostrou que indivíduos PA apresentam maiores níveis de IL17A no soro e no tecido gengival (produzido por macrófagos), comparado a indivíduos com gengivite. A literatura destaca que IL17A exibe uma atividade pleiotrópica já que está envolvida na mediação da inflamação (MMP-1, MMP-3, IL1b e TNF- α) e na indução da osteoclastogênese (RANKL), bem como na estabilização da homeostasia e integridade tecidual (KAWAGUCHI et al., 2001; SATO et al., 2006; KONERMANN et al., 2012). No epitélio ela é capaz de aumentar a produção de claudinas na zona de oclusão, formando uma ultra-estrutura entre as células do epitélio, impedindo a passagem de microrganismos (CUA & TATO, 2010). Induz a liberação de defensinas, proteínas regeneradoras (REG), S100, lipocainas a lactoferrinas (importantes antimicrobianos), quimiocinas (IL8 e MIP-2) e fatores granulopoiéticos como G-CSF e CCL2, que seletivamente recrutam neutrófilos para a área de mucosa, fazendo com que efetivamente eliminem os agentes infecciosos (KAWAGUCHI et al., 2001; MARTINEZ et al., 2008; CUA & TATO, 2010).

Coerente com este papel protetor relatado pela literatura, nossos resultados mostraram maior frequência de células CD4+ expressando IL17A+ no sangue periférico de indivíduos C comparados aos doentes. Esta diferença ainda esteve maior na presença de LPS- *E.coli*, o que também pôde ser observado por Cua & Tato (2010).

Modelos em ratos têm mostrado que deficiência em IL17A leva a uma alta expressão de genes codificadores de moléculas associadas a resposta Th1 (O'CONNOR, ZENEWICZ & FLAVELL, 2010). O interessante é que embora IL17A possa induzir a produção de IL12 por células mieloides favorecendo para uma resposta Th1, ela também é capaz de regular negativamente a resposta Th1 por suprimir a expressão de T-bet (AWASTHI & KUCHROO, 2009), osteopontina e o receptor IL12Rb2 (moléculas importantes na coordenação do desenvolvimento de Th1).

Importante destacar que a expressão dos diversos mediadores inflamatórios pode ser influenciada por fatores de risco genéticos e seu variado perfil funcional sobre diferentes grupos étnicos, o que muitas vezes justifica diferentes resultados na literatura (LOSS, JOHN & LAINE, 2005; MOREIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; GONZALES et al., 2007; LAINE, LOSS & CRIELAARD, 2010).

Em relação ao estudo genotípico, os dados obtidos foram discutidos nos artigos (ANEXO I e II). Contudo alguns pontos relevantes serão abordados nesta seção. A escolha dos polimorfismos avaliados se baseou em estudo de artigos que mostraram a importância dos SNPs rs763780 (*IL17A*), rs2275913 (*IL17F*), rs11209026 (*IL23R*), rs3771300 (*STAT1*), rs7574865 (*STAT4*) e rs721412 (*NFkB1*) como fatores de risco para diferentes doenças.

Como dito anteriormente, muito se tem investigado sobre o papel das células Th17 e suas citocinas na periodontite (TAKAHASHI et al., 2011; MOUTSOPOULOS et al., 2012; KONERMANN et al., 2012). Embora o eixo

IL17/IL23 seja chave no desenvolvimento de inflamações crônicas e defesa do hospedeiro a infecções bacterianas, até agora nada se sabe sobre polimorfismos relacionados a estas citocinas na doença periodontal.

No atual trabalho não foi encontrada associação dos polimorfismos de *IL17F* (rs763780) e *IL23R* (rs11209026) com a doença periodontal. Com relação ao polimorfismo rs763780 de *IL17F*, os resultados encontrados reforçam a baixa frequência deste polimorfismo, o que já foi observado em outras populações (PARADOWSKA et al., 2010). No polimorfismo de *IL23R* (rs11209026), a baixa frequência do genótipo AA observada em nosso trabalho corrobora com os dados observados em indivíduos europeus portadores de doença imune mediada (DI MEGLIO et al., 2011). Os resultados obtidos demonstram que as frequências dos polimorfismos *IL17F* (rs763780) e *IL23R* (rs11209026) em nossa população de estudo foram similares a outras populações.

No estudo de *IL17A* (rs2275913) foi observado que o alelo polimórfico “A”, associado com alta produção da proteína, estava mais frequente no grupo C do que em PA e PC. Adicionalmente, foi verificado que indivíduos com PA apresentaram menor frequência de células CD4+ expressando IL17A+, sob estímulo bacteriano, quando comparados aos do grupo C. Em conjunto, nossos dados sugerem a hipótese que *IL17A* tem papel protetor para PA, uma vez que os indivíduos que apresentaram genótipo A+ não desenvolveram a doença.

Com o objetivo de avaliar o desequilíbrio de ligação entre rs763780 (*IL17F*) e rs2275913 (*IL17A*) na doença periodontal, foi realizado um estudo de

haplótipo entre estes SNPs. Embora não tenhamos encontrado resultado significativo, é importante ressaltar que este é o primeiro trabalho que avalia desequilíbrio de ligação entre estes SNP na doença periodontal.

Uma vez que a resposta imune requer indução e ativação de fatores de transcrição intracelulares para iniciar a transcrição de um gene, foram avaliados os SNPs nas vias de sinalização STAT1, STAT4 e NFkB, na doença periodontal. Os genes escolhidos já foram descritos na literatura como importantes fatores de risco para várias doenças imune mediadas (REMMERS et al., 2007; PALOMINO-MORALES et al., 2008; KAWASAKI et al., 2008; KORMAN et al., 2008; GLAS et al., 2010; LEE et al, 2009; MARCONCINI et al., 2010; CHOI et al, 2011).

Os resultados referentes ao SNP rs3771300 de *STAT1* mostraram uma maior frequência do alelo 'G' nos indivíduos PA, do que PC e C. O alelo "G" aumenta em duas vezes (2X) o risco de desenvolver PA. O papel funcional deste polimorfismo ainda não está bem determinado na literatura, mas devido a sua proximidade com a região GATA, onde se liga o maior regulador gênico de Th2 (o fator de transcrição GATA3), acredita-se que este polimorfismo possa influenciar na resposta Th2 (PINTO et al., 2007).

Um estudo sobre atopia em crianças alemãs mostra que o alelo ancestral "T" de *STAT1* (rs3771300) está inversamente relacionado com a doença inflamatória, sugerindo um papel protetor (PINTO et al., 2007). A molécula de *STAT1* está envolvida com um perfil de pró-inflamação (QUARCOO et al., 2004; CHEN & HERSHEY, 2007; KALLIOLIAS & IVASHKIV,

2008; SOUZA et al., 2011), antiproliferação (KALLIOLIAS & IVASHKIV, 2008) e pró-apoptótico pelo aumento de caspase-1 e caspase-3 (KIM & LEE, 2007), liberação de citocromo-C pela mitocôndria, ativação dos genes de Fas e FasL, e inibição dos promotores dos genes de Bcl-2 e Bcl-x (CHEN & HERSHEY, 2007; KIM & LEE, 2007).

Acredita-se que STAT1 esteja envolvido com a mediação do efeito supressor de IL-27 na diferenciação de Th17 e Th2 (KALLIOLIAS & IVASHKIV, 2008). Interessantemente encontramos uma redução na frequência de células CD4+ expressando IL17A no grupo PA, forma clínica em que esteve associado o alelo "G" de *STAT1* rs3771300. Estes resultados favorecem para um possível delineamento de estudos funcionais futuros para este polimorfismo de *STAT1*.

Vários estudos mostram a importância de diferentes polimorfismos no gene *STAT4* como fatores de risco para doenças autoimunes, com destaque para a variante rs7574865 (KORMAN et al., 2008; GLAS et al., 2010). Estudos sugerem que rs7574865 esteja relacionado com o aumento dos níveis de expressão da proteína de STAT4, contribuindo assim para a mediação da resposta autoimune (SIGURDSSON et al., 2008). Em pacientes com lúpus eritematoso, o genótipo TT de *STAT4* (rs7574865) foi associado ao aumento na expressão do gene indutor de IFN- γ , quando comparado ao genótipo GG (SIGURDSSON et al., 2008, KARIUKI et al., 2009). Em nosso estudo, encontramos uma alta frequência do genótipo GG em todos os grupos avaliados, embora não tenha sido encontrada associação deste com a doença periodontal.

Devido a proximidade (15 Kb) dos genes de *STAT1* e *STAT4* no cromossomo 2q, e o relato de presença de desequilíbrio de ligação entre os genes na população Norte Americana com artrite reumatóide (KORMAN et al., 2008), decidimos avaliar esta associação com a doença periodontal. Semelhante ao estudo de Pinto (2007), nosso trabalho não encontrou resultado significativo para uma possível co-participação de *STAT1* rs3771300 e *STAT4* rs757465 na doença periodontal em nossa população.

Embora a literatura ainda não tenha revelado o papel funcional de *NFkB1* (rs721412), estudo com população de descendentes europeus mostrou associação e desequilíbrio de ligação entre *NFkB1* rs721412 e os genes de *Fas* e *IRF1*, moléculas envolvidas com indução de apoptose (LIU-MARES et al., 2007). Nosso trabalho encontrou alta frequência do genótipo polimórfico AA e do seu alelo “A” em nossa população, mas não encontramos associação deste polimorfismo com a doença periodontal.

Sobre os dados de regressão, em nosso trabalho, embora não tenha sido possível estabelecer um modelo da ocorrência de múltiplos alelos associados com a periodontite, foi possível confirmar que o alelo “A” de IL17A apresenta associação com C e a presença deste alelo aumenta em 2 vezes a chance de não desenvolver PA. A não confirmação da associação do alelo “G” de *STAT1* com a doença periodontal, observada no estudo de X^2 , possivelmente decorre da exclusão de pacientes que não foram avaliados com todos os SNPs.

Importante relatar que os dados até este momento discutidos, se referem apenas à população não fumante avaliada. Foi possível notar, que tanto para o perfil fenotípico quanto genotípico a presença de indivíduos fumantes nas análises não permitiu mostrar qualquer diferença entre as populações de estudo. Estes resultados reforçam achados da literatura que mostram que o fumo é um importante fator de risco para a periodontite. Neste sentido o impacto do fumo é tão forte que suprime os demais fatores de risco para a periodontite.

Esta hipótese foi confirmada ao avaliarmos em toda a população de estudo (fumante e não fumante) a associação dos polimorfismos com a doença periodontal. No momento em que os fumantes foram acrescentados na análise de regressão, o alelo 'A' de *IL17A* rs2275913 deixou de ter associação significativa com PA ($p=0.073$) e PC ($p= 0.129$) e o fumo se mostrou significativamente associado a PC ($p=0.007$).

Devido a ausência de estudos sobre os polimorfismo rs2275913 (*IL17A*), rs763780 (*IL17F*), rs11209026 (*IL23R*), rs3771300 (*STAT1*), rs7574865 (*STAT4*) e rs721412 (*NFkB1*) na doença periodontal, bem como na população brasileira, destacamos mais uma vez o atual trabalho como pioneiro nesta abordagem. Embora não tenhamos encontrado associação dos polimorfismos de *IL17F*, *IL23R*, *STAT4* e *NFkB1* com a periodontite, não devemos esquecer que outros polimorfismos associados a estas moléculas podem estar presentes e contribuir para o estabelecimento da periodontite.

A relevância deste trabalho de tese está tanto na capacidade de abranger moléculas relacionadas aos mecanismos envolvidos na resposta imune a um estímulo, quanto na identificação de fatores de risco à doença. É importante lembrar que a periodontite é uma doença multifatorial que envolve infecção por várias espécies de bactérias Gram-negativas, desencadeando variadas respostas celulares e humorais. Este é um fator relevante e que justifica elevados processos inflamatórios presentes na doença periodontal, mesmo havendo mecanismos de modulação da resposta de algumas células na presença de estímulos periodontopatogênicos.

Neste trabalho revelamos o perfil genotípico dos SNPs avaliados em nossa população de estudo e, como principal contribuição dos achados fenotípicos, a possibilidade de gerar novas indagações sobre o papel de diferentes subtipos celulares na resposta imune da periodontite.

Pretendemos com este trabalho contribuir para o conhecimento de possíveis indicadores de susceptibilidade para doença periodontal, além do entendimento do perfil imunológico associado à doença, servindo como base para estudos futuros que possibilitem a identificação precoce de grupos de risco à doença periodontal e a introdução de medidas preventivas e terapêuticas apropriadas ao grau de risco dos indivíduos.

6.0 – CONCLUSÕES

- O estímulo de *P.gingivalis* é capaz de modular a expressão de moléculas de superfície e citocinas em indivíduos com periodontite e controle. Ao mesmo tempo é capaz de aumentar o IMF e a frequência de CD80, TNF- α e IFN- γ , e reduzir a frequência de IL10 por células CD14+ e CD4+, mostrando assim um possível mecanismo de ativação da resposta pró-inflamatória por esta bactéria.
- Mesmo que a bactéria periodontopatogênica tenha sido capaz de reduzir a expressão de CD86, esta molécula ainda esteve mais presente no grupo PA do que controle. Mostramos assim, a importância desta molécula na resposta imune da periodontite.
- Diante dos nossos resultados em que houve maior expressão de CTLA4 e menor de IL17A por células CD4+ no grupo PA, seria interessante avaliar/caracterizar, nesta população, o perfil de células Treg e Th17.
- Em todos os grupos (C, PC e PA) e condições de cultura houve uma maior frequência de células CD28- do que CTLA4 em células CD4+ e CD8+.
- LPS- *E.coli* e LPS- *P.gingivalis* influenciam de forma diferente na expressão de moléculas co-estimuladoras.

- Os polimorfismos de *IL17A* (rs2275913) e *STAT1* (rs3771300) possuem associação com a periodontite agressiva.
- O alelo “A” do polimorfismo de *IL17A* (rs2275913) está relacionado com um papel protetor para o desenvolvimento da periodontite agressiva.
- O alelo “G” do polimorfismo de *STAT1* (rs3771300) está relacionado com o aumento do risco, de até 2 vezes, de desenvolver a periodontite.
- Os polimorfismos de *IL17F*, *IL23R*, *STAT4* e *NFkB1* não mostraram associação com qualquer forma clínica da doença periodontal.
- Este trabalho fornece indícios sobre fatores de risco relacionados à doença periodontal e contribui para a compreensão dos mecanismos envolvidos com a resposta imune na doença. Embora este trabalho responda de forma categórica ao perfil genotípico de nossa população de estudo, a principal contribuição dos achados fenotípicos está na possibilidade de gerar novas indagações sobre o papel de diferentes subtipos celulares na resposta imune da periodontite.

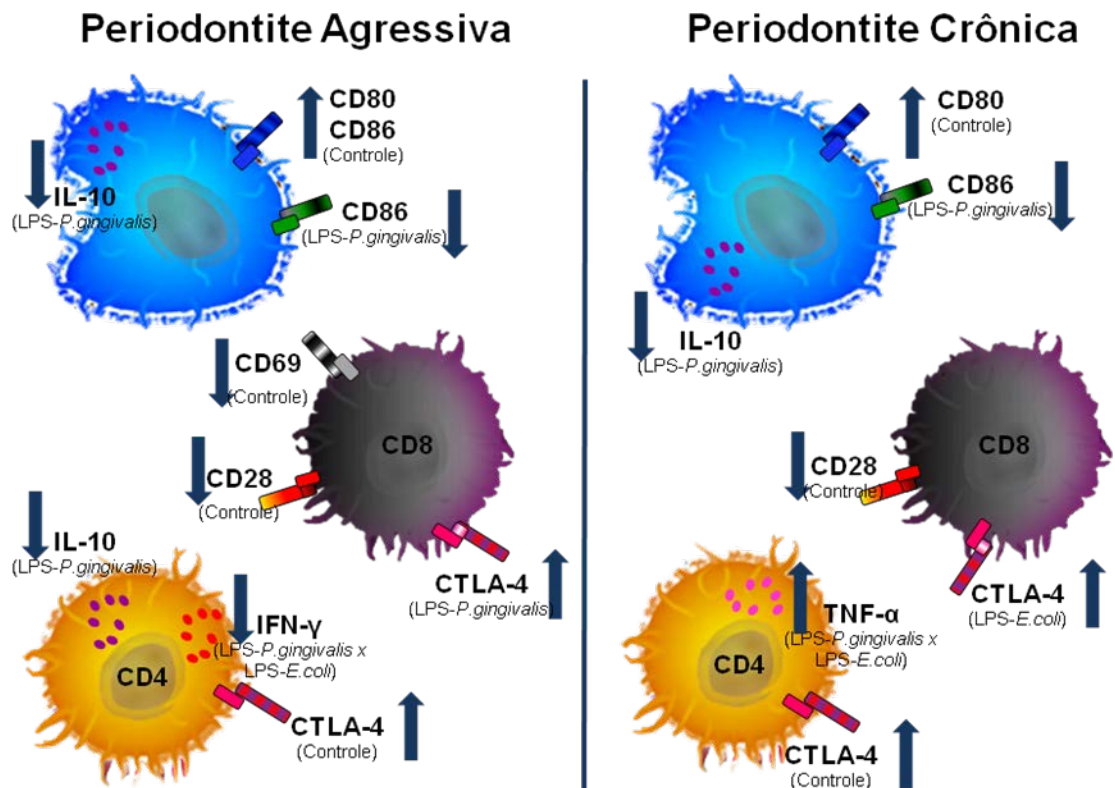


Figura 200: Sumário de resultados do estudo fenotípico.

7.0- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALAYAN J, GEMMEL E, FORD P, HAMLET S, BIRT PS, IVANOVSKIS S and FARAH CS. The role of cytokines in a Porphyromonas gingivalis-induced murine abscess model. Oral Microbiology Immunology 2007; 22:304-312.

ALBANDAR JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal disease. Periodontology 2000. 2002; 29:177-206.

AOYAGI T, YAMAZAKI K, KABASAWA-KATOH Y, NAKAJIMA T, YAMASHI N, YOSHIE H and HARA K. Elevated CTLA-4 expression on CD4 T cells from periodontitis patients stimulated with Porphyromonas gingivalis outer membrane antigen. Clin Exp Immunol. 2000; 119(2):280-6.

ARISAWA T, TAHARA T, SHIBATA T, NAGASAKA M, NAKAMURA M, KAMIYA Y, FUJITA H, NAKAMURA M, YOSHIOKA D, ARIMA Y, OKUBO M, HIRATA I and NAKANO H. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. Journal Clinical Immunol. 2008; 28:44-49. (DOI: 10.1007/s10875-007-9125-8)

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann.Periodontol. 1999; 4(1):1-6.

AWASTHI A & KUCHROO VK. IL-17A directly inhibits TH1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation. *Nature Immunology*. 2009; 10(6):568-570.

BEHFARNIA P, BIRANG R, ANDALIB AR and ASADI S. Comparative evaluation of IFN- γ , IL4 and IL17 cytokines in healthy gingival and moderate to advanced chronic periodontitis. *Dent Res J*. 2012; 7 (2):45-50.

BEKLEN A, AINOLA M, HUKKANEN M, GURGAN C, SORSA T and KONTTINEN YT. MMPs, IL1, and TNF- α are regulated by IL17 in periodontitis. *Journal Dent Res*. 2007; 86:347-351. (DOI: 10.1177/154405910708600409)

BERGLUNDH T & DONATI M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005; 32 (SUPPL.6):87-107.

BETTELLI E, OUKKA M and KUCHROO VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology*. 2007; 8(4):345-349.

BHATIA S, EDIDIN M, ALMO SC and NATHENSON SG. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology Letters*. 2006; 104:70-75.

CARAYOL N, CHEN J, YANG F, JIN T, JIN L, STATES D and WANG C-Y. A dominant function of IKK/NF- κ B signaling in global lipopolysaccharide-

induced gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(41):31142-31151. (DOI: 10.1074/jbc.M603417200)

CARDOSO FP, VIANA MB, SOBRINHO APR, DINIZ MG, BRITO JAR, GOMES CC, MOREIRA PR and GOMEZ RS. Methylation pattern of the IFN- γ gene in human dental pulp. *J. Endod*. 2010; 36:642-646.

CHEN B, ZENG Z, HOU J, CHEN M, GAO X and HU P. Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population. *Scand Journal Gastroenterol*. 2009; 44(6):720-6.

CHEN W & HERSHEY GKK. Signal transducer and activator of transcription signal in allergic disease. *L Allergy Clin Immunol*. 2007; 119:529-41.

CHOI E-Y, JIN J-Y, LEE J-Y, CHOI J-I, CHOI IS and KIM S-J. Melatonin inhibits *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF κ B and STAT1 activity. *J Pineal Res*. 2011; 50:197-206. (DOI:10.1111/j.1600-079x.2010.00829.x)

CLEREHUGH V. Periodontal diseases in children and adolescents. *British Dental Conference and Exhibition*. May; 2008 (DOI: 10.1038/sj.bdj.2008.301)

COCHRAN DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal Periodontol*. 2008; 79(8):1569-1575. (DOI: 10.1902/jop.2008.080233)

CSISZAR A, WANG M, LAKATTA E and UNGVARI Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kB. *J Appl Physiol*. 2008. (DOI: 10.1152/jappphysiol.90470.2008)

CUA DJ & TATO CM. Innate IL17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Review Immunology*. 2010; 10:479-490.

DI MEGLIO P, DI CESAR A, LAGGNER U, CHU C-C, NAPOLITANO L, VILLANOVA F, TOSI I, CAPON F, TREMBATH RC, PERIS K and NESTLE FO. The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated disease by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS ONE*. 2011; 6(2)e17160. (DOI:10.1371/journal.pone.0017160)

DIXON DR, BAINBRIDGE BW and DARVEAU RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology* 2000. 2004; 35:53-74.

DURALI D, HERVE M-G G, GIRON-MICHEL J, AZZARONE B, DELFRAISSY J-F and TAOUFIK Y. In human Bcells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood*. 2003; 102:4084-4089. (DOI: 10.1182/blood-2003-02-0518)

DUTRA WO, MOREIRA PR, SOUZA PEA, GOLLOB KJ and GOMEZ RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: Lesions learned from oral disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009; 20:223-232. (DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.05.005.)

FOLWACZNY M, GLAS J, TONENCHI L and TOROK HP. Microsatellite GT polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor (TLR) 2 gene and susceptibility to periodontitis. *Clinical Oral Invest.* 2010. (DOI 101007/s00784-010-0396-8)

GAFFEN SL & HAJISHENGALLIS G. A new inflammatory cytokine on the blockre-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the contexto f Th17 and IL17. *Journal Dent Research.* 2008; 87(9):817-828.

GAIO EJ, HAAS AN, CARRARD VC, OPPERMAN RV, ALBADAR J and SUSIN C. Oral health status in elders from South Brazil: a population-based study. *Gerontology.* 2012. (Doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00617.x)

GARLET GP, CARDOSO CR, MARIANO FS, CLAUDINO M, DE ASSIS GF, CAMPANELLI AP, ÁVILA-CAMPOS MJ and SILVA JS. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol.* 2010; 37:591-600.

GEMMELL E, McHUGH GB, GRIECO DA and SEYMOUR GJ. Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues. 2001; 36(2): 92-100.

GEMMELL E, YAMAZAKI K and SEYMOUR. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology*2000. 2007; 43:14-40.

GEMMELL E, YAMAZAKI K and SEYMOUR GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Critical reviews in oral biology and medicine*. 2002; 13(1)17-34.

GHOSH S & HAYDEN MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nature Reviews*. 2008; 8:837-847. (DOI: 10.1038/nrl.2423)

GLAS J, SEIDERER J, NAGY M, FRIES C, BEIGEL F, WEIDINGER M, PFENNIG S, KLEIN W, EPPLER JT, LOHSE P, FOLWACZNY M, GOKE B, OCHSENKUHN T, DIEGELMANN J, MULLER-MYHSOK B, ROESKE and BRAND S. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn`s disease and disease onset. *PLoS ONE*. 2010; 5(4):e10373. doi: 10.1371/journal.pone.0010373

GOMEZ RS, DUTRA WO and MOREIRA PR. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Research*. 2009; 58:625-629. (DOI: 10.1007/s00011-009-0041-7)

GONZALES JR, MANN M, STELZIG J, BODEKER RH and MEYLE J. Single-nucleotide polymorphisms in the IL4 and IL13 promoter region in aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2007; 34:473-479.

GORSKA R, GREGOREK H, KOWALSKI J, LASKUS-PERENDYK A, SYCZEWSKA M and MADALINSKI K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum

samples from patients with chronic periodontitis. J Clin Perodontol. 2003; 30:1046-1052.

GRAVES DT, OSKOU M, VOLEJNIKOVA S, NAGUIB G, CAI S, DESTA T, KAKOURAS A and JIANG Y. Tumor Necrosis Factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. J Dent Res. 2001. 80(10):1875-1879.

HARDING FA, MCARTHUR JG, GROSS JA, RAULET CH and ALLISON JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature. 1992; 356(6370):607-609.

HELLER D, SILVA-BOGHOSSIAN CM, SOUTO RM and COLOMBO APV. Subgingival microbial profile of generalized aggressive and chronic periodontal disease. Archives of Oral Biology. 2012. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.003

HONDA T, AOKI Y, TAKAHASHI N, MAEKAWA T, NAKAJIMA T, ITO H, TABETA K, OKUI T, KAJITA K, DOMON H and YAMAZAKI K. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. Clin Chim Acta. 2008; 395(1-2):137-41.

HONDA T, DOMON H, OKUI T, KAJITA K, AMANUMA R and YAMAZAKI K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesion. Clinical and Experimental Immunology. 2006; 144:35-40.

HOURI-HADDAD YH-, WILENSKY A and SHAPIRA I. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007; 45:67-75.

HU M, CHEN J, WANG J, WANG X, MA S, CAI J, CHEN CY, CHEN ZW. AFM- and NSOM-based force spectroscopy and distribution analysis of CD69 molecules on human CD4+ Tcell membrane. *J.Mol,Recognit.* 2009; 22:516-520. DOI: 10.1002/jmr.976.

ITOH K, UDAGAWA N, KOBAYASHI K, SUDA K, LI X, TAKAMI M, OKAHASHI N, NISHIHARA T and TAKAHASHI N. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclast in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophage. *Journal Immunol.* 2003; 170:3688-3695.

JOHNSON RB, WOOD N and SERIO FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *Journal Periodontol.* 2004; 75:37-43.

KADOWAKI T, TAKII R, YAMATAKE K, KAWAKUBO T, TSUKUBA T and YAMAMOTO K. A role for gingipains in cellular responses and bacterial survival in *Porphyromonas gingivalis* – infect cell. *Frontiers of Bioscience: a journal and virtual library.* 2007 Sep 1; 12:4800-9.

KALLIOLIAS GD & IVASHKIV LB. IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *The Journal of Immunology.* 2008; 180:6325-6333.

KARIUKI SN, KIROU KA, MACDERMOTT EJ, BARILLAS-ARIAS L, CROW MK and NIEWOLD TB. Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in Lupus patients in vivo. *The Journal Immunology*. 2009; 182:34-38.

KAWAGUCHI M, ONUCHIC LF, LI X-D, ESSAYAN dm, SCHROEDER J, XIAO H-Q, LIU MC, KRISHNASWAMY G, GERMINO G and HUANG S-K. Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with Asthma. *The Journal of Immunology*. 2001; 167:4430-4435. (ISSN: 0022-1767)

KAWAGUCHI M, TAKAHASHI D, HIZAWA N, SUZUKI S, MATSUKURA S, KOKUBO F, MAEDA Y, FUKUI Y, KONNO S, HUANG S-K, NISHIMURA M and ADACHI M. IL17F sequence variant(Hist161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL17F activity. *Journal Allergy Clinical Immunol*. 2006; 117:795-801.

KAWASAKI A, ITO I, HIKAMI K, OHASHI J, HAYASHI T, GOTO D, MATSUMOTO I, ITO S, TSUTSUMI A, KOGA M, ARINAMI T, GRAHAM RR, HOM G, TAKASAKI Y, HASHIMOTO H, BAHRENS TW, SUMIDA T and TSUCHIYA N. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. *Arthritis Research & Therapy*. 2008; 10(5):1-9. (DOI: 10.1186/ar2516)

KIM HS & LEE M-S. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cellular Signalling*. 2007; 19:454-465. (DOI: 10.1016/j.cellsing.2006.09.003)

KOLLS JK & LINDEN A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21:467-476.

KONERMANN A, BEYER M , DESCHNER J, ALLAM JP, NOVAK N, WITER J, JEPSEN S and JAGER A. Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release. *Cellular Immunology*. 2012; 272:137-43.

KORMAN BD, KASTNER DL, GREGERSEN PK and REMMERS. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity review for current allergy and asthma reports. *Curr Allergy ASTHMA Rep*. 2008; 8(5):398-403.

LAINE ML, LOSS BG and CRIELAARD W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 2010; 1-22. (DOI: 10.1155/2010/324719)

LEE S-H, KIM JS, JUN H-K, LEE H-R, LEE D and CHOI B-K. The major outer membrane protein of a periodontopathogen induces IFN- β and IFN-stimulated genes in monocytes via lipid raft and TANK-binding kinase1/IFN regulatory factor-3. *J Immunol*. 2009; 182:5823-5835. (DOI: 10.4049/jimmunol.0802765)

LESTER SR, BAIN JL, JOHNSON RB and SERIO FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *Journal Periodontol*. 2007; 78:1545-1550. (DOI: 10.1902/jop.2007.060458)

LIMA PMA, SOUZA PEA, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ and DUTRA WO. Aggressive and Chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *Journal of Periodontology*. 2010. (DOI: 10.1902/jop.2010100248)

LIN Z, PORITZ L, FRAKE A, LI T-Y, RUETHER A, BYRNES KA, WANG Y, GEBHARD AW, MACNEILL C, THOMAS NJ, SCHREIBER S and KOLTUN WA. Genetics association of nonsynonymous variants of the IL23R with familial and sporadic Inflammatory Bowel Disease in women. *Dig Dis Sci*. 2010; 55:739-746. (DOI: 10.1007/s10620.009.0782.8)

LIU-MARES W, SUN Z, BAMLET WR, ATKINSON EJ, FRIDLEY BL, SLAGER SL, ANDRADE M and GOODE EL. Analysis of variation in NF-kB genes and expression levels of NFkB-regulated molecules. *BMC Proceedings*. 2007; 1(Suppl 1):S126.

LOSS BG, JOHN RP and LAINE ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanism of action. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005; 32(Suppl.6):159-179.

LUKIC A, VASILJIC I, MASJSTOROVIC I, VUCEVIC D, MOJSILOVIC S, GAZIVODA D, DANILOVIC V, PETROVIC R and COLIC M. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int. Endod*. 2006; 39(8):626-636.

MAHANONDA R & PICHYANGKUL S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000. 2007; 43:41-55.

MARCONCINI S, COVANI U, BARONE A, VOTTORIO O, CURCIO M, BARBUTI S, SCATENA F, FELLI L and NICOLINI C. Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis of refractory chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology*. 2010. (DOI: 10.1902/jop.2010.100312)

MARK LL, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS, KENT RL, GUERRERO D, KORMAN K, NEWMAN M and STASHENKO P. Effect of the interleukin-1 genotype on monocytes IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis. *J. Periodontal Res.* 2000; 35(3):172-177.

MARTINEZ GJ, NURIEVA RI, YANG XO and DONG C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann New York Academy of Sciences.* 2008; 1143:188-211.

MATHUR AN, CHANG H-C, ZISOULIS DG, STRITESKY GL, YU Q, O'MALLEY JT, KAPUR R, LEVY DE, KANSAS GS and KAPLAN MH. STAT3 and STAT4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *The Journal of Immunology.* 2007; 178:4901-4907.

MATSUYAMA T, KAWAI T, IZUMI Y and TAUBMAN MA. Expression of major histocompatibility complex class II and CD80 by gingival epithelial cells induces activation of CD4+ T cells in response to bacterial challenge. *Infection and Immunity.* 2005; 73(2):1044-51.

MEISEL P, SCHWAHN C, GESCH D, BERNHARDT O, JOHN U and KOCHER T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J. Periodontol.* 2004; 75:236-242.

MEISEL P, SIEGEMUND A, GRIMM R, HERRMANN FH, JOHN U, SCHWAHN C and KOCHER T. The interleukin-1 polymorphisms, smoking, and risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res.* 2003; 82:189-193. (DOI: 10.1177/154405910308200308)

MILLER MC, MOHRENWEISER HW and BELL DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters.* 2001; 120:269-280.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana. Brasil, Ministério da Saúde. 1986.

MOREIRA PR, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ and DUTRA WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in sample of Brazilian individuals. *Journal Periodontal Research.* 2007; 42:23-30. (DOI: 10.1111/j1600-0765.2006.00910.x)

MOREIRA PR, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ and DUTRA WO. TNF- α and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *The Open Dentistry Journal.* 2009; 3:184-190.

MOREIRA PR, LIMA PMA, SATHLER KOB, IMANISHI SAW, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ and DUTRA WO. Interleukin-6 expression and

gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006; 148:119-126. (DOI: 10.1111/j1365-2249.2007.03327.x)

MOREIRA PR, SÁ AR, XAVIER GM, COSTA JE, GOMEZ RS, GOLLOB KJ and DUTRA WO. A functional interleukin-1B gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal Periodontal Research*. 2005; 40:306-311. (DOI: 10.1111/j1600-0765.2005.00801.x)

MOUTSOPOULOS NM, KLING HM, ANGELOV N, JIN W, PALMER RJ, NARES S, OSORIO M and WAHL SM. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *Journal of Autoimmunity*. 2012;1-10. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.03.003.

NAKAJIMA T, UEKI-MARUYAMA K, ODA T, OHSAWA Y, ITO H, SEYMOUR GJ and YAMAZAKI K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Research*. 2005; 84:639-43.

NUNES IP, JOHANNESSEN AC, MATRE R and KRISTOFFERSEN T. Epithelial expression of HLA class-II antigens and Fc-Gamma receptors in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1994; 21:526-532.

O'BRIEN-SIMPSON NM, VEITH PV, DASHPER SG and REYMNOLDS EC. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology* 2000. 2004; 35:101-134.

O'CONNOR W, ZENEWICZ LA and FLAVELL RA. The dual nature of Th17 cells: shifting the focus to function. *Nature Immunology*. 2010; 11(6):471-6.

OHLRICH EJ, CULLINAN MP and SEYMOUR GL. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*. 2009; 54(1Suppl): S2-S10.

OHYAMA H, KATO-KOGOE N, KUHARA A, NISHIMURA F, NAKASHO K, YAMANEGI K, YAMADA N, HATA M, YAMANE J and TERADA N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *Journal Dent Research*. 2009; 88(7):633-8.

PALOMINO-MORALES RJ, ROJAS-VILLARRAGA A, GONZALEZ CI, PAMIREZ G, ANAYA JM and MARTIN J. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and Systemic lupus erythematosus in Colombians. *Genes Immun*. 2008; 9:379-382.

PARADOWSKA-GORYCKA A, WOJTECKA-LUKASIK E, TREFLER J, WOJCIECHOWSKA B, LACKI JK and MASLINSKI S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of Rheumatoid Arthritis (RA). *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010; 72: 137-41.

PARISH IA & KAECH SM. Diversity in CD8+ T cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21:291-97.

PINTO LA, STEUDEMANN L, DEPNER M, KLOPP N, ILLING T, WEILAND SK, MUTIUS E VON and KABESCH M. STAT1 gene variations, IgE

regulation and atopy. *Allergy*. 2007; 62:1456-1461.(DOI: 10.1111.j.1398-9995.2007.01479.x)

QUARCOO D, WEIXLER S, GRONEBERG D, JOACHIM R, AHRENS B, WAGNER AH, HECKER M and HAMELMANN E. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 1 attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity. *J. Allergy Clin Immunol*. 2004; 114:288-95.(DOI: 10.1016/j.jaci.2004.03.055)

REMMERS EF, PLENGE RM, LEE AT, GRAHAM RR, HOM G, BEHRENS TW et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med*. 2007; 357(10):977-986. doi: 10.1056/NEJMoa073003

RIHA P & RUDD C. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self/Nonself*. 2010; 1(3):231-40.

SATO K, SUEMATSU A, OKAMOTO K, YMAGUCHI A, MORISHITA Y, KADONO Y, TAKANA S, KODAMA T, AKIRA S, IWAKURA Y and CUA DJ, TAKAYANAGI H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal Exp Medicine*. 2006; 203(12):2673-2682.

SCAREL-CAMINAGA RM, TREVILATTO PC, SOUZA PC, BRITO RB, CAMARGO LEA and LINE SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *Journal of Clinical*

Periodontology. 2004; 31:443-448. (DOI: 10.1111/j.1600-051X.2004.00500.x)

SCHULZ S, HIERSE L, ALTERMANN W, KLAPPROTH J, ZIMMERMANN U, REICHERT Y, GLASER C, KLUTTIG A, STEIN JM, SCHALLER HG and REICHERT S. The del/del genotype of the nuclear factor-kB -94ATTG polymorphism and its relation to aggressive periodontitis. J Periodontol. Res. 2010; 45:396-403.

SHEVACH EM. Mechanism of foxp3+T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. 2009; 30:636-45.

SIGURDSSON S, NORDMARK G, GARNIER S, GRUNDBERG E, KWAN T, NILSSON O, ELORANTA M-L, GUNNARSSON I, SVENUNGSSON E, STURFELT G, BENGTSSON AA, JONSEN A, TRUEDSSON L, RANTAPAA-DAHLQVIST S, ERIKSSON C, ALM G, GORING HHH, PASTINEN TM SYVANEN A-C and RONNBLOM L. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5. Human Molecular Genetics. 2008; 17(18):2868-2876. (DOI: 10.1093/hmg/ddn184)

SILVERBERG MS, CHO JH, RIOUX JD, MCGOVERN DPB, WU J, ANNESE V, ACHKAR J-P, GOYETTE P and SCOTT R. Ulcerative colitis loci on chromosomes 1p36 and 12q15 identified by genome-wide association study. Nat Genet. 2009; 42(2):216-220. (DOI: 10.1038/ng.275)

SOUZA JAC, NOGUEIRA AVB, SOUZA PPC, CIRELLI JA, GARLET GP and Jr CR. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*. 2011. (DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.03.022)

SOUZA PE, ROCHA MO, MENEZES CA, COELHO JS, CHAVES AC, GOLLOB KJ and DUTRA WO. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of co-stimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from indeterminate and cardiac Chagas disease patients. *Infect Immun*. 2007.

STARNEs T, ROBERTSON M, SLEDGE G, KELINCH S, NAKSHATRI H, BROXMEYER HE and HROMAS R. Cutting Edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *The Journal of Immunology*. 2001; 167:4137-4140. (ISSN: 0022-1767)

STEIN JM, MACHULLA HKG, LAMPERT F and REICHERT S. Human leukocytes antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2008; 35:183-192.

STEPHANOU A. Role of the STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med*. 2004; 8(4):519-525.

STRIOGA M, PASUKONIENE V and CHARACIEJUS D. CD8+CD28- and CD8+CD57+T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011; 134:17-32. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03470.x

TABOR HK, RISCH NJ and MEYERS. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*. 2002; 3:1-7.

TAKAHASHIK, AZUMA T, MOTOHIRA H , KINANE DF and KITETSU S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005; 32:369-374. (DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00676.x)

TAKAHASHI N, OKUI T, TABETA K and YAMAZAKI. Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells. *Eur Journal Oral Sciences*. 2011; 119:339-44.

TAKEDA K, KAISHO T and AKIRA S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:335-76. (DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126)

TELLES RP, SAKELLARI D, TELES F, KONSTANTINIDIS A, KENT R, SOCRANSKY S and HAFFAJEE A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal Periodontol.* 2010; 81(1):89-98. (DOI: 10.1902/jop.2009.090397.)

TERVONEN T, RAUNIO T, KNUUTTILA M and KARTTUNEN R. Polymorphisms in the CD14 and IL6 genes associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2007; 34:377-383.

TRINDADE SC, OLCZAK T, GOMES-FILHO IS, DE MOURA-COSTA LF, VALE VC, GALDINO-NETO M, ALVES H, CARVALHO-FILHO PC, STOCKER A, BENDICHO MT, XAVIER MT, DE MORAES MARCÍLIO CERQUEIRA E and MEYER R. Porphyromonas gingivalis antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Archives of Oral Biology. 2011. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.003.

VERNAL R, DUTZAN N, CHAPARRO A, PUENTE J, VALENZUELA MA and GAMONAL J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. Journal of Clinical Periodontology. 2005; 32:383-389. (DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00684.x)

VIANA MB, CARDOSO FP, DINIZ MG, COSTA FO, COSTA JE, GOMEZ RS and MOREIRA PR. Methylation pattern of IFN- γ and IL-10 genes in periodontal tissues. Immunology. 2011. (DOI: 10.1016/j.imbio.2011.01.006)

WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB and BLUESTONE JA. CTLA4 can function as a negative regulator of T cell activation. Immunity. 1994; 1:405-413.

WATFORD WT, HISSONG BD, BREM JH, KANNO Y, MUUL L and O'SHEA JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. Immunological Reviews. 2004; 202:139-156.

WU X, ZENG Z, CHEN B, YU J, XUE L, HAO Y, CHEN M, SUNG JJY and HU P. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *International Journal of Cancer*. 2009; 127:86-92.

YOSHIMOTO T, OWAKI T, ASAKAWA M, MORISHIMA N, KAMIYA S and MIZUGUCHI J. A novel IL6/IL12 family cytokine IL27 and its antitumor activity. *Gene Ther Mol Biol*. 2005; 9:7-14.

ZHANG D, CHEN L, LI S, GU Z and YAN J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*. 2008; 14(2):99-107.

ZHU M and FU Y. The complicated role of NF κ B in T-cell selection. *Cellular&Molecular Immunology*. 2010; 7:89-93. (DOI: 10.1038/cmi.2009.112)

APÊNDICE

Apêndice A – Artigos Publicados

Artigo 1: Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis

Revista: *Human Immunology*

Artigo 2: Association of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms with aggressive periodontitis in Brazilians

Revista: Oral Disease

Apêndice B – Artigos Submetidos

Artigo 1: Transcription factor *STAT1* gene polymorphism is associated with the development of severe forms of periodontal disease

Revista Inflammation Research

Title: Transcription factor *STAT1* gene polymorphism is associated with the development of severe forms of periodontal disease

Running title: STAT1 polymorphism in periodontal disease

Adriana Machado Saraiva¹, Jeane de Fátima Correia Silva¹, Micena Roberta Miranda Alves e Silva¹, José Eustáquio da Costa², Kenneth J. Gollob^{3,4,5}, Paula Rocha Moreira¹, Walderez Ornelas Dutra^{1,4,5}

¹ Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

² Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

³ Programa de Pós-Gaduação em Medicina e Biomedicina, Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Santa Casa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

⁴ Tropical Disease Research Program, Center for Infections Disease Research, Biosciences Division, SRI International, Menlo Park, CA, USA;

⁵ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais [INCT-DT]

Corresponding author: Dra. Walderez Ornelas Dutra Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia das

Interações Celulares, Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas
Gerais. Phone: 55-31-3409-3003 e-mail: waldutra@gmail.com

Summary

Periodontal disease [PD] is one of the most common inflammatory diseases, affecting about 10% of the world population. The establishment of PD is influenced by polymorphisms in genes involved with inflammatory response. STAT-1 is a transcription factor that plays a key role in the intracellular signaling triggered by cytokines and, thus, its activation is critical in inflammatory diseases. We aim to evaluate the occurrence of association between *STAT-1* [rs3771300] polymorphism and distinct clinical forms and severity of PD. Our analysis showed that the presence of the G allele for *STAT-1* was associated with twice as high of a chance to develop aggressive periodontitis, and the most severe form of the disease.

Keywords: STAT-1, polymorphisms, periodontal disease, Brazilians.

Introduction

Periodontal disease is the most common oral inflammatory condition of bacterial etiology, representing the main cause of dental loss in developed countries. Several risk factors are related to the development of the disease such as smoking, host immune response and genetics [1-3]. It has been shown that cytokines orchestrate periodontal inflammation [3]. The function of these molecules requires the induction of intracellular transcription factors [TF]. STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) are a family of TF proteins whose members are responsible for cytokine mediated intracellular signaling. In particular, STAT-1 is activated by inflammatory cytokines and has been associated with several inflammatory diseases [4,5]. One of the characteristics that influence STAT function is the occurrence of gene polymorphisms that may alter its function and, thus, be associated with diseases. Most polymorphism association studies in periodontal disease have been performed in genes that code for cytokines or cell surface receptors. Despite the importance of STAT in cytokine signaling and function, no information concerning STAT polymorphism and its association with periodontal disease has been published to date. The present study investigated the frequency of the *STAT-1* (rs3771300) polymorphism in Brazilian individuals with different clinical forms of periodontitis, and evaluated the association of this polymorphism with the severity of disease. Our results showed that *STAT-1* gene polymorphism is associated with aggressive periodontitis and with the occurrence of severe forms of the disease, highlighting its possible use as susceptibility marker.

Patients and Methods

Patients

We designed a case-control study and enrolled 180 subjects receiving treatment at the Dentistry School at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil. The groups were stratified into healthy subjects without periodontal disease (Control group, n=61, age range: 16-58 years old), patients with aggressive periodontitis (AP group, n=37, age range: 15-63 years old) and subjects with chronic periodontitis (CP group, n=79, age range: 31-76 years old). Healthy control individuals (C) did not have disease at the time of sample collection and also did not have history of previous periodontal disease, as determined by absence of clinical attachment loss (CAL) and no areas with probing depth > 3mm. The assessment of CAL was performed by insertion of a periodontal probe in gingival sulcus and the measurement corresponding to the distance from the cemento-enamel junction to the location of a periodontal probe tip was defined as CAL, as previously done by us (6). Clinical diagnosis and determination of periodontal disease severity were based on criteria established in 1999 at the International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions [7]. Patients exhibiting mean of $CAL \geq 5mm$ were considered with severe and those exhibiting $3mm \leq CAL < 5mm$ were considered with moderate periodontitis. Other than periodontal disease, patients were systemically healthy. Because tobacco smoking is an important risk factor for periodontitis, we also analyzed our data taking the habit of smoking under consideration, as previously done [6]. This study was approved by the UFMG's IRB (n° 003/03).

Genotyping of Polymorphisms

Epithelial cells were obtained by oral swab, and samples were immediately immersed in 1500 μ L of Krebs buffer. This procedure and DNA extraction were performed as previously done by us [6]. Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR), using Taq-Man SNP genotyping assay, TaqMan Genotyping Master Mix systems and validated primers for STAT1, rs3771300, c_22274194-10 Assay ID (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The reactions were performed using a C1000TM Thermal Cycler/CFX96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and were carried out in a total volume of 20 μ L containing 10 μ L TaqMan Genotyping Master Mix, 0,5 μ L primers & probes and 50ng of genomic DNA.

Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed using the JMP (SAS, Cary, NC, USA) statistical software. The Likelihood ratio X^2 , Fisher`s exact test, Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were obtained. For all analysis, the difference was considered to be significant at $p < 0.05$.

Results

The genotype distribution for the SNP in control groups in this study is in Hardy-Weinberg equilibrium (not shown). No statistical difference was observed in the frequency of genotypes amongst all groups (Table 1). Considering the allelic distribution, the AP group showed high frequency of G allele when

compared to C and CP groups in non-smoker individuals (Table 1). Considering disease severity, we found a high frequency of the G allele for *STAT-1* in severe AP compared to severe CP in non-smokers (Table 1).

Discussion

STAT-1 (rs3771300) polymorphism is located on chromosome 2q32-q33, with a T>G nucleotide change in the last intron, within a highly conserved noncoding sequence. It is three base pairs away from the core of a highly conserved GATA motif [5], potentially capable of binding GATA-3, the master regulatory TF for the differentiation and perpetuation of human Th2 cells [5]. Analysis of this polymorphism showed a higher frequency of the G allele in AP, as compared to CP and control individuals. The presence of the G allele increased by two-fold the risk for developing AP. Analysis considering disease severity on the basis of CAL, we also found that G allele is a factor risk to a severe form of AP. The functional role of this polymorphism is still not clear. While it is an indicator of severity in periodontal disease, its mechanisms could be via altering the expression of the molecule as shown in other models [8], or by influencing nearby genes, as previously suggested [9]. *STAT-1* is related to proinflammatory profiles [5], and alterations on its function may have profound effects in disease development.

Studies have shown that smoking habit and positive genotype act as synergic risk factors for early tooth loss [10]. In the present study, we analyzed our data considering smoking habit. Our results were significant only when smokers were excluded of analysis. This suggests that the smoking-related risk

can often obscure the polymorphism-related risk, as previously discussed [3]. In conclusion, the present investigation shows for the first time that the *STAT-1* polymorphism is associated with the aggressive form of periodontal disease as well as with the occurrence of severe forms of the disease, indicating that this polymorphism may be a risk factor for severe periodontitis in the Brazilian population.

Acknowledgements

W.O. Dutra and K.J.Gollob are CNPq fellows. A.M. Saraiva is a CAPES fellow.

References

1- Lima PMA, Souza PEA, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ and Dutra WO. Aggressive and Chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* 2010; 82: 86-95.

2- Gomez RS, Dutra WO and Moreira PR. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Res* 2009; 58: 625-629.

3- Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 223-32.

4- Kim HS and Lee M-S. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal* 2007; 19: 454-465.

5- Pinto LA, Steudemann L, Depner M, Klopp N, Illing T, Weiland SK et al. STAT1 gene variations, IgE regulation and atopy. *Allergy*. 2007; 62: 1456-1461.

6- Moreira PR, Sá AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ and Dutra WO. A functional interleukin-1B gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res* 2005; 40: 306-311.

7- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.

8- Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D et al. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. *Arthritis Res & Therapy*. 2008; 10:1-9.

9- Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK and Remmers. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity review for current allergy and asthma reports. *Curr Allergy ASTHMA Rep*. 2008; 8: 398-403.

10- Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Herrmann FH, John U, Schwahn C et al. The interleukin-1 polymorphisms, smoking, and risk of

periodontal disease in the population-base SHIP study. J Dent Res 2003;
82: 189-193.