

Micena Roberta Miranda Alves e Silva

**Análise genotípica e fenotípica de moléculas envolvidas
na resposta imune e avaliação do potencial citotóxico
em células de indivíduos com diferentes formas clínicas
da doença periodontal**

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - MG
2012

Micena Roberta Miranda Alves e Silva

**Análise genotípica e fenotípica de moléculas envolvidas
na resposta imune e avaliação do potencial citotóxico
em células de indivíduos com diferentes formas clínicas
da 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 a obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra – Departamento de Morfologia

Co-orientador: Prof. Dr Kenneth John Gollob – Instituto de Ensino e Pesquisa – Hospital Santa Casa de Misericórdia

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - MG
2012

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia das Interações Celulares, sob a orientação dos professores Walderez Ornelas Dutra e Kenneth John Gollob, e contou com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

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

Dr^a. Paula Rocha Moreira, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

Dr. Germano Carneiro da Costa, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza, Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas).

Dr. Élton Gonçalves Zenóbio, Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas).

Dr^a. Adriana Machado Saraiva, Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

Simone Angélica de Faria Amormino, aluna de doutorado, Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra, pela oportunidade, orientação e dedicação a mim concedidas desde o ingresso em seu laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Kenneth John Gollob pelas valiosas contribuições para a realização de meu Doutorado.

Wal e Ken, obrigada por contribuírem de modo tão significativo para o meu crescimento nas áreas pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Eustáquio Costa, por toda a disponibilidade durante o período de coleta das amostras na Clínica de Especialização em Periodontia, não medindo esforços para ajudar a todos que amam a área científica.

Aos professores da Pós-graduação em Biologia Celular pelo ensino.

Aos “antigos” amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares: Adriana, Cris Menezes, Dani Barbosa, Diego, Érica, Fernanda, Germano, Janete, Paula e Tatjana pela amizade, convivência agradável e ajuda sempre constantes.

Em especial, à Paula, por todas as discussões envolvendo o meu projeto, mas principalmente por sua amizade;

à Adriana, pela colaboração nas várias etapas deste trabalho.

Aos mais novos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares: Agostinho, Allyson, Carol, Cristina, Dani Valente, Isabela, Karine, Luísa Magalhães, Luiz Paulo, Luíza Cenízio, Marcos, Natália, Rodrigo, Simone, Vanessa e à técnica de laboratório, Kayla Veruska, por todas as contribuições para a realização desta pesquisa.

Aos pacientes, cuja participação foi fundamental para que todos os objetivos deste trabalho fossem realizados.

A todos os colegas da Pós-graduação, em especial aos amigos Francisco, Guilherme e Hermann pela convivência e aprendizado na disciplina de Biologia Celular.

Aos professores do Departamento de Morfologia, pelo apoio e, principalmente, pelo aceite do pedido de dispensa dos meus encargos didáticos, no segundo semestre de 2011, permitindo-me, desta maneira, uma maior dedicação à minha capacitação profissional.

À minha querida tia Maria Helena e sua família, pela acolhida e incentivo primordiais desde o início de minha pós-graduação na USP (São Paulo).

Em especial,

À Deus, que tem me sustentado em todos os momentos e me concedido bênçãos imensuráveis. “Assim, ao Rei eterno, imortal, invisível, Deus único, honra e glória pelos séculos dos séculos”. 1 Timóteo 1:17.

Aos meus queridos pais, José Humberto e Teresinha, meu irmão Marcos e sua família pelo incentivo e torcida fundamentais.

Ao meu marido, Jesiel, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão e ao meu filho, Guilherme, por tornar os meus dias mais felizes ainda.

À babá de meu filho, Eni Rodrigo, cuja ajuda foi essencial para minha dedicação ao Doutorado.

À colega de Departamento e grande amiga Karin, pelo carinho e auxílio constantes.

À doutoranda e grande amiga Marilda, a quem sempre agradecerei por toda a disponibilidade, desde a sua atuação como monitora nas disciplinas de Anatomia, bem como por seu auxílio fundamental nas etapas finais da realização desta Tese.

“O primeiro requisito para o sucesso é a habilidade de aplicar
incessantemente suas energias física e mental
a qualquer problema sem se cansar.”

Thomas Edison

RESUMO

A doença periodontal é uma doença infecciosa que envolve bactérias Gram-negativas, cujos fatores patogênicos podem estimular células do hospedeiro a produzirem fatores destrutivos aos tecidos de sustentação dos dentes. É também evidente a contribuição de uma base genética tanto para o início quanto para a progressão da doença. O objetivo geral do atual trabalho foi avaliar a expressão genotípica e fenotípica de genes envolvidos com a resposta imune de indivíduos com doença periodontal, bem como avaliar a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas citolíticas efetoras por subpopulações celulares no sangue periférico de indivíduos sem a doença periodontal (grupo controle-C) e indivíduos com as diferentes formas clínicas da doença periodontal (periodontite agressiva-PA e periodontite crônica-PC). Dentre os objetivos específicos, no estudo genotípico, estudou-se a ocorrência de polimorfismos nos genes *CD28*, *CTLA-4* e *IL-10*, bem como a ocorrência de associações destes polimorfismos com uma maior ou menor perda de inserção clínica em indivíduos com as formas clínicas PA e PC. O estudo fenotípico, por sua vez, teve como objetivos específicos avaliar a expressão das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, além de avaliar o perfil de expressão de citocinas (IFN- γ e IL-17) e o potencial citotóxico de moléculas citolíticas efetoras (Granzima A e perforina) em células do sangue periférico, submetidas ou não ao estímulo com os diferentes LPS (*E. coli* e *P. gingivalis*), provenientes de indivíduos com ausência de doença periodontal e indivíduos com as diferentes formas clínicas da mesma. Para o estudo genotípico foram utilizados raspados de mucosa jugal, enquanto que para o estudo fenotípico foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos com a doença e indivíduos clinicamente sadios do ponto de vista periodontal. Sumarizando, os resultados revelaram: (1) associação do polimorfismo T/C, no *locus* +17, do gene *CD28* com a PA em indivíduos não fumantes; (2) associação do polimorfismo A/G, no *locus* +49, do gene *CTLA-4* com uma maior perda de inserção clínica em indivíduos não fumantes com PA; (3) ausência de associação dos polimorfismos C/A, *locus* -592; C/T, *locus* -819 e G/A, *locus* -1082, do gene *IL-10* com as diferentes formas clínicas e com a perda de inserção, em indivíduos não fumantes; (4) análise multivariada dos polimorfismos do gene *IL-10* revelou uma associação do genótipo A⁺, no *locus* -592, do gene *IL-10* com um maior risco dos indivíduos desenvolverem as diferentes formas clínicas da doença periodontal, considerando o fator de risco fumo;(5) maior percentual de células T CD4⁺CTLA-4⁺ no grupo PC em relação ao grupo PA, estando as células submetidas ao estímulo de *P. gingivalis*, indicando, possivelmente, uma resposta mais controlada dos linfócitos nos indivíduos do grupo PC; (6) maior frequência de células T CD8⁺ expressando IFN- γ , em indivíduos com PA, quando cultivadas com *P. gingivalis* em relação às células na ausência de estímulo; (7) aumento na produção total de IL-17 por linfócitos de indivíduos com PC; quando estimulados com *P. gingivalis* em relação ao estímulo com *E. coli*, provavelmente relacionado ao uso do LPS da bactéria periodontopatogênica mais associada com a PC; (8) maior frequência de células CD4⁻CD8⁻IL17⁺ nos indivíduos com PA e PC, quando estimuladas com *P. gingivalis* em relação ao estímulo com *E. coli*, indicando uma hiper-reatividade potencial dessas células; (9) menor contribuição de células T CD4⁺ para a produção de IL-17, quando submetidas ao estímulo com *P. gingivalis* se comparadas ao de *E. coli*; (10) maior frequência de células CD4⁻CD8⁻Granzima A⁺ no grupo PC em relação ao grupo C, em todas as condições de cultura, sugerindo uma possível atuação na patogênese da PC; (11) aumento na frequência de células CD4⁻CD8⁻perforina⁺ no grupo PC, em relação aos grupos C e PA, em todas as condições de cultura, sugerindo atuação na patogênese

da PC, (12) células CD4⁺CD8⁺ são as principais produtoras de perforina, nos grupos C, PA e PC, quando cultivadas com *P. gingivalis* se comparadas às cultivadas com *E. coli*, reforçando a presença de respostas variadas frente aos diferentes estímulos de LPS. Tomados em conjunto, esses dados destacam a importância da avaliação de polimorfismos genéticos que possam auxiliar no estabelecimento de grupos de risco, além de apontar para populações celulares potencialmente envolvidas com a patogênese da doença periodontal. “Dentre nossos resultados, destacam-se as células CD4⁺CD8⁺, cuja expressão de citocinas e moléculas citotóxicas foi evidente. Estes dados apontam para a clara importância em identificar e caracterizar essas células.”

ABSTRACT

Periodontal disease is an oral infectious disease caused by pathogenic factors derived from Gram-negative bacteria that lead to destruction of tooth-supporting structures. In addition to the role played by host cells, the contribution of a genetic basis for both the beginning and disease progression is also evident. The overall objective of the current study was to evaluate the genotypic and phenotypic expression of genes involved in the immune response of subjects with periodontal disease. In addition, we aimed to assess the expression of inflammatory cytokines and cytolytic effector molecules from distinct lymphocyte subsets in the peripheral blood of individuals with different clinical forms of periodontal disease (aggressive periodontitis-AP and chronic periodontitis-CP) as well as health individuals (control group-C). In the genotypic study, the objectives consisted of investigating the occurrence of polymorphisms in CD28, CTLA-4 and IL-10. Moreover, we evaluated possible associations of these polymorphisms with greater or lesser clinical attachment loss in individuals with clinical forms AP and CP. The phenotypic study, on the other hand, aimed to evaluate the expression of costimulatory molecules, CD28 e CTLA-4, in addition to evaluate the cytokine (IFN- γ and IL-17) and the cytotoxic potential of cell populations by the analysis of expression of cytolytic molecules (granzyme A and perforin) from subjects with no periodontal disease and individuals with different clinical forms of the disease. Peripheral blood cells were stimulated in culture with different LPS (derived from *E. coli* and *P. gingivalis*). For the genotypic study scrapings from oral mucosa were collected, whereas for phenotypical study samples of peripheral blood from individuals with the periodontal disease and healthy individuals, according to clinical criteria, were collected. In summary, the results showed: (1) association of the polymorphism T/C at *locus* +17, CD28 gene with AP in nonsmokers individuals; (2) association of the polymorphism A/G at *locus* +49, CTLA-4 gene with a higher clinical attachment loss in nonsmokers with AP; (3) lack of association of polymorphisms C/A, -592 *locus*, C/T, -819 *locus* and G/A, -1082 *locus*, IL-10 gene with the different clinical forms, and clinical attachment loss in nonsmokers; (4) multivariate analysis of IL-10 polymorphisms revealed an association between the A⁺ genotype in the *locus* -592 (C/A) of IL-10 gene with a greater risk of individuals develop the different clinical forms of periodontal disease, taking smoking into consideration; (5) higher percentage of CD4⁺CTLA-4⁺ T cells in CP group compared to the AP group, the cells being subjected to the stimulation of *P. gingivalis*, indicating possibly a better controlled response of lymphocytes in individuals CP group; (6) higher frequency of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ , in subjects with AP when grown with *P. gingivalis* compared to cells in the absence of stimulation; (7) an increase in total production of IL-17 by lymphocytes from individuals with CP; when stimulated with *P. gingivalis* in relation to stimulation with *E. coli*, probably related to the use of periodontopathogenic bacteria LPS more associated with the CP; (8) increased frequency of CD4⁺CD8⁻IL17⁺ in individuals with AP and CP, when challenged with *P. gingivalis* compared to stimulation with *E. coli*, indicating a hyper-reactivity potential of these cells; (9) lower contribution of CD4⁺ T cells to produce IL-17, when subjected to stimulation with *P. gingivalis* compared to *E. coli*; (10) increased frequency of CD4⁻CD8⁻Granzyme A⁺ in CP group than in group C, in all culture conditions, indicating a potential role for these cells in the pathogenesis of CP; (11) increase in the frequency of cells CD4⁻CD8⁻perforin⁺ in CP group, when compared to groups C and AP, in every culture conditions, suggesting a role in the pathogenesis of CP, (12) CD4⁻CD8⁻ are the main producers of perforin, in groups C, AP and CP, when grown with *P. gingivalis* compared to those

cultured with *E. coli*, reinforcing the presence of varied responses to different stimuli of LPS. Taken together, these data highlight the importance of assessing genetic polymorphisms that may assist in establishing risk groups, while pointing to cell populations potentially involved in the pathogenesis of periodontal disease. “Among our results, we highlight the CD4⁺CD8⁻ cells whose expression of cytokines and cytotoxic molecules was evident. These data demonstrate the clear importance to identify and characterize these cells”.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fotos representativas de géis com o produto de PCR dos genes (à esquerda) e de sua digestão enzimática (à direita).....35
- Figura 2: Perfil da distribuição de células obtidas a partir do sangue total no gráfico de tamanho *versus* granulosidade.....41
- Figura 3: Distribuição representativa em *dot plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais.....42
- Figura 4: *Dot plot* representativo das células T CD8⁺ e expressão de Perforina.....43
- Figura 5: Análise da frequência das células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CTLA-4⁺ bem como a IMF das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares, considerando-se os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos.....65
- Figura 6: Análise da frequência das células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CTLA-4⁺ bem como a IMF das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo.....67

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1: Fenômenos imunológicos envolvidos na periodontite humana e hipóteses do atual estudo.....19
- Esquema 2: Resumo e interpretação dos resultados obtidos para as formas clínicas PA e PC.....127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais da população para estudo genotípico do polimorfismo da IL-10.....	28
Tabela 2 – Polimorfismos avaliados, primers, número de ciclos, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> utilizados.....	32
Tabela 3 – Enzimas de restrição, produtos, temperatura e tempo referentes à digestão para cada polimorfismo avaliado.....	33
Tabela 4 – Relação dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo fenotípico.....	40
Tabela 5 – Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-10 (C/A) no <i>locus</i> -592 nos grupos de estudo, considerando ou não o fator de risco tabagismo.....	49
Tabela 6- Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL10 (C/A) no <i>locus</i> -592, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.....	50
Tabela 7– Distribuição dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL10 (C/T) no <i>locus</i> -819, considerando ou não o fator de risco tabagismo, nos diferentes grupos de estudo.....	51
Tabela 8- Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL10 (C/T) no <i>locus</i> -819 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.....	52
Tabela 9 – Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-10 (G/A) no <i>locus</i> -1082 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o fator de risco tabagismo.....	53
Tabela 10 - Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL10 (G/A) no <i>locus</i> -1082 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.....	54

Tabela 11 – Valores atribuídos às variáveis dependente (forma clínica) e independentes (idade, gênero, presença ou ausência do hábito de fumar, presença ou ausência da variante polimórfica).....	56
Tabela 12: Análise de Regressão Logística Binária para a forma clínica PA.....	57
Tabela 13: Análise de Regressão Logística Binária para a forma clínica PC.....	58
Tabela 14 - Tabela representativa de banco de dados para o promotor da IL-10, utilizados no <i>Haploview</i>	59
Tabela 15: Percentagem de expressão de IFN- γ dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para IFN- γ	71
Tabela 16: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de IFN- γ	74
Tabela 17: Percentagem de expressão de IL-17 dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para IL-17.....	77
Tabela 18: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de IL-17.....	81
Tabela 19: Percentagem de expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para granzima A, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos.....	83
Tabela 20: Percentagem de expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para granzima A, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo.....	85

Tabela 21: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de Granzima A.....	88
Tabela 22: Percentagem de expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para perforina, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos.....	91
Tabela 23: Percentagem de expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ positivas para perforina, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo.....	93
Tabela 24: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de perforina, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos.....	96
Tabela 25: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de perforina, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

- A – adenina
- A/G- troca de uma adenina por uma guanina
- C – citosina
- C/A- troca de uma citosina por uma adenina
- C/T- troca de uma citosina por uma timina
- CD - grupos de diferenciação
- CD4 – molécula expressa por linfócitos T auxiliares
- CD8 – molécula expressa por linfócitos T citotóxicos
- CD4⁻CD8⁻ - células duplo negativas
- CTLA-4 – antígeno 4, associado a linfócitos T citotóxicos
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato
- FACS- *Fluorescence activated cell sorter*
- FITC – isotiocianato de fluoresceína
- FSC – *forward scatter*
- G-guanina
- G/A- troca de uma guanina por uma adenina
- g – grama
- h – hora
- H₂O- água
- IC- intervalo de confiança
- IFN- γ - interferon gama
- IMF – intensidade média de fluorescência
- Ig - imunoglobulina
- ILs – interleucinas
- LBP- proteína de ligação ao LPS
- LPS – lipopolissacarídeo
- MHC – complexo de histocompatibilidade principal
- MG – Minas Gerais
- Min – minuto
- NK- célula natural killer
- NK T - célula T natural killer

OR – *odds ratio*

PCR – reação em cadeia da polimerase

PA – periodontite agressiva

Pb – pares de base

PBS – tampão salina-fosfato

PC – periodontite crônica

PE – ficoeritrina

PercP-CY5.5- peridina-clorofila conjugada à estreptavidina

PI – perda de inserção

RANK-L - ligante do receptor do fator nuclear κ B

RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNAm – RNA mensageiro

RPMI – (*Rosweel Park Memorial Institute*) meio de cultura

S – segundos

SSC – *side scatter*

SNP – polimorfismo de nucleotídeo único

SP – São Paulo

Taq – enzima de restrição *Thermus aquaticus*

T – timina

T/C- troca de uma timina por uma citosina

TCR – receptor de célula T

Th1 – células T auxiliares do tipo 1

Th2 – células T auxiliares do tipo 2

Th17 – células T auxiliares do tipo 17

TLR – receptor do tipo Toll

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

χ^2 – qui-quadrado

μ l – microlitro

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
Considerações gerais sobre a doença periodontal.....	1
Reatividade inflamatória na doença periodontal.....	4
Ativação linfocitária: papel de moléculas co-estimuladoras.....	11
Polimorfismos gênicos e a susceptibilidade à doença periodontal.....	13
2 – JUSTIFICATIVA.....	20
3 – OBJETIVOS.....	22
3.1 - Objetivo geral.....	22
3.2 - Objetivos específicos.....	22
3.2.1 - PARTE I.....	22
3.2.2 - PARTE II.....	23
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 - PARTE I – ESTUDO GENOTÍPICO.....	24
4.1.1 – Seleção dos pacientes.....	24
4.1.2 - Avaliação dos polimorfismos gênicos.....	28
4.1.3 – Obtenção das amostras e extração do DNA.....	29
4.1.4 - Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
4.1.5 - Digestão dos produtos de PCR.....	32
4.1.6 - Eletroforese.....	33
4.2 – PARTE II – ESTUDO FENOTÍPICO.....	36
4.2.1- Avaliação da expressão fenotípica de moléculas co-estimuladoras CD28 e CTLA-4, citocinas IFN- γ e IL-17 e moléculas citotóxicas, granzima A e perforina, em células do sangue total provenientes de indivíduos sem a doença periodontal, com periodontite agressiva e periodontite crônica, após culturas com diferentes LPS.....	36
4.2.2 – Coleta do sangue e obtenção de leucócitos após cultura com os LPS de <i>P. gingivalis</i> e <i>E. coli</i>	37
4.2.3 – Imunofluorescência para avaliação fenotípica de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas.....	38
4.2.4 - Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo.....	40
4.3 – Análise estatística.....	44
5 – RESULTADOS.....	47

5.1 - PARTE I – ESTUDO GENOTÍPICO.....	47
5.1.1- Polimorfismos T/C (+17) <i>CD28</i> e A/G (+49) <i>CTLA-4</i>	47
5.1.2- Polimorfismo C/A (-592) <i>IL-10</i>	47
5.1.3- Polimorfismo C/T (-819) <i>IL-10</i>	50
5.1.4 – Polimorfismo G/A (-1082) <i>IL-10</i>	52
5.1.5 – Análise Multivariada.....	54
5.1.6- Análise de Desequilíbrio de Ligação.....	58
5.2 - PARTE II – ESTUDO FENOTÍPICO.....	60
5.2.1 – Avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras <i>CD28</i> e <i>CTLA-4</i>	61
5.2.2- Avaliação de citocinas inflamatórias e moléculas citotóxicas por células de indivíduos sem a doença periodontal, com periodontite agressiva e periodontite crônica, na ausência ou presença de estímulo com LPS.....	68
5.2.2.1 - Avaliação da expressão de IFN- γ dentro da população total de linfócitos e frequência de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ positivas para IFN- γ	68
5.2.2.2 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção da citocina IFN- γ	72
5.2.2.3 - Avaliação da expressão de IL-17 dentro da população total de linfócitos e frequência de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ positivas para IL-17.....	75
5.2.2.4 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção da citocina IL-17.....	78
5.2.2.5 - Avaliação da expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ positivas para granzima A.....	82
5.2.2.6 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção de granzima A.....	86
5.2.2.7 - Avaliação da expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ positivas para perforina.....	89
5.2.2.8 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção de perforina...94	
6 - DISCUSSÃO.....	99
7- CONCLUSÕES.....	125
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
Anexo I - Artigo científico referente aos resultados dos polimorfismos T/C (+17) <i>CD28</i> e A/G (+49) <i>CTLA-4</i>	145

1 - INTRODUÇÃO

Considerações gerais sobre a doença periodontal

A presença da inflamação gengival, em sítios onde há perda de tecido conjuntivo e osso alveolar, caracteriza as doenças periodontais induzidas por placa (ARMITAGE, 1999). Tanto a gengivite quanto a periodontite são doenças infecciosas que afligem uma alta percentagem da população, sendo a principal causa de perda dental nos países desenvolvidos (BROTHWELL AND GHIABI, 2009).

A periodontite é causada, principalmente, por microorganismos Gram-negativos presentes na placa adjacente à gengiva, resultando no estímulo de células do hospedeiro para produzir importantes moléculas na resposta inflamatória (BAKER *et al.*, 1999). As células da mucosa bucal, tais como as células epiteliais, atuam como uma barreira física contra a invasão de organismos patogênicos (SUGAWARA *et al.*, 2002) e, apesar de mais de 700 espécies bacterianas residirem na cavidade oral e ao menos 400 serem encontradas na placa subgengival, apenas algumas causam a doença periodontal (STATHOPOULOU *et al.*, 2010). Atualmente, acredita-se que a combinação de diferentes bactérias (ou grupos de bactérias) seja importante para desencadear o processo inflamatório.

Segundo ARMITAGE (1999), duas formas principais de doença periodontal destrutiva são reconhecidas: crônica e agressiva, e grande parte dos indivíduos com periodontite induzida por placa desenvolverá a forma clínica crônica (PAPAPANOU, 1996; ALBANDAR, 2002). Com relação aos aspectos clínicos e características da periodontite crônica, a quantidade de destruição é consistente com a presença de fatores locais e associada a cálculo subgengival. Na maioria dos casos, a doença apresenta uma progressão lenta, podendo ocorrer, entretanto, períodos curtos de perda rápida de inserção (BROWN AND LÖE, 1993; SOCRANSKY *et al.*, 1984; HIGHFIELD, 2009).

A periodontite agressiva, por sua vez, é menos comum que a crônica e afeta, principalmente, indivíduos jovens (PAPAPANOU, 1996; ALBANDAR & TINOCO, 2002). Contudo, dados recentes da literatura revelam que a idade não constitui um determinante primário do diagnóstico, observando-se a ocorrência dessa forma clínica, também, em indivíduos com idade mais avançada (PICOLOS *et al.*, 2005; ARMITAGE AND CULLINAN, 2010). Com relação às suas características e aspectos clínicos, a destruição óssea e perda de inserção apresentam taxa de progressão mais rápida se comparadas à da periodontite crônica, com uma quantidade de depósitos microbianos inconsistente com a gravidade da destruição tecidual (ARMITAGE, 2004; HIGHFIELD, 2009).

Embora as bactérias sejam essenciais para o desenvolvimento da periodontite, o fato de que ela se desenvolve em graus variáveis nos diferentes indivíduos sugere uma etiologia multifatorial. A presença desses patógenos periodontais é fortemente associada com lesões periodontais destrutivas, possivelmente devido ao fato que estes expressam fatores de virulência associados com o dano aos tecidos moles e duros, perturbando a integridade tecidual por permitirem a difusão subgengival da bactéria e seus antígenos (KADOWAKI & YAMAMOTO, 2003; BOSSHARDT & LANG, 2005). Assim, as bactérias causam a destruição indiretamente por exacerbar a resposta imune do hospedeiro (NANCI & BOSSHARDT, 2006). Dentre as espécies relacionadas à doença periodontal, citam-se como predominantes: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*, e *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), sendo que esta última desempenha um papel significativo na progressão e agravamento da periodontite crônica (YUN *et al.*, 2003). Essa bactéria periodontopatogênica é intimamente associada com a destruição óssea alveolar, e possui vários componentes bioativos, tais como, componentes da membrana plasmática,

peptidoglicanas, cápsula, fímbrias e lipopolissacarídeo (LPS) na sua superfície celular que induzem uma produção excessiva de citocinas indutoras da destruição inflamatória óssea (OKAHASHI *et al.*, 2004). Um dos alvos do LPS de *P. gingivalis* são os fibroblastos gengivais, células que apresentam um papel importante no remodelamento dos tecidos moles periodontais. Eles podem funcionar, também, como reguladores da rede de citocinas nestes tecidos, por meio da produção de vários tipos de citocinas, tais como IL-1 e IL-6, quando estimulados por componentes celulares bacterianos (TAKADA *et al.*, 1991). Estudos mencionam que estas citocinas agravam a inflamação e destroem os tecidos periodontais, induzindo uma reabsorção óssea alveolar (WANG *et al.*, 1998).

Portanto, um mecanismo importante para induzir a reatividade inflamatória e, conseqüentemente, o estabelecimento de doença, é a ativação celular por componentes bacterianos. O LPS é uma molécula anfipática, cuja endotoxicidade se deve ao seu constituinte estrutural chamado lipídeo A, porção sujeita a variações entre as espécies bacterianas. Dados da literatura demonstram que apesar de ser altamente conservado, podem existir diferenças estruturais importantes no LPS entre diferentes espécies bacterianas, o que levaria a alterações significantes na resposta do hospedeiro (KUMADA *et al.*, 1995). No caso do *P. gingivalis*, por exemplo, estas alterações poderiam ser explicadas, provavelmente, pelo fato do lipídeo A conter longas cadeias de ácidos graxos 3-hidróxi, com cerca de 15 a 17 átomos de carbono, enquanto que no LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*), uma bactéria não periodontopatogênica, o lipídeo A é constituído, principalmente, pelo ácido 3-hidroxitetradecanóico. Essas diversidades seriam responsáveis, também, pelo potencial endotóxico moderado do LPS de *P. gingivalis* em relação ao LPS de *E. coli* (KOGA *et al.*, 1985), contribuindo de modo importante para a resposta imune do hospedeiro.

Essa interação explica o início da reação inflamatória, assim como sua perpetuação e consequente perda óssea. A primeira proteína a ser identificada como um receptor para LPS, envolvida com o reconhecimento bacteriano inicial, foi o CD14, expresso predominantemente na superfície de monócitos, macrófagos e neutrófilos (WRIGHT *et al.*, 1990), promovendo a ativação de receptores tipo Toll (TLR) (MADIANOS *et al.*, 2005). Moléculas de LPS ligam-se, via lipídeo A, à proteína de ligação ao LPS (LBP). O LPS, ao ser liberado da superfície bacteriana, liga-se ao CD14 solúvel ou de membrana por meio da proteína sérica LBP. Assim, a presença do complexo LBP/CD14/LPS na membrana resultará na ativação de tipos celulares responsivos ao LPS (WRIGHT *et al.*, 1990). HAZIOT (1998) relatou que camundongos deficientes em CD14 eram hiporresponsivos ao LPS, sugerindo o papel crítico de CD14 no processo de ativação celular. KAMADA *et al.* (2005) demonstraram que macrófagos intestinais CD14⁺ produziam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-23, TNF- α e IL-6 em resposta a estímulo bacteriano, sugerindo sua ação pró-inflamatória na patogênese de doenças intestinais. Assim, o reconhecimento bacteriano por células do sistema imunológico tem um papel fundamental no estabelecimento e manutenção de inflamação. A ativação de TLRs, por sua vez, apresenta papel importante tanto na resposta imune inata, mediante indução da atividade antimicrobiana e consequente produção de citocinas inflamatórias, bem como para início e desenvolvimento da imunidade adaptativa, por meio da indução de moléculas co-estimuladoras e citocinas (TAKEDA *et al.*, 2003).

Reatividade inflamatória na doença periodontal

Para que uma reação inflamatória seja iniciada é necessário ocorrer interações entre endotélio vascular e leucócitos, incluindo migração e recrutamento celular,

expressão de moléculas de adesão e secreção de mediadores quimiotáticos. Portanto, a ativação do endotélio vascular é um evento chave no início do fenômeno (SAHNOUN *et al.*, 1998).

Os leucócitos representam a primeira linha de proteção contra os patógenos periodontais, sendo que a interação entre eles e o biofilme leva à liberação de enzimas, síntese e secreção de moléculas pró-inflamatórias dentro dos tecidos circundantes. A presença de enzimas danificadoras de tecidos e outros mediadores inflamatórios contribuem para a resposta inflamatória e perda de inserção. Tem sido proposto que grande parte da destruição observada na doença periodontal agressiva é resultado da hiperatividade de leucócitos nestes indivíduos (SCHENKEIN, 2006).

Mesmo levando-se em consideração a importância dos mecanismos de imunidade inata na doença periodontal, é importante salientar a atuação da imunidade adquirida, principalmente, por meio dos linfócitos T (SCHENKEIN, 2006). Os principais componentes da imunidade mediada por célula são os linfócitos T, subdivididos em $T\ CD4^+$ e $T\ CD8^+$, com base na função e expressão de antígenos de superfície. Existem ainda subpopulações minoritárias classificadas como $CD4^-CD8^-$ e $CD4^+CD8^+$, que têm recebido especial atenção pelo seu importante papel nos mecanismos de regulação na resposta imune humana (RAZA *et al.*, 2010; VILLANI *et al.*, 2010 e GAO *et al.*, 2011). No entanto, na doença periodontal, a grande maioria dos estudos concentra-se nas populações $CD4^+$ e $CD8^+$. Enquanto há relatos que mostram uma razão $CD4/CD8$ diminuída em pacientes com periodontite agressiva (PIETRUSKA *et al.*, 2002; SIGUSCH *et al.*, 2006), outros evidenciam essa razão aumentada em relação a controles (KATZ *et al.*, 1988, TAKAHASHI *et al.*, 1995). Dados conflitantes quanto às proporções dessas células nos tecidos periodontais podem estar relacionados às diferenças tanto na atividade da doença e/ ou tipos de bactérias presentes no ambiente

local (MATHUR & MICHALOWICZ, 1997). Isso é sugerido através de estudos nos quais populações reativas a *P. gingivalis* apresentavam aproximadamente números iguais de CD4⁺ e CD8⁺, enquanto populações reativas a *Fusobacterium nucleatum* eram principalmente CD4⁺, indicando que antígenos bacterianos que estimulam as subpopulações de células T podem ser espécie-específicos. Estes achados sugerem, aparentemente, que a razão CD4/CD8 não é um fator claro de susceptibilidade para a doença periodontal, mas que a análise do estado funcional dos linfócitos é de fundamental importância na compreensão do papel que essas células desempenham na doença periodontal.

Estudos têm revelado a predominância de subpopulações distintas de células T em diferentes fases da doença, sendo possível notar que a transição de uma gengivite para uma periodontite é acompanhada por uma mudança nas populações linfocíticas no infiltrado inflamatório de uma lesão dominante em células T e com poucas células B para uma com proporção aumentada de células B e plasmócitos (GEMMELL *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2010; ARTESE *et al.*, 2011).

Após a ativação por patógenos, células T CD4⁺ virgens diferenciam-se em subpopulações com funções efetoras distintas que mobilizam outros tipos celulares com a habilidade de remover, efetivamente, os patógenos invasores. Baseado nos fenótipos de citocinas foi proposta, inicialmente, a existência de duas subpopulações distintas de células T helper, Th1 e Th2 (MOSMANN AND COFFMAN, 1989). Células Th1 preferencialmente produzem IL-2 e IFN- γ e medeiam proteção contra patógenos intracelulares, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13, sendo efetivas na remoção de patógenos extracelulares (OKADA *et al.*, 1983). IFN- γ apresenta múltiplos efeitos imunoreguladores, medeia a defesa do hospedeiro contra a infecção e é considerada a principal citocina ativadora de fagócitos. Estudos relatam que sua

liberação ocorre em estágios recente e tardio da resposta imune pelas células NK e células T ativadas, respectivamente (SCHRODER *et al.*, 2004). Concernente ao seu papel na patogênese da periodontite, GARLET *et al.* (2008) mostraram que camundongos deficientes em IFN- γ desenvolveram uma periodontite de menor gravidade em resposta à infecção por *A. actinomycetemcomitans*. No diz respeito à atuação desta citocina na patogênese da periodontite em humanos, os dados são contraditórios. Enquanto alguns pesquisadores mencionaram a falta de relevância do IFN- γ na progressão da periodontite (SUÁREZ *et al.*, 2004), outros demonstraram altos níveis dessa citocina nas lesões periodontais progressivas (HONDA *et al.*, 2006). No âmbito da contribuição das fontes celulares para a produção dessa citocina na doença periodontal, informações sobre a heterogeneidade funcional de células circulantes do sistema de defesa do hospedeiro são raramente mencionadas (PETIT *et al.*, 2001). Diante do exposto, destaca-se a relevância de mais estudos sobre a citocina inflamatória IFN- γ , a fim de se obter uma maior compreensão de seu papel na imunopatologia da doença periodontal.

Baseados no domínio dos parâmetros imunológicos pertinentes aos estágios da doença periodontal, GEMMELL & SEYMOUR (1994) propuseram que os linfócitos dominantes na lesão estável são células Th1 CD4⁺, enquanto a lesão progressiva envolve células Th2, as quais secretam citocinas que atuam, principalmente, nas células B. Por outro lado, TAKEICHI *et al.* (2000) relataram que citocinas tipo Th1 são encontradas em todo o tecido doente, enquanto perfis de citocinas Th2 são menos proeminentes. Essa observação havia sido constatada, também, por SALVI *et al.* (1998) que obtiveram níveis elevados de citocinas Th1 no fluido crevicular gengival de indivíduos com periodontite, indicando que um desequilíbrio na produção das citocinas pode afetar a indução da reabsorção óssea alveolar (BAKER *et al.*, 1999; TAUBMAN

& KAWAI, 2001). Entretanto, o fenótipo celular predominante dentro de uma lesão depende tanto da atividade da doença quanto da presença de bactéria específica na bolsa periodontal (GEMMEL *et al.*, 2002). Células T tipo Th1 regulam positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α , que induzem a reabsorção óssea, indiretamente, por promover a diferenciação de precursores osteoclásticos e ativar os osteoclastos, via produção de RANK-L (ligante do receptor do fator nuclear κ B) pelas células osteoblásticas. Experimentos comprovaram que, para maximizar a expressão de RANK-L, eram necessários os sinais co-estimuladores provenientes do receptor de célula T (TCR) e do CD28 (TAUBMAN & KAWAI, 2001). Estudos mencionaram que a perda óssea alveolar, após infecção oral com *P. gingivalis*, foi diminuída em camundongos deficientes em células T CD4⁺ (BAKER *et al.*, 1994), enquanto que após a infecção oral com *A. actinomycetemcomitans* não houve qualquer alteração na perda óssea em camundongos deficientes em células T CD8⁺ (TENG, 2003), implicando o papel destrutivo das células T CD4⁺ na destruição óssea tecidual.

CHOI *et al.* (2001) relataram que a osteoclastogênese é aumentada pelas células B ativadas, mas suprimida pelas células CD8⁺ ativadas. Enquanto alguns estudos em periodontite crônica revelaram uma maior proporção de células CD8⁺ (PIETRUSKA *et al.*, 2002), outros identificaram um proporção aumentada de CD4⁺ (VERNAL *et al.*, 2005), LIMA (2003), por sua vez, ao estudar indivíduos com periodontite crônica, observou uma maior ativação de linfócitos T CD8⁺ em pacientes com menor grau de dano tecidual, o que sugeriu um papel protetor para estas células. Contudo, a literatura ainda não fornece dados suficientes sobre o verdadeiro papel exercido por esses linfócitos na doença periodontal. Portanto, a avaliação da participação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ no mecanismo da periodontite poderá auxiliar alternativas de intervenção com promissoras medidas terapêuticas.

Além das células Th1 e Th2, descobriram-se, recentemente, as células Th17 que produzem a citocina IL-17 e exibem funções efetoras distintas (LANGRISH *et al.*, 2005). Estas são caracterizadas, principalmente, pela produção de IL-17A, e atuam na remoção de patógenos extracelulares não eliminados efetivamente pelas células Th1 ou Th2. Por meio da indução potente de quimiocinas, células Th17 surgem em sítios de inflamação com uma cinética rápida, estabelecendo uma comunicação entre imunidade inata e adaptativa, atraindo outras subpopulações de células Th, como células Th1, para sítios de infecção. Isso tem sido demonstrado, por exemplo, no caso de infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* (KHADER *et al.*, 2007). Embora estudos prévios relatassem que células Th 17 são as principais produtoras de IL-17A, essa citocina pode também ser produzida por células T CD8⁺, além de células do sistema imune inato, tais como neutrófilos, células T $\gamma\delta$ e NK T, sendo todas essas células encontradas em lesões periodontais (ADIBRAD *et al.*, 2012). Estudos sugerem que IL-17 medeia a inflamação por estimular a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e quimiocinas que promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007), amplificando a reação inflamatória e subsequente aumento na destruição dos tecidos periodontais (GARLET, 2010). Entretanto, a atuação da IL-17 na doença periodontal ainda é controversa, sendo que alguns relatos clínicos sugerem um papel patogênico para essa citocina (VERNAL *et al.*, 2005), enquanto outros mencionam um papel defensor (YU *et al.*, 2007). Considerando-se que IL-17 é um importante regulador na defesa do hospedeiro, mais estudos são necessários para verificar o papel dessa citocina na destruição óssea periodontal, bem como identificar a sua fonte produtora.

O desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺ requer o reconhecimento de peptídeos antigênicos estranhos por moléculas MHC classe I. Como a maioria dos

microrganismos periodontais são patógenos extracelulares, o reconhecimento ocorre mais, frequentemente, por moléculas MHC classe II. Contudo, três patógenos periodontais, *A actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *Treponema denticola*, parecem invadir o epitélio sulcular gengival para garantirem sua sobrevivência e, como resultado, T CD8⁺ poderiam ser ativados para desempenhar as funções efetoras potenciais (TENG, 2003).

Um dos mecanismos pelo qual células citotóxicas exercem seus efeitos antimicrobianos compreende a lise direta das células alvo infectadas por meio da via perforina/ granzima ou via Fas/ Fas-L (Fas-ligante) (LIEBERMAN, 2003). Os grânulos citotóxicos contêm a perforina, proteína formadora de poros, e uma família de serino proteases, conhecidas como granzimas. Ambas as moléculas têm a sua expressão relacionada às células NK, linfócitos T citotóxicos (PETERS *et al.*, 1991), NK T (HODGE *et al.*, 2012) e células T $\gamma\delta$ (ACCARDO-PALUMBO *et al.*, 2004). Destas, as células NK e T $\gamma\delta$ expressam e estocam granzimas, constitutivamente, enquanto que em linfócitos T, a produção do RNAm de granzima e proteínas deve ser induzida seguindo a exposição ao antígeno. LIU *et al.* (1995) relataram que, em camundongos, granzimas são expressas, principalmente, por células T CD8⁺ e, em menor proporção, por células T CD4⁺.

Entre as serino proteases mais abundantes, em humanos, estão as granzimas A e B. Esta última apresenta atividade apoptótica mais intensa quando comparada às demais, devido a sua habilidade semelhante à caspase. A primeira, por sua vez, tem uma atividade apoptótica mais fraca que a granzima B, entretanto trata-se de uma triptase que pode amplificar a morte celular mediada por granzima B (SHRESTA *et al.*, 1999). Em adição ao seu papel na apoptose, a granzima A também apresenta efeitos extracelulares, por aumentar a inflamação através da clivagem do propeptídeo de IL-1 β ,

citocina associada com a reabsorção óssea periodontal, e ativar macrófagos (IRMLER *et al.*, 1995; LIEBERMAN, 2010). Análises de FARIA *et al.* (2005) revelaram que, em lesões de leishmaniose cutânea, células CD8⁺ eram responsáveis por 70% da expressão total da granzima A, revelando a importante ação citotóxica dessas células. A importância da granzima A em processos imunopatológicos tem sido suportada por vários estudos que relataram frequências aumentadas de linfócitos T citotóxicos e células NK expressando essa molécula em desordens tais como rejeição de transplante (KUMMER *et al.*, 1995). NAPOLI *et al.* (2012) demonstraram que níveis aumentados de granzima A e perforina pelas células T CD8⁺ correlacionaram-se com a gravidade da doença em indivíduos com sepse, reforçando a necessidade de se avaliar o papel das células citotóxicas ativadas. Apesar do fato de que essas moléculas efetoras citolíticas são essenciais para as respostas imunes contra células infectadas, estas moléculas também podem danificar os tecidos do hospedeiro (TREMBLAY *et al.*, 2000). Entretanto, no contexto da doença periodontal humana, não existem informações sobre a atuação dessas proteínas, nem sobre os níveis das mesmas e suas fontes produtoras, levantando a necessidade de tais estudos para uma melhor compreensão no mecanismo de destruição tecidual presente nas lesões periodontais.

Ativação linfocitária: papel de moléculas co-estimuladoras

A ativação completa das células T virgens se faz por meio da sinalização pelo complexo peptídeo-MHC/TCR e a participação de moléculas co-estimuladoras, cuja atuação tem sido importante na resposta imune humoral e na regulação da função celular (LENSCHOW *et al.*, 1996). As moléculas co-estimuladoras melhor estudadas são CD28 e CTLA-4, que possuem funções opostas. Tipicamente, células apresentadoras de antígenos expressam moléculas co-estimuladoras como B7-1 (CD-80) e B7-2 (CD86) que amplificam a sinalização do TCR por meio de seu receptor

correspondente, o CD28, liberando um estímulo direto para ativação das células T. Outro receptor para moléculas B7 é o CTLA-4, um homólogo do CD28, que apresenta um papel essencial por limitar as respostas proliferativas das células T ativadas aos antígenos (McCOY & LE GROS, 1999; ALEGRE *et al.*, 2001). KAWAI *et al.* (2000) mostraram que CTLA-4 Ig eliminou a resposta imune Th1 associada com a destruição óssea periodontal, em um modelo experimental de periodontite em rato, comprovando o papel do CTLA-4 como um regulador negativo. A sua atuação, como um inibidor da co-estimulação CD28/B7, também ficou evidente através do uso da imunoglobulina solúvel do CTLA-4 em vários modelos animais de doenças auto-imunes, rejeição de transplantes, asma e alergia (WANG & CHEN, 2004).

Tem-se relatado que as interações CD28/B7 podem influenciar os perfis de citocinas de células T (LINSLEY *et al.*, 1992) e vários estudos apontam as citocinas Th1, e não Th2, como responsáveis por disparar a reabsorção óssea periodontal, o que tem sido sustentado por relatos de vários autores, em que os níveis de IL-2 no fluido crevicular gengival são significativamente os mais altos nas bolsas periodontais ativas (LEE *et al.*, 1995; SHADDOX *et al.*, 2011). Entretanto, a inibição da resposta proliferativa pelo CTLA-4 parece ser uma consequência da interrupção do estágio G0/G1 do ciclo celular, sendo resultado, provavelmente, da produção diminuída de IL-2 (KRUMMEL & ALLISON, 1996). O papel crítico do CTLA-4 foi ilustrado em camundongos deficientes nessa molécula, os quais morreram dentro de 3 a 4 semanas após o nascimento, devido à infiltração linfocitária maciça e destruição tecidual nos órgãos críticos (CARRENO & COLLINS, 2002; SHARPE & FREEMAN, 2002).

Dada a etiologia multifatorial da doença periodontal, várias evidências apontam a interferência de fatores de risco do hospedeiro para a probabilidade aumentada de ocorrência e progressão dessa patologia, incluindo o fumo, doenças sistêmicas como o

diabetes mellitus e fatores genéticos (KINANE *et al.*, 2006). Esses últimos, por sua vez, têm influenciado significativamente a resposta do hospedeiro. Estudos realizados em gêmeos com periodontite crônica têm indicado uma maior concordância nas medidas periodontais em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos, não havendo contribuição dos fatores ambientais para esta diferença (COREY *et al.*, 1993; MICHALOWICZ *et al.*, 2000), sugerindo que a variação genética exerça um papel importante na expressão da doença (SCHENKEIN, 2006).

Polimorfismos gênicos e a susceptibilidade à doença periodontal

A contribuição genética para a periodontite tem sido verificada a partir da análise de polimorfismos genéticos, sobretudo daqueles que podem levar a variações na expressão fenotípica (LAINE *et al.*, 2010). O polimorfismo é definido como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% na população. O *locus*, local ocupado por um gene no cromossomo, é considerado polimórfico se o alelo mais raro tem frequência de pelo menos 1% e os heterozigotos portadores desse alelo ocorram numa frequência superior a 2% (MILLER *et al.*, 2001). A forma mais comum é o polimorfismo de um nucleotídeo (SNP), caracterizado pela mudança de um par de bases no DNA genômico (NIELSEN, 2004), que pode afetar as funções gênicas, estando relacionado a mudanças na expressão protéica, estrutura e função.

Dados da literatura relatam que polimorfismos em regiões promotoras podem gerar alterações na transcrição do gene, enquanto que na região de éxons podem alterar a sequência da proteína e sua consequente função biológica (TAYLOR *et al.*, 2004). Adicionalmente, polimorfismos presentes nos íntrons, regiões não codificadoras dos genes, influenciam a expressão da molécula, por constituir regiões de interação com

fatores de transcrição (ROSE, 2008). Essas variações genéticas podem identificar pacientes de alto risco para o desenvolvimento de respostas inflamatórias anormais. Devido a isso, há um grande interesse em explorar polimorfismos de um nucleotídeo em genes envolvidos no controle de cascatas inflamatórias, podendo ser usados para identificar potenciais marcadores de susceptibilidade e gravidade, auxiliando, de maneira importante, na intervenção terapêutica (MOREIRA *et al.*, 2005).

A maioria das pesquisas realizadas com o estudo de polimorfismo gênico é direcionada para as citocinas e polimorfismos funcionais nesses genes têm sido associados a doenças de caráter inflamatório ou auto-imune. Nesse sentido, uma plethora de estudos está disponível na literatura, entretanto, sem a pretensão de esgotar o assunto que é extremamente vasto e engloba inúmeras doenças distintas, estão aqui representados estudos relevantes para o atual trabalho.

Estudos prévios demonstraram que a variação na produção de IL-10 é geneticamente determinada e se relaciona, principalmente, a variações na região promotora do gene da IL-10 humana que se localiza no cromossomo 1 (KIM *et al.*, 1992). Alguns dos polimorfismos referentes a essa citocina, amplamente descritos na literatura, situam-se nos *loci*: -592 (C/A), -819 (C/T) e -1082 (G/A), sendo que as respectivas variantes polimórficas A, T e A estão associadas a uma menor secreção de IL-10 (TURNER *et al.*, 1997). SHIH *et al.* (2005) constataram que polimorfismos nas regiões do promotor de IL-10 (-592, -819 e -1082) foram significativamente associados com susceptibilidade ao câncer pulmonar. ACHYUT *et al.* (2008) observaram que a variante polimórfica T no *locus* -819 da IL-10 promoveu o desenvolvimento da inflamação e risco de gastrite. Estudos realizados por ZHU *et al.* (2011), em asiáticos com câncer gástrico, revelaram o papel protetor do genótipo AA de IL-10 -592 no desenvolvimento dessa patologia. Dados obtidos por COSTA *et al.* (2009)

demonstraram associação entre a variante polimórfica A no *locus* -1082 da IL-10 e o desenvolvimento da cardiomiopatia em indivíduos chagásicos. YING *et al.* (2011) verificaram diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas no *locus* -592 no gene da IL-10 entre pacientes com artrite reumatóide e indivíduos sem a doença, com consequente associação entre esse polimorfismo e níveis séricos de IL-10.

Referente à doença periodontal, polimorfismos da IL-10 nas regiões do promotor, acima mencionadas, têm revelado dados interessantes. SCAREL-CAMINAGA *et al.* (2004) obtiveram maior prevalência do haplótipo ATA em brasileiros com periodontite crônica que nos indivíduos do grupo controle. Adicionalmente, CULLINAN *et al.* (2008) relataram que australianos fumantes com o haplótipo ATA seriam mais susceptíveis em desenvolver a doença do que os não fumantes, evidenciando que a manifestação da periodontite resulta de uma interação dos genes com fatores ambientais, como o fumo. Portanto, o estudo dos polimorfismos nas regiões do promotor da citocina IL-10 e sua interação com fatores ambientais, por meio de análises de regressão logística, tornam-se cruciais para uma melhor compreensão acerca de sua atuação na doença periodontal. MOREIRA *et al.* (2009), por sua vez, estudando apenas o polimorfismo -1082 em indivíduos brasileiros com periodontite crônica e agressiva, não encontraram associação deste polimorfismo com a doença periodontal.

A citocina IL-10 apresenta um papel importante na regulação imune, sendo secretada por inúmeros tipos celulares do sistema imune adaptativo; incluindo subpopulações Th1, Th2, Th17, células T reguladoras, células T CD8⁺ e células B, bem como por células do sistema imune inato, incluindo células dendríticas, macrófagos, células NK, eosinófilos e neutrófilos (SARAIVA AND O'GARRA, 2010). Dentre as suas funções, ela inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IFN- γ ,

mas promove o aumento na proliferação e diferenciação de células B (HAJEER *et al.*, 1998). CLAUDINO *et al.* (2010) demonstraram a presença de uma perda óssea alveolar significativa em camundongos deficientes em IL-10. Estudos conduzidos em humanos revelaram níveis aumentados da IL-10 em sítios provenientes de indivíduos com periodontite agressiva quando comparados aos níveis obtidos de sítios saudáveis, enfatizando o seu importante papel na doença periodontal (SHADDOX *et al.*, 2011). Considerando-se o largo espectro de funções imunológicas nas quais esta citocina está envolvida e que a capacidade individual para a produção da IL-10 parece estar sob influência genética, foi proposto avaliar a ocorrência dos polimorfismos funcionais do gene da IL-10 na tentativa de se caracterizar possíveis biomarcadores com a susceptibilidade à periodontite.

Apesar de diversos estudos abordarem as associações de polimorfismos em genes que codificam para citocinas e a doença periodontal, a literatura mostra-se escassa com relação ao estudo de polimorfismos em genes de moléculas co-estimuladoras na doença periodontal. Sabendo-se que a interação do CTLA-4 e do CD28, com seus ligantes B7-1 e B7-2, apresenta um papel fundamental para ativar células T, a análise dos polimorfismos destas moléculas mostra-se necessária para a compreensão de doenças inflamatórias e auto-imunes (HEINZMANN *et al.*, 2000), sendo que nesta última classe de doenças tem sido realizada a maior parte das análises genéticas.

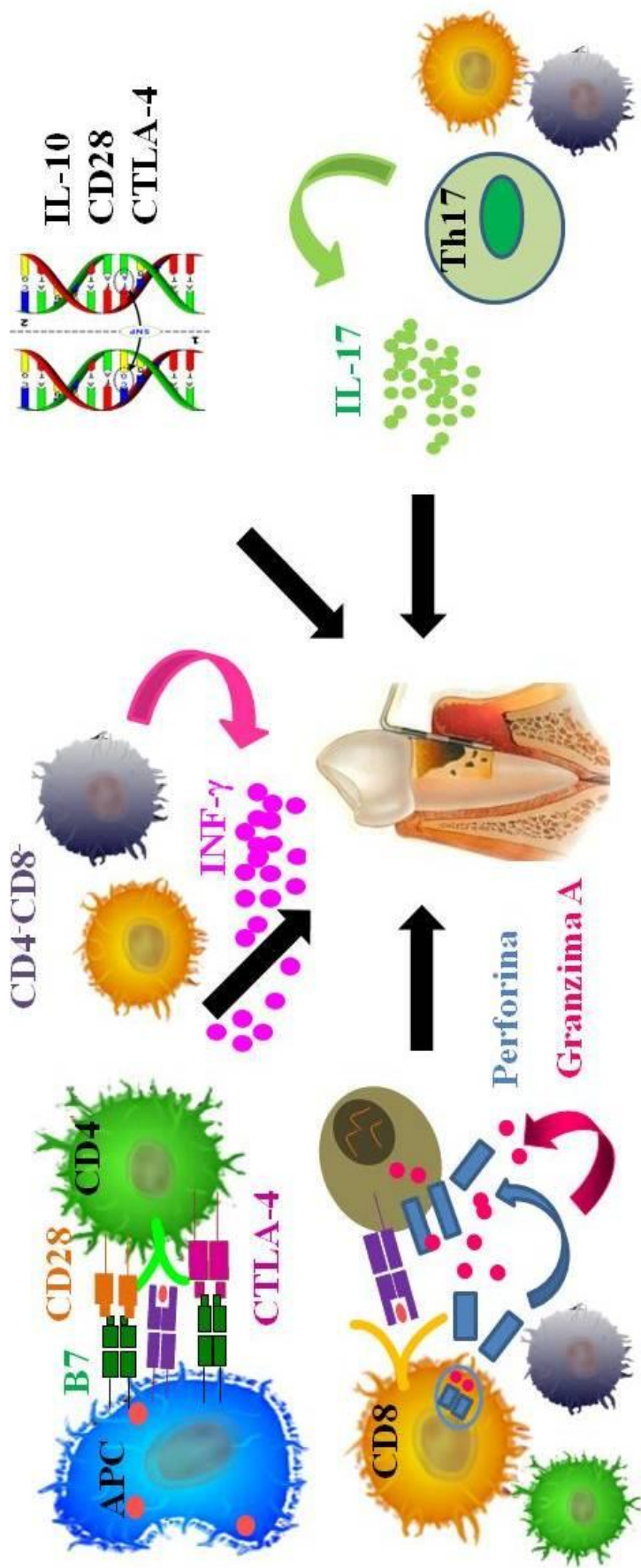
Dados da literatura descrevem a presença de um polimorfismo (T/C) situado no 3º íntron do gene do CD28 (+17), cujo papel funcional pode estar implicado no splicing do RNAm (AHMED *et al.*, 2001). IHARA *et al.* (2001) encontraram associação deste polimorfismo com diabetes tipo I em uma população japonesa. Entretanto, isso não foi constatado em alemães com a referida doença (WOOD *et al.*, 2002).

O polimorfismo do CTLA-4 no *locus* +49 A/G, caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina, leva a uma substituição aminoácida no peptídeo líder. É possível que o polimorfismo A/G do CTLA-4 afete a estabilidade do RNAm, sendo que o genótipo GG neste *locus* foi demonstrado estar associado com menor expressão superficial de CTLA-4, após estímulo, e consequente proliferação aumentada da célula T (NISTICO *et al.*, 1996). Estudos demonstraram que a variante polimórfica G, no *locus* +49 do CTLA-4, está associada com doenças auto-imunes; tais como diabetes mellitus (DONNER *et al.*, 1997; WOOD *et al.*, 2002) e esclerose múltipla (SUPPIAH *et al.*, 2005). Considerando a atuação fundamental dessas moléculas co-estimuladoras na resposta imune, torna-se importante investigar o envolvimento dos polimorfismos dos genes *CD28* (+17 T/C) e *CTLA-4* (+49 A/G) na patogênese da doença periodontal em indivíduos brasileiros, já que informações sobre estes *loci* são escassas na periodontite.

Diante do exposto, esse projeto de pesquisa baseou-se nas seguintes hipóteses: (1) polimorfismos nos genes que codificam para moléculas co-estimuladoras e polimorfismos em regiões do promotor da citocina IL-10 estão associados ao desenvolvimento de doença periodontal e/ou uma maior ou menor perda de inserção clínica da mesma e (2) alterações na frequência e produção de citocinas e moléculas citotóxicas por subpopulações celulares estão associadas ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença periodontal. Assim, propõe-se avaliar a ocorrência dos polimorfismos gênicos de moléculas co-estimuladoras e polimorfismos no promotor da citocina IL-10 em indivíduos com diferentes formas clínicas da doença, com o intuito de se identificar potenciais marcadores de susceptibilidade e gravidade. Uma proposta adicional compreendeu a análise da expressão funcional de moléculas co-estimuladoras para avaliar a sua importância na patogênese da doença periodontal. Além disso, de acordo com o método proposto neste estudo, acredita-se que a avaliação

do perfil imune de citocinas importantes na patogenia da doença periodontal, além da determinação do potencial citotóxico de células presentes no sangue periférico de indivíduos com as diferentes formas clínicas da periodontite poderão servir como uma ferramenta útil para a criação de medidas profiláticas eficazes no combate à periodontite.

O esquema 1, identificado a seguir, mostra resumidamente alguns eventos imunológicos associados à doença periodontal, assim como o enfoque nos parâmetros avaliados neste trabalho.



Esquema 1: Fenômenos imunológicos envolvidos na periodontite humana e hipóteses do atual estudo. A periodontite apresenta uma etiologia multifatorial e dentre os fatores genéticos envolvidos estão os SNPs, destacando-se, por exemplo, aqueles na região do promotor da IL-10, embora resultados conflitantes sobre eles têm sido fornecidos na literatura. Além disso, em indivíduos brasileiros, não se sabe qual a influência de variantes genéticas das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, que são cruciais para ativação dos linfócitos T. Para que ocorra a completa ativação das células T é necessária a atuação de dois sinais, sendo um proveniente do TCR-complexo peptídeo-MHC e o outro proveniente de moléculas co-estimuladoras CD28 e CTLA-4. Enquanto a ligação de CD28 à molécula B7 resulta na ativação de células T e secreção de citocinas, o CTLA-4, por sua vez, fornece um sinal negativo para o linfócito T de modo a conter a sua resposta proliferativa. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar o papel dessas moléculas nas formas clínicas PA e PC. Células T CD4+ ativadas produzem a citocina inflamatória IFN- γ , cujo efeito osteoclastogênico ainda não se encontra bem caracterizado em PA e PC. No âmbito da contribuição das fontes celulares para a produção dessa citocina na doença periodontal, informações sobre a heterogeneidade funcional de células circulantes do sistema de defesa do hospedeiro são raramente mencionadas. A IL-17 parece amplificar a reação inflamatória e consequente exacerbação da lesão periodontal, embora estudos sobre os níveis circulantes da mesma mostrem-se necessários para compreensão de seu papel na patogênese da periodontite, bem como identificar sua fonte produtora. Outro tipo celular também importante compreende as células T CD8 citotóxicas que exercem seus efeitos antimicrobianos por meio da via perforina/granzima. Todavia, informações sobre a expressão dessas moléculas e comprometimento de diferentes populações celulares para a produção das mesmas são inexistentes na periodontite humana.

2 - JUSTIFICATIVA

A periodontite é uma doença inflamatória resultante da presença de um biofilme no microambiente subgingival e da participação de fatores genéticos e ambientais, que influenciam a resposta imune do hospedeiro. É bem estabelecido, na literatura, que enquanto fatores ambientais e microbianos iniciam e modulam a doença periodontal, os indivíduos respondem de modo distinto a mudanças ambientais comuns, devido a um perfil genético individual (SCHENKEIN, 2006). Dados importantes têm sido fornecidos, principalmente, com relação à influência de polimorfismos genéticos de citocinas nessa doença inflamatória. Nesse contexto, é útil mencionar a controversa nos resultados descritos para os polimorfismos nas regiões do promotor da citocina IL-10, entre as mais variadas populações (GONZALES *et al.*, 2002; SCAREL-CAMINAGA *et al.*, 2004). Além disso, em indivíduos brasileiros, não se sabe qual a influência de variantes genéticas das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, que são cruciais para ativação dos linfócitos T, alegando a necessidade de que mais estudos sejam direcionados para elucidar essa questão.

É reconhecido que na resposta imune do hospedeiro às bactérias periodontopatogênicas, células do sistema imune são recrutadas a partir da circulação para os sítios inflamatórios, possuindo um papel essencial em orquestrar uma resposta imune adequada, sendo importante explorar as diferenças potenciais na reatividade dessas células, no sangue periférico, em indivíduos com ausência de doença periodontal e indivíduos com as formas clínicas PA e PC (PETIT *et al.*, 2001). De modo geral, diferenças na distribuição numérica de subpopulações leucocitárias podem não explicitar as diferenças nos níveis de citocinas que são observados entre os diferentes grupos de estudos (C, PA e PC). Dentre as citocinas estudadas amplamente na doença

periodontal, pode-se citar o IFN- γ e a IL-17, contudo dados sobre os níveis circulantes dessas citocinas não são conclusivos. Ademais, poucos são os estudos que abordam, simultaneamente, as diferenças no perfil imunológico das mesmas entre indivíduos com ausência de doença periodontal e indivíduos com as diferentes formas clínicas (DUARTE *et al.*, 2010). A literatura retrata ainda a utilização de uma grande variedade de metodologias para o estudo de moléculas importantes envolvidas com a resposta imune do hospedeiro, tais como o modelo de sangue total. Esse, por sua vez, representa um ambiente mais “fisiológico” para examinar a produção de citocinas em resposta ao LPS, desde que ocorre uma maior preservação das interações celulares (BODET *et al.*, 2006).

Trabalhos na literatura relatam que efeitos antimicrobianos exercidos pelas células citotóxicas compreendem a exocitose de grânulos contendo granzimas e perforina. Recentemente, maior atenção tem sido dispensada para as respostas citotóxicas em lesões da cavidade bucal (LAGE *et al.*, 2011), embora o papel exercido por essas moléculas, bem como a contribuição de fontes celulares para a produção das mesmas na doença periodontal sejam pouco investigados.

Diante do exposto, acredita-se que a realização desta tese, com um enfoque multifatorial, auxiliará tanto na identificação de possíveis biomarcadores de susceptibilidade e/ou gravidade da doença periodontal, quanto para uma melhor compreensão sobre o perfil imunológico e o potencial citotóxico em indivíduos com as principais formas clínicas da doença periodontal. Consequentemente, a identificação de marcadores de susceptibilidade podem nortear condutas clínicas, representando uma importante forma de prevenção à doença.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

- Avaliar a expressão genotípica e fenotípica de genes envolvidos com a resposta imune de indivíduos com doença periodontal, bem como avaliar a expressão de citocinas e moléculas citolíticas efetoras por subpopulações celulares no sangue periférico de indivíduos com as diferentes formas clínicas da doença periodontal.

3.2 - Objetivos específicos

Os objetivos listados abaixo estão divididos em Parte I, referente ao estudo genotípico e Parte II, referente ao estudo fenotípico.

3.2.1 - PARTE I

- Estudar a ocorrência de polimorfismos de genes das moléculas co-estimuladoras, CD28, CTLA-4, e polimorfismos nas regiões do promotor do gene da citocina IL-10 (*loci* -592, -819 e -1082) em indivíduos com periodontite agressiva e indivíduos com periodontite crônica, comparados a indivíduos com ausência de doença periodontal.

-Avaliar associações dos polimorfismos de genes de moléculas co-estimuladoras, CD28, CTLA-4, e polimorfismos nas regiões do promotor do gene da citocina IL-10 (*loci* -592, -819 e -1082) com uma maior ou menor perda de inserção clínica em indivíduos com periodontite agressiva e periodontite crônica.

3.2.2 - PARTE II

-Avaliar a expressão fenotípica de moléculas co-estimuladoras, CD28, CTLA-4, em células do sangue periférico, isoladas a fresco ou submetidas ao estímulo com LPS, provenientes de indivíduos com ausência de doença periodontal, indivíduos com periodontite agressiva e indivíduos com periodontite crônica.

-Avaliar o perfil inflamatório em células do sangue periférico, isoladas a fresco ou submetidas ao estímulo com LPS, provenientes de indivíduos com ausência de doença periodontal, indivíduos com periodontite agressiva e indivíduos com periodontite crônica por meio dos seguintes parâmetros:

a) Determinação da frequência de células expressando as citocinas IFN- γ e IL-17;

b) Determinação da contribuição das populações celulares para a produção dessas citocinas.

-Avaliar o potencial citotóxico em células do sangue periférico, isoladas a fresco ou frente ao estímulo com LPS, provenientes de indivíduos com ausência de doença periodontal, indivíduos com periodontite agressiva e indivíduos com periodontite crônica por meio dos seguintes parâmetros:

a) Determinação da frequência de células expressando as moléculas citotóxicas granzima A e perforina;

b) Determinação da contribuição das populações celulares para a produção dessas moléculas citotóxicas.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - PARTE I – ESTUDO GENOTÍPICO

4.1.1 – Seleção dos pacientes

Os indivíduos com doença periodontal foram triados na Clínica de Especialização em Periodontia, enquanto que os indivíduos com ausência de manifestações clínicas periodontais foram triados na Clínica de Especialização em Cirurgia Odontológica e na Clínica Integrada de Atenção Primária, todas pertencentes à Faculdade de Odontologia de Minas Gerais (FO-UFMG). Todos os indivíduos foram provenientes da mesma área geográfica e apresentaram nível socioeconômico similar. Tal informação é relevante, pois estudos relataram uma forte associação entre status socioeconômico e um maior risco de desenvolvimento da doença periodontal (ALBANDAR & RAMS, 2002). Os pacientes ou representantes legais (daqueles menores de idade) forneceram o consentimento livre e esclarecido para a participação no projeto, e de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 196/96, sobre pesquisa envolvendo seres humanos, o material biológico e os dados obtidos na pesquisa foram utilizados, exclusivamente, para a finalidade prevista no seu protocolo. Esta pesquisa atendeu os preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG sob os pareceres nº ETIC 003/03 (coleta de raspado de mucosa jugal) e CAAE- 0549.0.203.000-11 (coleta de sangue periférico). Todos os indivíduos recrutados receberam o tratamento odontológico indicado, independente de sua participação nessa pesquisa.

Os indivíduos, independentemente dos grupos aos quais pertenciam, foram voluntários e, após a obtenção de consentimento, submetidos a um questionário, objetivando-se obter informações concernentes à sua história dental, história familiar de

doença periodontal, presença ou ausência de hábito de fumar cigarros, assim como informações sobre o estado geral de saúde. Todos os sujeitos envolvidos relataram ser sistemicamente saudáveis, exceto pela presença da periodontite. Mulheres grávidas ou em período de amamentação; indivíduos sob uso aparelhos ortodônticos; uso crônico de antiinflamatórios ou quimioterapia imunossupressora; presença de doenças inflamatórias crônicas; história de diabetes mellitus; hepatite; infecção pelo vírus HIV; nefrite; presença de discrasias sanguíneas ou desordens auto-imunes foram excluídos do estudo. Esses critérios de exclusão foram descritos por vários autores (SCAREL-CAMINAGA *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2011; NIBALI *et al.*, 2011). Além disso, considerando que o fumo está associado com um aumento na perda de inserção clínica (PI) e perda do osso alveolar de suporte, representando um importante fator de risco para o desenvolvimento da periodontite (APATZIDOU *et al.*, 2005; KINANE *et al.*, 2006), os indivíduos foram estratificados em dois grupos, segundo o hábito de fumar. O grupo dos Fumantes – compreendendo antigos fumantes e indivíduos com o hábito de fumar presente (mais de 10 cigarros/dia); e Não Fumantes – indivíduos que nunca fumaram.

O diagnóstico e classificação da doença periodontal foram feitos considerando a história médica e odontológica do paciente, achados radiográficos e observações de sinais clínicos e parâmetros, incluindo profundidade de sondagem, PI, mobilidade dentária, presença de sangramento à sondagem e presença de placa bacteriana/cálculo dental, de acordo com critérios descritos previamente por MOREIRA *et al.* (2005). Medidas da profundidade de sondagem e nível de inserção foram realizadas em seis localizações em torno da cada dente, incluindo todos os dentes afetados de cada indivíduo. O diagnóstico clínico e determinação da gravidade da doença foram baseados nos critérios estabelecidos em 1999 no “International Workshop for a Classification of

Periodontal Diseases and Conditions”, de acordo com a Academia Americana de Periodontologia (ARMITAGE, 1999).

A classificação dos indivíduos nas duas principais formas clínicas (periodontite agressiva e periodontite crônica) envolveu a combinação das diferenças clínicas mencionadas acima (ARMITAGE, 1999; ALBANDAR & RAMS, 2002; NATH & RAVEENDRAN, 2011). Dessa forma, os indivíduos foram categorizados em três grupos:

1. Indivíduos do grupo C, ou seja, grupo Controle - clinicamente saudáveis que não apresentavam sinais de doença periodontal, no momento de coleta da amostra, e sem história prévia de doença periodontal determinada pela ausência de PI e ausência de sítios com profundidade de sondagem > 3 mm.
2. Indivíduos do grupo PA, ou seja, com Periodontite Agressiva - apresentando quantidades de depósitos microbianos inconsistentes com a gravidade da destruição dos tecidos periodontais, rápida progressão da doença e destruição óssea alveolar (BURMEISTER *et al.*, 1984; SÁXEN *et al.*, 1985). É mais prevalente em indivíduos jovens, mas também pode afetar indivíduos mais velhos (HIGHFIELD, 2009). Os indivíduos com essa forma clínica podem ser ainda classificados de acordo com critérios clínicos adicionais que incluem a perda de inserção proximal no sentido vertical ou defeitos ósseos com formato de arco em primeiros molares e incisivos, caracterizando a periodontite agressiva localizada; enquanto indivíduos com perda óssea interproximal afetando ao menos três dentes permanentes, além de primeiros molares e incisivos caracterizavam a periodontite agressiva generalizada.
3. Indivíduos do grupo PC, ou seja, com Periodontite Crônica – apresentando quantidade de destruição consistente com a quantidade de depósitos

microbianos, presença de cálculo subgingival, provável associação com fatores predisponentes locais e progressão lenta à moderada da doença. É bem reconhecido que esta forma clínica é mais prevalente em adultos, porém pode estar presente em indivíduos mais jovens (HIGHFIELD, 2009). Por meio de achados radiográficos, nota-se ausência de defeitos ósseos alveolares no sentido vertical ou com formato em arco, típicos de periodontite agressiva. Este grupo incluiu indivíduos com mais de três sítios com uma profundidade de sondagem > 5mm e lesões distribuídas em mais de dois dentes em cada quadrante (MOREIRA *et al.*, 2005, 2007, 2009).

Em adição à classificação clínica em PA e PC, os pacientes também foram estratificados em dois grupos, de acordo com a média da PI, ou seja, grupo de pacientes que exibiam PI maior ou igual a 5 mm ($PI \geq 5$ mm) e outro grupo de pacientes que exibiam PI maior que 3 mm e menor que 5 mm ($3 \text{ mm} > PI < 5 \text{ mm}$), dentro de cada forma clínica (PA e PC). Esta classificação objetiva investigar se os polimorfismos estão associados com a ocorrência de uma maior PI, uma medida da gravidade da doença, dentro de cada uma das formas.

Este procedimento foi realizado pela inserção de uma sonda periodontal no sulco gengival e a medida correspondente à distância da junção cimento-esmalte até a localização da ponta da sonda periodontal foi definida como PI. Dados foram obtidos como a média da PI, em todos os seis lados dos dentes afetados; seguindo os critérios previamente estabelecidos em 1999, conforme ARMITAGE (1999) e também usado por outros autores (MOREIRA *et al.*, 2005, 2007, 2009).

Na tabela 1 estão sumarizadas as características demográficas e clínicas dos grupos avaliados para estudo genotípico do polimorfismo da citocina IL-10. Com

relação às características gerais dos grupos para estudo genotípico dos polimorfismos de CD28 e CTLA-4, as mesmas encontram-se descritas no artigo em anexo no final deste volume.

GRUPOS	C	PA	PC
Número de indivíduos	77	58	73
Gênero			
Masculino (%)	34(44.16)	21(36.21)	22(30.14)
Feminino (%)	43(55.84)	37(63.79)	51(69.86)
Idade (anos)	20-58	15-46	25-67
Média da idade±desvio padrão	28±8.41	30±8.63	46±8.58
Perda de inserção média (PI) (mm) – (média ±desvio padrão)	-	6.21 ±1.55	5.65±1.27
Tabagismo			
Não fumantes (%)	71(92.21)	38(65.52)	40(54.79)
Fumantes (%)	6(7.79)	20(34.48)	33(45.21)

Tabela 1 – Características gerais da população para estudo genotípico do polimorfismo da IL-10.

C=controle; PA=periodontite agressiva; PC= periodontite crônica

4.1.2 - Avaliação dos polimorfismos gênicos

Nesta etapa realizou-se a extração do DNA das amostras de raspado de mucosa jugal. O DNA obtido foi utilizado na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), objetivando-se a amplificação de fragmentos específicos do DNA, por meio da

utilização de iniciadores (*primers*) específicos. Após a técnica de PCR, os produtos obtidos foram digeridos por enzimas de restrição específicas, com o intuito de avaliar a presença do polimorfismo RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), visto que o mesmo cria ou destrói sítios de restrição. A visualização dos fragmentos obtidos foi realizada em géis de poliacrilamida 10%. Após a confecção dos géis, os resultados foram analisados e os diagnósticos de ausência ou presença do polimorfismo estabelecidos. A obtenção e análise dos resultados nos permitiram determinar se: (1) houve ocorrência de polimorfismos nos genes analisados dentro da população estudada; (2) identificada a ocorrência desses polimorfismos, houve alguma associação com a presença da doença periodontal; (3) houve alguma associação dos polimorfismos com o estabelecimento de formas clínicas distintas; (4) houve alguma associação dos polimorfismos avaliados com uma maior ou menor PI. Desta maneira, tornou-se possível uma adequada compreensão da influência de polimorfismos em genes relacionados à resposta imunológica na doença periodontal.

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

4.1.3 – Obtenção das amostras e extração do DNA

Células contendo DNA dos indivíduos foram obtidas por meio de raspagem da mucosa bucal com o auxílio de uma espátula de plástico estéril. Em seguida, a ponta da espátula foi imersa em *eppendorf* estéril contendo solução tampão de Krebs (NaCl 20%, KCl 2%, CaCl₂ 2%, H₂O 2%, MgSO₄, KH₂PO₄, C₆H₁₂O₆) e armazenada a -20°C para posterior extração do DNA.

O DNA foi extraído por protocolo semelhante ao descrito por BOOM *et al.* (1990). O raspado da mucosa coletado em solução tampão foi submetido à centrifugação para obtenção do *pellet* das células. Após remoção do sobrenadante,

adicionou-se 450 µl de solução de lise celular L6 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4, 25 mM EDTA e 1,5% Triton X-100) e 20 µl de suspensão de sílica (SiO₂, Sigma). O material foi submetido à agitação no vórtex e, em seguida, mantido em banho seco, a 56°C, por 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 450 µl de solução de lavagem L2 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4) e as amostras novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. A seguir, uma nova lavagem com L2 foi realizada. Ao *pellet* foi adicionado 450 µl de etanol 70%, procedendo-se uma nova agitação em vórtex, centrifugação e descarte do sobrenadante. Uma nova lavagem com etanol 70% foi realizada. Posteriormente, foi adicionado ao *pellet* 450 µl de acetona 100%. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e os *eppendorfs* contendo os *pellets* das amostras foram colocados em banho seco à 56°C por 30 minutos, com as tampas abertas para completa eliminação da acetona. Finalmente, os *pellets* foram ressuspensos em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA), submetidos a uma nova agitação no vórtex e incubados, posteriormente, no banho seco a 56°C por 12 horas. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 2 minutos. O DNA desprendido da sílica e solubilizado no tampão TE foi transferido para um novo *eppendorf* estéril, previamente identificado, e armazenado a -20°C.

4.1.4 - Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi utilizado na técnica de PCR, descrita pela primeira vez por SAIKI *et al.* (1988) e consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA pela enzima DNA polimerase. Para cada gene estudado foram utilizados pares de

oligonucleotídeos denominados *primers*, que delimitam o segmento de DNA a ser amplificado e funcionam como iniciadores da reação. Foi também utilizada uma solução Pré-mix (Phoneutria) contendo desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), a enzima Taq DNA polimerase e tampão de incubação específico; a qual adicionou-se o DNA genômico a ser amplificado. As sequências de bases dos *primers* utilizados para o estudo dos polimorfismos estão descritas na tabela 2, assim como as temperaturas de anelamento, números de ciclos e o tamanho, em pares de base, dos fragmentos obtidos pela técnica de PCR. A reação ocorreu em termocicladores (Eppendorf) e foi constituída por ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (por 1 min), extensão (72°C por 1 min) e um ciclo de extensão final (72°C por 5 min). Na desnaturação, ocorre o rompimento das pontes de hidrogênio entre as cadeias de DNA. No anelamento, os *primers* se anelam às suas sequências complementares no DNA genômico e flanqueiam a região de interesse. Na extensão, a *Taq* polimerase atua sintetizando novas cadeias a partir dos *primers*. Dessa forma, a repetição desses ciclos permitiu a síntese de uma sequência específica de DNA em escala exponencial.

Genes	Locus	Sequências	Ciclos (n°)	T (°C) anelamento	Produto de PCR	Referência (primer)
CD28 rs3116496	+17 (T/C)	5'-CCT GTA TCA TTT AAT CCA CT- 3' 5'-TGG AAA AGT TAC TAA AAC C- 3'	35	52	198	HEIZMANN <i>et al.</i> , 2000
CTLA-4 rs231775	+49 (A/G)	5' -GCT CTC TTC CTG AAG ACC T- 3' 5'-AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG- 3'	30	58	162	DONNER <i>et al.</i> , 1997
IL10 rs1800872	-592 (C/A)	5'-CCT AGG TCA CAG TGA CGT GG-3' 5'-GGT GAG CAC TAC CTG ACT AGG-3'	29	60	412	SHIH <i>et al.</i> , 2005
IL10 rs1800871	-819 (C/T)	5'-AGG TAG TGC TCA CCA TGA CC-3' 5'-AGA CAA CAC TAC TAA GGC TTCT TGA GGA-3'	34	61	359	MORAES <i>et al.</i> , 2003
IL10 rs1800896	-1082 (G/A)	5' -CCA AGA CAA CAC TAC TAA GGC TCC TT-3' 5' -GCT TCT TAT ATG CTA GTC AGG TA- 3'	39	56	377	KOCH <i>et al.</i> , 2001

Tabela 2 – Polimorfismos avaliados, primers, número de ciclos, temperatura de anelamento dos primers utilizados.

Para cada reação foi realizado um controle negativo, contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA. A realização do controle negativo para cada reação permitiu confirmar a confiabilidade dos resultados obtidos, garantindo que o material amplificado não foi de uma contaminação proveniente do meio externo. Após cada reação de PCR, os produtos obtidos foram verificados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.

4.1.5 - Digestão dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram digeridos por enzimas de restrição específicas que clivam o DNA em sequências alvo, podendo, desta forma, estabelecer o genótipo do indivíduo, baseado no tamanho dos fragmentos gerados (tabela 3).

Genes	Locus	Produtos da digestão	Enzimas	Temperatura (°C)	Tempo (h)
<i>CD28</i> rs3116496	+17 (T/C)	TT=130+68pb TC=130+110+68+20pb CC=110+68+20pb	<i>MspI</i>	37	4
<i>CTLA-4</i> rs231775	+49 (A/G)	AA=162pb AG=162+88+74pb GG=88+74pb	<i>BbvI</i>	37	4
<i>IL10</i> rs1800872	-592 (C/A)	CC=412pb CA=412+236+176pb AA=236+176pb	<i>RsaI</i>	37	4
<i>IL10</i> rs1800871	-819 (C/T)	TT=359bp CT=359+294+65pb CC=294+65pb	<i>RseI</i> ou <i>MslI</i>	37	12
<i>IL10</i> rs1800896	-1082 (G/A)	GG: 253 + 97 + 27pb GA: 280 + 253 + 97 + 27pb AA: 280 + 97pb	<i>XagI</i> ou <i>EcoNI</i>	37	4

Tabela 3 – Enzimas de restrição, produtos, temperatura e tempo referentes à digestão para cada polimorfismo avaliado.

4.1.6 – Eletroforese

Para cada reação de digestão foram utilizadas 5 unidades da enzima de restrição específica para cada polimorfismo avaliado, na temperatura e tempo previamente padronizados.

Os genótipos foram determinados pela análise molecular do tamanho dos produtos da PCR verificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Para isso, utilizamos um volume entre 2 µl e 7 µl da amostra em cada canaleta. A eletroforese foi realizada em tampão tris borato EDTA (TBE) 1x, a 100 V, com intervalo de tempo de 1 a 2h. Para revelação pela prata, os géis de poliacrilamida foram submetidos a 150 ml de solução fixadora (100 ml de etanol, 5 ml de ácido acético, 1000 ml de água destilada) por 10 min, à solução de coloração (0,15g de AgNO₃, 50ml de solução fixadora e 100ml de água destilada) por 15 min, e após

lavagem em água destilada por 30 s, à 150ml da solução reveladora (15 g de NaOH, 3 ml de formaldeído, 1000 ml de água destilada) por 15 min. Ao término desse período foi possível determinar os genótipos dos polimorfismos em questão. Quando o método de revelação empregado foi o brometo de etídeo 0,1%, os géis eram levados ao sistema de captura de imagem *Nucleovision* após a eletroforese, e a imagem armazenada através do software *Nucleotech GelExpert*. O sistema consiste num computador com câmera acoplada e cabine na qual se colocou o gel, que foi visualizado com a radiação ultravioleta. Em seguida, as imagens foram digitalizadas e armazenadas em pen-drive para posterior análise.

A seguir, observam-se imagens de géis representando os produtos amplificados dos fragmentos gênicos, por meio de PCR, contendo os polimorfismos das moléculas mencionadas acima, bem como os produtos da digestão, o que permitiu determinar o diagnóstico molecular dos polimorfismos abordados neste trabalho (Figura 1).

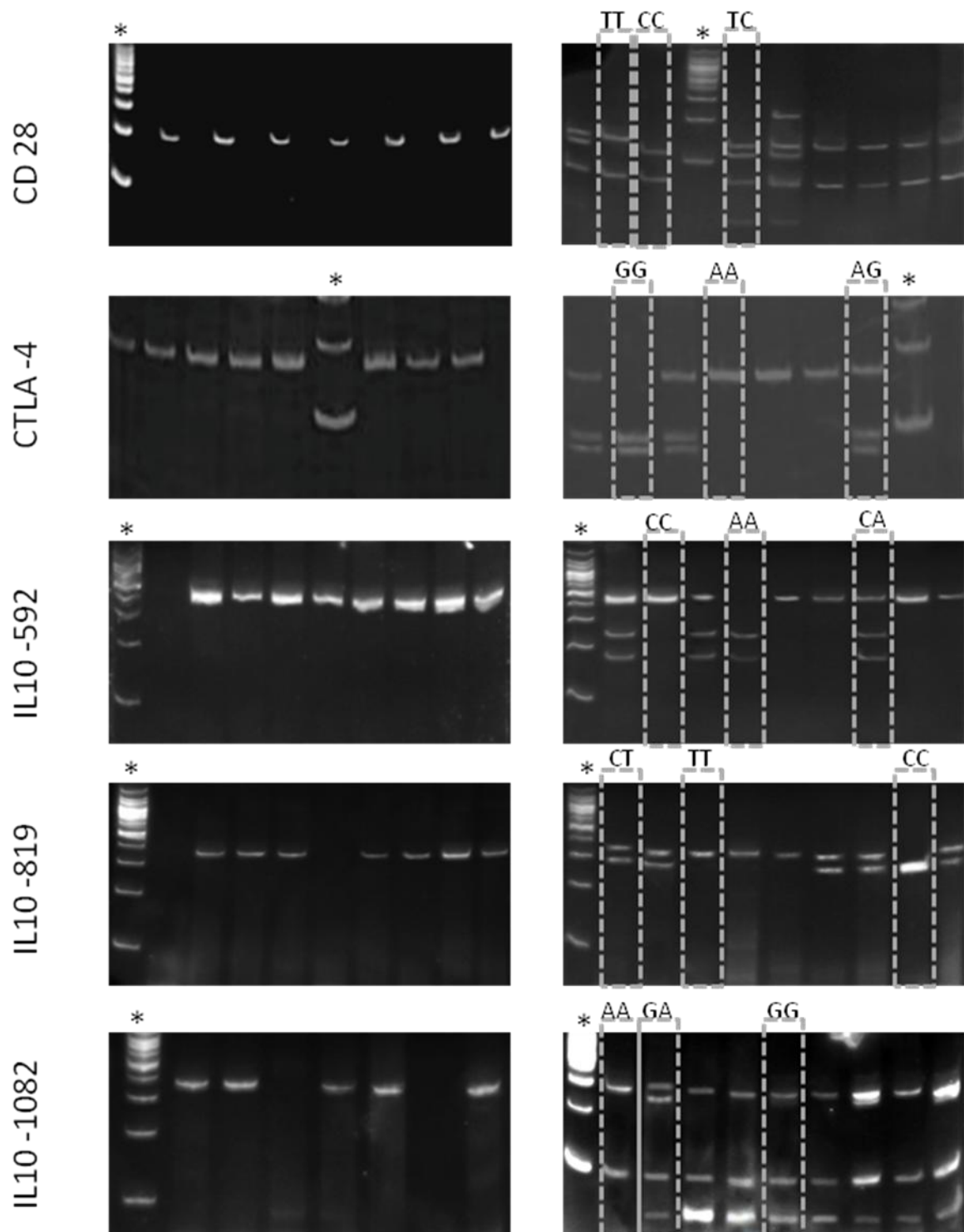


Figura 1: Fotos representativas de géis com o produto de PCR dos genes (à esquerda) e de sua digestão enzimática (à direita). CD28 (+17 T/C): PCR = 198 pb; CTLA-4 (+49 A/G): PCR = 162 pb; IL-10 (-592 C/A): PCR = 412 pb; IL-10 (-819 C/T): PCR = 359 pb e IL-10 (-1082 G/A): PCR = 377 pb. À direita, visualizam-se os diagnósticos representativos dos genótipos após tratamento enzimático, para cada gene analisado.*Padrão de peso molecular 100 pb.

4.2 – PARTE II – ESTUDO FENOTÍPICO

4.2.1- Avaliação da expressão fenotípica de moléculas co-estimuladoras CD28 e CTLA-4, citocinas IFN- γ e IL-17 e moléculas citotóxicas, granzima A e perforina, em células do sangue total provenientes de indivíduos sem a doença periodontal, com periodontite agressiva e periodontite crônica, após culturas com diferentes LPS

Para a realização desta etapa, amostras de sangue periférico foram coletadas de 30 indivíduos, categorizados da seguinte maneira: 10 indivíduos pertencentes ao grupo C (média de 27.5 anos \pm 6.65); 10 indivíduos pertencentes ao grupo PA (média de 37 anos \pm 6.68) e 10 indivíduos pertencentes ao grupo PC (média de 48.6 anos \pm 11.22). A estratificação esteve de acordo com todos os critérios já descritos no início deste capítulo de Materiais e Métodos. Tendo em vista que o fumo é um fator de risco importante para a doença periodontal, todos os indivíduos recrutados para a realização do estudo fenotípico foram não fumantes. E, assim como descrito no estudo genotípico, todos participaram voluntariamente da pesquisa. Esta segunda parte do trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG, sob o parecer CAAE- 0549.0.203.000-11.

É importante mencionar que a realização da genotipagem dos indivíduos referente aos polimorfismos gênicos das moléculas co-estimuladoras foi realizada previamente à avaliação da expressão fenotípica dessas mesmas moléculas, no qual foi avaliada a ocorrência destes polimorfismos nos indivíduos com a doença periodontal. Por meio da obtenção e análise dos resultados referentes ao estudo genotípico (E SILVA *et al.*, 2012), as seguintes observações foram possíveis: (1) para o polimorfismo do CD28, não se obteve nenhum indivíduo com o genótipo CC portador de periodontite crônica, nesse trabalho, o que inviabilizou verificar a existência de associação entre a

ocorrência do polimorfismo gênico e a expressão fenotípica da molécula CD28; (2) para o polimorfismo do CTLA-4, não se obteve associação com a ocorrência da doença periodontal, justificando a impossibilidade de se fazer qualquer inferência entre o polimorfismo analisado e a expressão da molécula nos indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Diante do exposto, a seleção dos indivíduos para o estudo fenotípico baseou-se na ausência ou presença da doença periodontal, independentemente de seus genótipos.

Para a realização das culturas, empregou-se o uso dos seguintes estímulos bacterianos: LPS da bactéria Gram-negativa associada à doença periodontal, *P. gingivalis* (Invitrogen), e o da bactéria Gram-negativa não associada à doença periodontal, *E. coli* (Sigma). Com a finalidade de se avaliar os possíveis efeitos desses diferentes LPS na resposta leucocitária nos indivíduos dos grupos C, PA e PC, foram avaliadas a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD28 e CTLA-4), de citocinas (IFN- γ e IL-17) e moléculas importantes no mecanismo de citotoxicidade (granzima A e perforina).

4.2.2 – Coleta do sangue e obtenção de leucócitos após cultura com os LPS de *P. gingivalis* e *E. coli*

Para a realização desta etapa, foram coletados, em tubos *vacutainers* heparinizados, 9 ml de sangue periférico de 30 indivíduos, com as características descritas acima. Após a coleta, o sangue proveniente de cada indivíduo foi aliquotado em tubos falcons de 50 ml, previamente identificados, e submetido aos seguintes tratamentos: (1) sangue + meio de cultura RPMI (Sigma) (suplementado com 5% de soro humano (Sigma) inativado, 1% L-glutamina (100 mM), e 1% de coquetel

antibiótico/antimicótico (Gibco), constituindo o RPMI completo); (2) sangue + meio + LPS de *P. gingivalis* (25µl/well na concentração de 10ng/ml, previamente padronizado) e (3) sangue + meio + LPS de *E. coli* (25µl/well na concentração de 10ng/ml, previamente padronizado). Em seguida, os tubos falcons foram mantidos em cultura à 37°C e 5% CO₂. Após a incubação por 16 horas, Brefeldina A (1µg/ml) (eBioscience) foi adicionada aos tubos, colocados novamente por um período de quatro horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. A Brefeldina A age “desorganizando” a estrutura do complexo de Golgi impedindo, deste modo, que haja exportação de proteínas para o meio extracelular. Ao término deste período, procedeu-se à lise de hemácias (RBC Lyses Buffer-eBioscience, San Diego, CA, USA), e as células foram lavadas com PBS 1x (10 min, 4°C). Em seguida, desprezou-se o sobrenadante, as células foram ressuspensas por agitação e PBS 1x foi adicionado em um volume 10 vezes menor do que o colocado em cada tubo (1,5 ml total/ 150µl finais).

4.2.3 – Imunofluorescência para avaliação fenotípica de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas

A marcação por imunofluorescência foi realizada segundo o protocolo estabelecido por DUTRA *et al.*(2000).

Utilizando-se placa estéril de 96 poços com fundo em U, adicionaram-se 20µl da suspensão de células, ou seja, 2×10^5 . Em seguida, foram adicionados anticorpos monoclonais, associados à fluorocromos (FITC- isotiocianato de fluoresceína, PE-ficoeritrina ou PerCp-Cy5.5 – peridinina-clorofila conjugada à estreptavidina), para marcação de moléculas de superfície, já diluídos, conforme titulação anteriormente padronizada, num volume final de 40µl. Estes anticorpos reconhecem as moléculas

expressas na superfície celular e permitem a identificação de células, como CD4 e CD8 e avaliar a expressão das moléculas co-estimuladoras, como CD28 e CTLA-4. Posteriormente, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, procedeu-se a lavagem das células adicionando 150 µl de PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, verteu-se a placa para retirar o sobrenadante e, em seguida, a placa foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células ressuspensas, adicionou-se, finalmente, 100µl de PBS e 100µl de solução de formaldeído 4%, para fixação celular por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150µl de PBS, seguiu-se a permeabilização celular, incubando as células por 10 minutos com solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e a placa foi agitada. Em seguida, adicionou-se sobre as células, 40µl da solução de anticorpos monoclonais, associados à fluorocromos (FITC, PE ou PerCpCy5.5), para marcação de moléculas intracitoplasmáticas; tais como: anti-molécula co-estimuladora (CTLA-4), anti-citocinas (IFN- γ , IL-17) e anti-moléculas citotóxicas (granzima A e perforina), adequadamente diluídos em solução de saponina 0,5%. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas, por centrifugação, adicionando-se a cada poço 150µl da solução de saponina. Repetiu-se por duas vezes esta operação sendo que, na última vez, as células foram lavadas com WashB (PBS 1x; 0,5% albumina sérica bovina – BSA; 2mM de azida sódica). Finalmente, após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 100µl de PBS e 100µl de solução de formaldeído 4%. O volume final de 200µl de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para

leitura no citômetro de fluxo. As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz até o momento de aquisição no citômetro de fluxo FACS_{CANTO} (Becton & Dickinson).

Em todos os ensaios, foram realizadas marcações com anticorpos com especificidade não relacionada, pertencentes ao mesmo isotipo e marcados com os mesmos fluorocromos dos anticorpos específicos, a título de controle. Os anticorpos utilizados nestes experimentos encontram-se listados na tabela 4.

Anticorpo	Fluorocromo	Fabricante	Clone
IgG1/IgG2	PE	eBioscience	E11419-1630
	FITC		E014553
CD4	PerCpCy5.5	eBioscience	E033021
CD8	FITC	eBioscience	E11935-1310
	PE		E021510
CD28	PE	Pharmlngen	10492
CTLA-4	PE	eBioscience	E025720
IFN- γ	PE	eBioscience	E02137-113
IL-17	PE	eBioscience	E10705-101
Granzima A	PE	Pharmlngen	M070766
Perforina	FITC	eBioscience	E020251

Tabela 4 – Relação dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo fenotípico.

4.2.4 - Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo - FACS_{CANTO} (Becton & Dickinson) após a coloração, já descrita. Durante a aquisição dos dados foram coletados 50.000 eventos.

Os dados coletados foram analisados utilizando o programa de computador *Flowjo* (Tree Star). A primeira etapa do processo de análise consistiu na determinação da população celular de interesse. Isto foi feito baseando-se no perfil de tamanho e granulosidade das populações adquiridas e da expressão de marcadores fenotípicos (Figura 2).

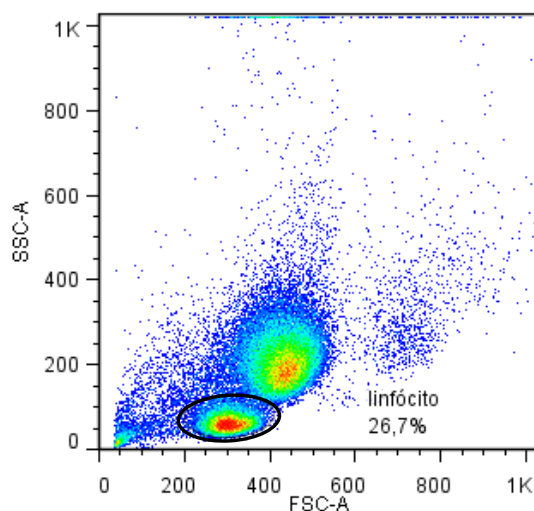


Figura 2: Perfil da distribuição de células obtidas a partir do sangue total no gráfico de tamanho versus granulosidade. A região delimitada foi a de linfócitos, baseada em conhecimento prévio do posicionamento destas células no gráfico de tamanho (FSC-A) x granulosidade (SSC-A).

Uma vez definidas as populações celulares de interesse, procedeu-se às análises de fluorescência. Para isto, foram montados gráficos de dispersão puntual de fluorescência. A delimitação dos quadrantes foi definida a partir do posicionamento de células marcadas com os controles de isotipo (imunoglobulina de camundongo do mesmo isotipo dos anticorpos utilizados nas marcações para as análises de fluorescência, conjugados com os fluorocromos), que permitiu a obtenção do “quadrante controle”, dados pela emissão da fluorescência derivada de marcação inespecífica. Nestas marcações, os quadrantes foram posicionados de forma que, no mínimo 97-99% das células estavam no quadrante inferior esquerdo (Figura 3A), o que permitiu a averiguação do sucesso ou não da marcação realizada. A partir do

posicionamento das células nestes gráficos, foi possível determinar a frequência de células simples-positivas, presentes no quadrante superior esquerdo (Q1) e inferior direito (Q3); a frequência de células duplo-positivas, presentes no quadrante superior direito (Q2), e a frequência de células negativas posicionadas no quadrante inferior esquerdo (Q4), como ilustrado na figura 3B. Definido o posicionamento dos quadrantes, o programa *Flowjo* forneceu uma análise estatística dos dados, baseada na percentagem ou no número absoluto de células posicionadas em cada quadrante, dentro das regiões definidas.

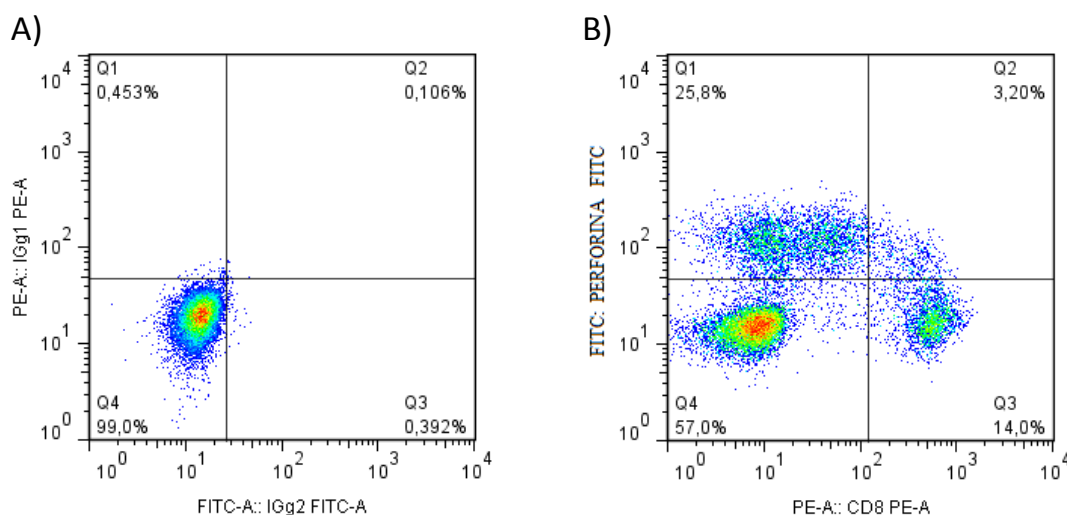


Figura 3: Distribuição representativa em *dot plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais. (A) Controles de isotipo marcados com FITC e PE. (B) Gráfico “*dot plot*” representativo do perfil obtido da localização das populações celulares de acordo com a expressão diferenciada das fluorescências. O quadrante Q1 contém as células CD8⁻Perforina⁺; o quadrante Q3 contém as células CD8⁺Perforina⁻; o quadrante Q2 contém as células CD8⁺Perforina⁺ e o quadrante Q4 contém as células CD8⁻Perforina⁻.

Tendo-se em vista os objetivos específicos deste trabalho, a figura 4 retrata um exemplo de como as análises foram realizadas.

A) Avaliação da frequência de células expressando as citocinas (IFN- γ e IL-17) e moléculas citotóxicas (granzima A e perforina). Inicialmente foi delimitado um *gate* nos quadrantes superiores direito e esquerdo, ao qual se denominou citocina ou citotóxica total. Essa estratégia foi realizada tanto em *dot plots* para a população

linfocitária CD4, quanto para a população linfocitária CD8. Em seguida, após a realização da média, obteve-se o valor final correspondente aos 100% da citocina ou molécula citotóxica dentro da população linfocitária total. Posteriormente, com a finalidade de se obter a frequência das células expressando cada uma das moléculas mencionadas, consideraram-se os valores obtidos pelo programa *Flowjo* nos quadrantes superiores direitos tanto para as células T CD4⁺ quanto para as T CD8⁺. Ao serem somados esses valores, a diferença representou a frequência das células que não expressavam os co-receptores CD4 e CD8 (CD4⁻CD8⁻), e que eram positivas para as citocinas ou moléculas citotóxicas. Como esclarecimento adicional, o posicionamento do gate de modo a identificar as células T CD8⁺, foi estabelecido para a população CD8^{high}, pois assim células NK, que são CD8^{low}, não seriam consideradas.

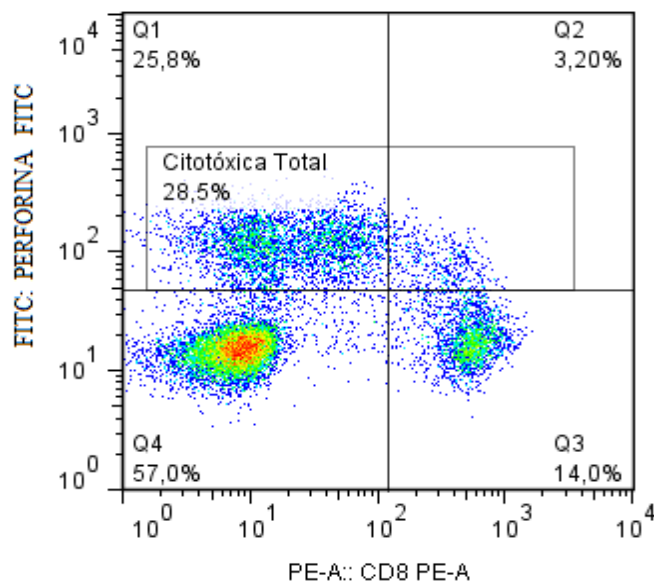


Figura 4: Dot plot representativo das células T CD8⁺ e expressão de Perforina. (A) Distribuição representativa em dot plot obtida pela marcação de sangue total com os anticorpos anti-CD8-PE e anti-Perforina-FITC. Delineou-se o gate denominado de Citotóxica total nos quadrantes Q1 e Q2 para a população linfocitária CD8.

B) Avaliação da contribuição das populações celulares para a produção de citocinas (IFN- γ e IL-17) e moléculas citotóxicas (granzima A e perforina). Após a

obtenção dos *dot plots* para as populações linfocitárias CD4 e CD8, como exemplificado na Figura 4, multiplicou-se o valor do quadrante superior direito (por exemplo, Q2) por 100 e dividiu-se pelo valor da média obtida para a citocina ou citotóxica total. Em seguida, foram somados os valores obtidos para as populações linfocitárias CD4 e CD8. Com a finalidade de determinar a contribuição da população CD4⁺CD8⁻ para a produção das moléculas mencionadas, a mesma foi obtida a partir da diferença entre a população linfocitária total (100%) e a soma das populações linfocitárias CD4 e CD8. Essa estratégia de análise mostrou-se fundamentada em FARIA *et al.* (2005).

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise estatística apropriada.

4.3 – Análise estatística

No estudo genotípico, a análise estatística dos dados foi realizada usando o programa de estatística JMP (SHS, Cary, NC, USA). O teste do Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar a distribuição dos genótipos entre os grupos C e PC, C e PA, PC e PA por meio de tabelas de contingência 3 x 2. A distribuição dos alelos e dos genótipos +/-entre os grupos C e PC, C e PA, PC e PA foi realizada utilizando-se de tabela de contingência 2 x 2, assim como as análises considerando uma maior ou menor perda de inserção dentro de cada forma clínica (PA e PC). Quando o número de pacientes em cada grupo de análise revelou-se incompatível com o teste do Qui-quadrado, ou seja, quando o valor foi menor que cinco, aplicou-se, então, o teste exato de Fischer. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os grupos de estudo foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, comparando-se as frequências genotípicas esperadas com as observadas. A associação entre os polimorfismos e o risco de doença periodontal foi estimada por *odds ratio* (OR), com

intervalo de confiança (IC) de 95%, os quais foram calculados com o programa estatístico *BioStat* 4.0 (Belém, Brasil). Essas análises também foram realizadas excluindo os fumantes de todos os grupos clínicos.

Os parâmetros significantes na análise univariada ($p < 0.1$) foram incluídos na análise multivariada. Essa análise, por sua vez, foi realizada utilizando o teste de regressão logística binária com o intuito de examinar a influência dos SNPs no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença periodontal. Para isso, os diferentes grupos de estudo (C, PA e PC) representaram a variável dependente e os parâmetros significantes obtidos na univariada (idade; gênero; presença ou ausência do hábito de fumar; presença ou ausência de variante polimórfica) representaram as variáveis independentes. As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico *Statistical Package for Social Sciences* 12.0 (SPSS, IBM Corporation, NY, USA), e valores considerados estatisticamente significativos foram aqueles com $p < 0.05$.

Para os SNPs, o software *Haploview* 4.2 (BARRETT *et al.*, 2005) foi usado para obter as frequências haplotípicas e avaliar o desequilíbrio de ligação. Esse programa gera estatísticas sobre informações de desequilíbrio de ligação, blocos de haplótipos e frequências haplotípicas na população.

No estudo fenotípico, após análise pelo programa *FlowJo* (Tree Star), testes estatísticos foram aplicados de acordo com a verificação da normalidade dos dados, feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Portanto, para avaliar a significância estatística entre os diferentes tratamentos (MEIO, LPS de *E. coli* e LPS de *P. gingivalis*) dentro de cada forma clínica utilizou-se ANOVA one way, seguido do teste post-hoc de Bonferroni e para comparações entre os tratamentos dois a dois (MEIO e *E. coli*; MEIO e *P. gingivalis*; *E. coli* e *P. gingivalis*) dentro de cada forma clínica, utilizou-se teste T pareado, caso a distribuição dos dados fosse normal. Entretanto, se a distribuição dos

dados fosse não normal, para essas mesmas comparações citadas acima, foram utilizados os testes Friedman e Wilcoxon, respectivamente. Para avaliar a existência de diferenças significativas entre os três grupos (C, PA e PC) utilizou-se ANOVA Tukey-Kramer e para comparações entre os grupos dois a dois (C e PA; C e PC; PA e PC) utilizou-se o teste T não pareado, caso a distribuição dos dados fosse normal. Se a distribuição fosse não normal, para essas mesmas comparações, foram utilizados os testes Kruskal Wallis e Mann-Whitney, respectivamente. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Utilizou-se para tais análises o software *Prisma 5.00* (GraphPad Software, San Diego California USA). As análises de correlação foram baseadas no coeficiente de correlação de Pearson e foram realizadas no *software JMP* (SAS Institute Inc.), sendo consideradas significativas apenas as comparações com $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

Este tópico é constituído de duas partes. A Parte I refere-se aos dados obtidos com o estudo genotípico dos polimorfismos gênicos das moléculas co-estimuladoras CD28 (T/C) no *locus* +17 e CTLA-4 (A/G) no *locus* +49, bem como os polimorfismos nas regiões do promotor da citocina IL-10, a saber: polimorfismo C/A no *locus* -592; polimorfismo C/T no *locus* -819 e polimorfismo G/A no *locus* -1082. A Parte II deste trabalho contempla os resultados referentes ao estudo fenotípico. Conforme permitido pela Resolução 04/2000 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, uma parte dos dados obtidos está apresentada na forma de artigo científico aceito para publicação.

5.1 - PARTE I – ESTUDO GENOTÍPICO

Para todos os polimorfismos abordados, verificou-se que a população se encontrava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.1.1- Polimorfismos T/C (+17) *CD28* e A/G (+49) *CTLA-4*

Os resultados referentes ao estudo dos polimorfismos T/C no *locus* +17, do gene *CD28* e A/G no *locus* +49, do gene *CTLA-4*, foram compilados em forma de artigo científico aceito para publicação no *Oral Diseases* (Anexo I).

5.1.2- Polimorfismo C/A (-592) *IL10*

Para estudo deste polimorfismo foram genotipados 197 indivíduos, sendo 66 indivíduos do grupo C, 58 do grupo PA e 73 do grupo PC.

Como mostrado na tabela 5, a análise da frequência dos genótipos CC, CA e AA nos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC), tanto considerando fumantes e não fumantes quanto excluindo os fumantes dessa análise, não mostrou significância estatística.

A análise da distribuição das variantes polimórficas, cujo cálculo é realizado multiplicando-se o valor do genótipo homocigoto por dois mais o valor do genótipo heterocigoto, também foi realizada e tem o seu cálculo mostrado na tabela 5. Nesta análise não foi encontrada significância estatística.

Considerando-se que a presença da variante polimórfica A no genótipo está relacionada a uma baixa expressão da citocina IL-10 (TURNER *et al.*, 1997), avaliou-se a ocorrência do genótipo A⁺ nos grupos C, PA e PC. Essa análise permitiu inferir que o genótipo A⁺ conferiu uma chance duas vezes maior dos indivíduos desenvolverem a forma agressiva da doença periodontal, agrupados fumantes e não fumantes. Entretanto, quando os fumantes foram excluídos dessa análise, não houve diferença estatística quando comparados os mesmos grupos acima mencionados. Ausência de significância também foi observada na frequência dos genótipos A⁺/A⁻ entre os demais grupos, tanto considerando somente indivíduos fumantes quanto incluindo os fumantes na análise (Tabela 5).

	C	PA	PC
Não fumantes + fumantes			
CC(%)	37(56.06)	21(36.21)	31(42.47)
CA(%)	21(31.82)	28(48.28)	32(43.84)
AA(%)	8(12.12)	9(15.52)	10(13.70)
C(%)	95(71.97)	70(60.34)	94(64.38)
A(%)	37(28.03)	46(39.66)	52(35.62)
*A ⁺ (%)	29(43.94)	37(63.79)	42(57.53)
A ⁻ (%)	37(56.06)	21(36.21)	31(42.47)
Não fumantes			
CC(%)	33(55.00)	15(39.47)	18(45.00)
CA(%)	20(33.33)	17(44.74)	15(37.50)
AA(%)	7(11.67)	6(15.79)	7(17.50)
C(%)	86(71.67)	47(61.84)	51(63.75)
A(%)	34(28.33)	29(38.16)	29(36.25)
A ⁺ (%)	27(45.00)	23(60.53)	22(55.00)
A ⁻ (%)	33(55.00)	15(39.47)	18(45.00)

Tabela 5 – Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (C/A) no locus -592 nos grupos de estudo, considerando ou não o fator de risco tabagismo.

Não fumantes + fumantes – *Diferença estatística (tabela de contingência 2x2) – genótipos A⁺/A⁻ (C x PA) – $\chi^2=4.93$, $p=0.026$, OR=2.25, IC – 1.091-4.633. ; OR-odds ratio; IC-intervalo de confiança.

Não fumantes – Não houve diferença estatisticamente significativa.

C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

Considerando-se que as duas formas clínicas, PA e PC, também podem ser estratificadas de acordo com a PI, análise adicional foi realizada para as frequências genotípicas e alélicas, considerando uma maior ou menor PI dentro de cada forma clínica. Para essa análise, os pacientes foram categorizados em um grupo contendo PI maior ou igual a 5 ($PI \geq 5mm$) e o outro composto por pacientes com PI maior que 3 e menor que 5 ($3mm > PI < 5mm$), conforme citado na metodologia. Por meio de dados apresentados na tabela 6, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos para estes parâmetros.

	Não fumantes + fumantes		Não fumantes	
	PA	PC	PA	PC
PI\geq5mm				
CC(%)	19(38.00)	24(45.28)	13(40.63)	13(46.43)
CA(%)	23(46.00)	23(43.40)	14(43.75)	10(35.71)
AA(%)	8(16.00)	6(11.32)	5(15.63)	5(17.86)
C(%)	61(61.00)	71(66.98)	40(62.50)	36(64.29)
A(%)	39(39.00)	35(33.02)	24(37.50)	20(35.71)
A ⁺ (%)	31(62.00)	29(54.72)	19(59.38)	15(53.57)
A ⁻ (%)	19(38.00)	24(45.28)	13(40.63)	13(46.43)
3mm>PI<5mm				
CC(%)	2(25.00)	7(35.00)	2(33.33)	5(41.67)
CA(%)	5(62.50)	9(45.00)	3(50.00)	5(41.67)
AA(%)	1(12.50)	4(20.00)	1(16.67)	2(16.67)
C(%)	9(56.25)	23(57.50)	7(58.33)	15(62.50)
A(%)	7(43.75)	17(42.50)	5(41.67)	9(37.50)
A ⁺ (%)	6(75.00)	13(65.00)	4(66.67)	7(58.33)
A ⁻ (%)	2(25.00)	7(35.00)	2(33.33)	5(41.67)

Tabela 6- Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (C/A) no locus -592, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.

Não houve diferença estatisticamente significativa.

PA= periodontite agressiva; PC=periodontite crônica; PI=perda de inserção.

5.1.3- Polimorfismo C/T (-819) *IL10*

Para o estudo desse polimorfismo foram utilizados 194 indivíduos, sendo 63 indivíduos do grupo C, 58 do grupo PA e 73 do grupo PC.

Os resultados para as frequências genóticas e alélicas estão mostrados na tabela 7, considerando ou não o fator de risco tabagismo. Estes dados mostraram que não houve associação deste polimorfismo com as diferentes formas da doença.

Considerando-se que a presença da variante polimórfica T no genótipo está relacionada a uma baixa expressão da citocina IL-10 (TURNER *et al.*, 1997), avaliou-se a ocorrência do genótipo T⁺ nos grupos C, PA e PC. Estes resultados estão identificados

na tabela 7 e evidenciaram ausência de associação do genótipo T⁺ com a doença periodontal.

	C	PA	PC
Não fumantes + fumantes			
CC(%)	26(41.27)	22(37.93)	32(43.84)
CT(%)	25(39.68)	26(44.83)	28(38.36)
TT(%)	12(19.05)	10(17.24)	13(17.81)
C(%)	77(61.11)	70(60.34)	92(63.01)
T(%)	49(38.89)	46(39.66)	54(36.99)
T ⁺ (%)	37(58.73)	36(62.07)	41(56.16)
T ⁻ (%)	26(41.27)	22(37.93)	32(43.84)
Não fumantes			
CC(%)	24(41.38)	14(36.84)	15(37.50)
CT(%)	23(39.66)	17(44.74)	17(42.50)
TT(%)	11(18.97)	7(18.42)	8(20.00)
C(%)	71(61.21)	45(59.21)	47(58.75)
T(%)	45(38.79)	31(40.79)	33(41.25)
T ⁺ (%)	34(58.62)	24(63.16)	25(62.50)
T ⁻ (%)	24(41.38)	14(36.84)	15(37.50)

Tabela 7– Distribuição dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (C/T) no locus -819, considerando ou não o fator de risco tabagismo, nos diferentes grupos de estudo.

Não houve diferença estatisticamente significativa.

C=controle; PA= periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

Sabendo-se que as formas clínicas, PA e PC, podem ser estratificadas de acordo com a PI, executou-se, portanto, a análise da distribuição genotípica nesses dois grupos. Os dados obtidos encontram-se discriminados na tabela 8 e não revelaram associação entre o polimorfismo -819 (C/T) e uma maior ou menor PI, considerando ou não o fator de risco tabagismo.

Uma importante análise foi realizada para a frequência alélica, considerando uma maior ou menor PI e resultados apresentados na tabela 8 evidenciaram a ausência

de significância estatística quanto à distribuição dos alelos C e T, considerando a perda de inserção nas formas clínicas em estudo.

Análise adicional também foi realizada com o intuito de verificar a ocorrência do genótipo T⁺ no grupo de pacientes com PI maior ou igual a 5 (PI \geq 5mm) e no outro com PI maior que 3 e menor que 5 (3mm>PI<5mm), tanto na PA quanto na PC. Estes resultados denotaram ausência de associação do genótipo T⁺ para o parâmetro avaliado.

	Não fumantes + fumantes		Não fumantes	
	PA	PC	PA	PC
PI\geq5mm				
CC(%)	20(40.00)	25(47.17)	12(37.50)	10(35.71)
CT(%)	22(44.00)	19(35.85)	14(43.75)	12(42.86)
TT(%)	8(16.00)	9(16.98)	6(18.75)	6(21.43)
C(%)	62(62.00)	69(65.09)	38(59.38)	32(57.14)
T(%)	38(38.00)	37(34.91)	26(40.63)	24(42.86)
T ⁺ (%)	30(60.00)	28(52.83)	20(62.50)	18(64.29)
T ⁻ (%)	20(40.00)	25(47.17)	12(37.50)	10(35.71)
3mm>PI<5mm				
CC(%)	2(25.00)	7(35.00)	2(33.33)	5(41.67)
CT(%)	4(50.00)	9(45.00)	3(50.00)	5(41.67)
TT(%)	2(25.00)	4(20.00)	1(16.67)	2(16.67)
C(%)	8(50.00)	23(57.50)	7(58.33)	15(62.50)
T(%)	8(50.00)	17(42.50)	5(41.67)	9(37.50)
T ⁺ (%)	6(75.00)	13(65.00)	4(66.67)	7(58.33)
T ⁻ (%)	2(25.00)	7(35.00)	2(33.33)	5(41.67)

Tabela 8- Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (C/T) no locus -819 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.

Não houve diferença estatisticamente significativa.

PA= periodontite agressiva; PC=periodontite crônica; PI=perda de inserção.

5.1.4 – Polimorfismo G/A (-1082) *IL10*

Análises para este polimorfismo foram realizadas com a genotipagem de 192 indivíduos, sendo 62 indivíduos do grupo C, 58 do grupo PA e 72 do grupo PC.

Ao realizar-se a análise das frequências genótípicas e alélicas nos indivíduos dos diferentes grupos de estudo, não se observaram associações estatisticamente significativas (tabela 9). Considerando que a presença da variante polimórfica A pode conferir uma diminuição na expressão da citocina IL-10 (TURNER *et al.*, 1997), avaliou-se a ocorrência do genótipo A⁺ nos diferentes grupos. Esses resultados estão explicitados na tabela 9 e revelaram ausência de significância estatística entre os grupos.

	C	PA	PC
Não fumantes + fumantes			
GG(%)	10(16.13)	4(6.90)	9(12.50)
GA(%)	27(43.55)	26(44.83)	29(40.28)
AA(%)	25(40.32)	28(48.28)	34(47.22)
G(%)	47(37.90)	34(29.31)	47(32.64)
A(%)	77(62.10)	82(70.69)	97(67.36)
A ⁺ (%)	52(83.87)	54(93.10)	63(87.50)
A ⁻ (%)	10(16.13)	4(6.90)	9(12.50)
Não fumantes			
GG(%)	10(17.86)	3(7.89)	4(10.26)
GA(%)	25(44.64)	16(42.11)	17(43.59)
AA(%)	21(37.50)	19(50.00)	18(46.15)
G(%)	45(40.18)	22(28.95)	25(32.05)
A(%)	67(59.82)	54(71.05)	53(67.95)
A ⁺ (%)	46(82.14)	35(92.11)	35(89.74)
A ⁻ (%)	10(17.86)	3(7.89)	4(10.26)

Tabela 9 – Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (G/A) no locus -1082 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o fator de risco tabagismo.

Não houve diferença estatisticamente significativa.

C=controle; PA= periodontite agressiva; PC=periodontite crônica

Da mesma maneira como analisado para os demais polimorfismos, verificou-se a possível associação dos genótipos GG, GA e AA com uma maior ou menor PI nas duas formas principais da doença periodontal. Os resultados expostos na tabela 10 evidenciaram a ausência dessa associação. No que se refere à distribuição dos alelos G e A, também, não foram observadas associações estatisticamente significativas (tabela

10). Análise adicional também foi realizada com o intuito de verificar a ocorrência do genótipo A⁺ em relação à PI dentro do mesmo grupo (PA e PC). Entretanto, não foi possível observar uma associação estatisticamente significativa para o parâmetro avaliado (tabela 10).

	Não fumantes + fumantes		Não fumantes	
	PA	PC	PA	PC
PI≥5mm				
GG(%)	3(6.00)	6(11.32)	2(6.25)	2(7.14)
GA(%)	23(46.00)	22(41.51)	13(40.63)	12(42.86)
AA(%)	24(48.00)	25(47.17)	17(53.13)	14(50.00)
G(%)	29(29.00)	34(32.08)	17(26.56)	16(28.57)
A(%)	71(71.00)	72(67.92)	47(73.44)	40(71.43)
A ⁺ (%)	47(94.00)	47(88.68)	30(93.75)	26(92.86)
A ⁻ (%)	3(6.00)	6(11.32)	2(6.25)	2(7.14)
3mm>PI<5mm				
GG(%)	1(12.50)	3(15.79)	1(16.67)	2(18.18)
GA(%)	3(37.50)	7(36.84)	3(50.00)	5(45.45)
AA(%)	4(50.00)	9(47.37)	2(33.33)	4(36.36)
G(%)	5(31.25)	13(34.21)	5(41.67)	9(40.91)
A(%)	11(68.75)	25(65.79)	7(58.33)	13(59.09)
A ⁺ (%)	7(87.50)	16(84.21)	5(83.33)	9(81.82)
A ⁻ (%)	1(12.50)	3(15.79)	1(16.67)	2(18.18)

Tabela 10 - Frequência dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo *IL10* (G/A) no locus -1082 nos diferentes grupos de estudo, considerando ou não o risco de tabagismo e a PI.

Não houve diferença estatisticamente significativa.

PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica; PI=perda de inserção.

5.1.5 – Análise Multivariada

Com o intuito de verificar possíveis associações dos SNPs no cluster da IL-10 com as principais formas clínicas da doença periodontal, foi realizada a análise multivariada. A regressão logística é uma das formas de análise multivariada que estuda a relação entre uma variável resposta e uma ou mais variáveis independentes (HOSMER *et al.*, 1991). Nesse método, as variáveis foram dispostas em categorias e a resposta é

expressa por meio de uma probabilidade de ocorrência. É importante mencionar que a análise de regressão logística binária utilizou, como critério de inclusão das variáveis, apenas as comparações que tiveram significância abaixo de 10% ($p < 0.1$) na análise univariada.

Dessa forma, para variável dependente (forma clínica) atribuiu-se o valor numérico 1 para indivíduos do grupo C e 2 para indivíduos dos grupos PA e PC. Para as variáveis independentes (idade, gênero, presença ou ausência do hábito de fumar, presença ou ausência de variante polimórfica), a categorização em valores numéricos levou em consideração as variáveis teoricamente menos relacionadas a um maior risco de desenvolver a doença periodontal (tabela 11). Portanto, para a idade, obteve-se primeiramente a mediana e depois se atribuiu os valores (1 e 2) dentro do modelo de PA e dentro do modelo de PC. Para o gênero foi imputado o valor 1 para indivíduos do gênero masculino (M) e 2 para indivíduos do gênero feminino (F). Considerando a variável presença ou ausência do hábito de fumar, atribuiu-se o valor 1 para antigos fumantes e fumantes (S) e o valor 2 para aqueles que nunca fumaram (N). Com relação à presença ou ausência de variante polimórfica, a categorização teve como referência a alta produção da citocina IL-10, sendo o alelo relacionado a uma menor expressão da molécula com valor igual a 1 e aquele relacionado a uma maior expressão da molécula com valor igual a 2.

Forma clínica	Idade	Gênero	Fumo	Presença ou Ausência de variante polimórfica para o gene da IL-10		
				(-592)	(-819)	(-1082)
C=1						
PA=2	Abaixo de 27=1	M=1	S=1	A ⁺ =1	T ⁺ =1	A ⁺ =1
	Acima de 27=2	F=2	N=2	A ⁻ =2	T ⁻ =2	A ⁻ =2
PC=2	Acima de 40=1					
	Abaixo de 40=2					

Tabela 11 – Valores atribuídos às variáveis dependente (forma clínica) e independentes (idade, gênero, presença ou ausência do hábito de fumar, presença ou ausência da variante polimórfica).

C=controle; PA= periodontite agressiva; PC=periodontite crônica

Por meio da regressão logística binária obteve-se o modelo 1 para a PA (tabela 12) e o modelo 2 para PC (tabela 13). No modelo 1 foram utilizadas as seguintes co-variáveis: idade; presença ou ausência do hábito de fumar e presença ou ausência da variante polimórfica A⁺ de IL-10 (-592), sendo possível observar que indivíduos fumantes apresentavam um risco 4 vezes maior e que, também, indivíduos com genótipo A⁺ de IL-10 (-592) possuíam um risco 3 vezes maior de desenvolverem a PA.

		Modelo 1- C x PA					
Variáveis	Categorias	Univariada			Multivariada		
		p<0.1	OR	95% IC	p<0.05	OR	95%IC
Idade	Abaixo de 27 Acima de 27	0.08	0.48	0.21-1.09	ns	ns	ns
Gênero	Homens Mulheres	0.18	0.57	0.25-1.29	-	-	-
Fumo	Fumantes Não-fumantes	0.012	4	1.35-11.82	0.018	3.84	1.26-11.63
<i>IL10</i> (-592)	A ⁺ A ⁻	0.013	2.89	1.25-6.66	0.02	2.78	1.17-6.59
<i>IL10</i> (-819)	T ⁺ T ⁻	0.24	1.62	0.72-3.66	-	-	-
<i>IL10</i> (-1082)	A ⁺ A ⁻	0.4	1.81	0.45-7.19	-	-	-

Tabela 12: Análise de Regressão Logística Binária para a forma clínica PA.

C=controle; PA=periodontite agressiva

O modelo 2, para a forma clínica PC, utilizou as seguintes variáveis: idade, gênero, presença ou ausência do hábito de fumar e presença ou ausência da variante polimórfica A⁺ IL-10 (-592) (tabela 13). Os dados obtidos sugeriram que indivíduos com idade superior a 40 anos possuíam um risco praticamente 32 vezes maior de apresentarem a forma clínica PC; indivíduos fumantes, por sua vez, apresentavam um risco 6 vezes maior e indivíduos com a presença da variante polimórfica A⁺ de IL-10 (-592) possuíam um risco 3 vezes maior de desenvolverem a PC.

		Modelo 2 – C x PC					
Variáveis	Categorias	Univariada			Multivariada		
		p<0.1	OR	95% IC	p<0.05	OR	95%IC
Idade	Abaixo de 40 Acima de 40	0.00	27.21	8.45-87.58	0.00	31.67	8.71-115.21
Gênero	Homens Mulheres	0.04	0.43	0.19-0.99	ns	ns	ns
Fumo	Fumantes Não-umantes	0.001	5.84	2.04-16.72	0.01	6.01	1.62-22.32
<i>IL10</i> (-592)	A ⁺ A ⁻	0.03	2.41	1.08-5.37	0.04	3.32	1.07-10.30
<i>IL10</i> (-819)	T ⁺ T ⁻	0.42	1.38	0.63-3.01	-	-	-
<i>IL10</i> (-1082)	A ⁺ A ⁻	0.78	1.19	0.35-4.03	-	-	-

Tabela 13: Análise de Regressão Logística Binária para a forma clínica PC.
C=controle; PC=periodontite crônica

5.1.6- Análise de Desequilíbrio de Ligação

Considerando que estudos de associação genética têm indicado que SNPs nas regiões do promotor de IL-10, localizados no cromossomo 1, estão em desequilíbrio de ligação (STANILOVA *et al.*, 2006 and ZHANG *et al.*, 2007), utilizou-se o programa *Haploview* 4.2 para determinar se havia desequilíbrio de ligação, expresso como coeficiente D' de Lewontin, entre os SNPs mencionados na doença periodontal. Esse programa realiza estatísticas de desequilíbrio de ligação para marcadores dentro de certa distância, sendo necessário, no mínimo, que 75% dos indivíduos estejam genotipados para cada polimorfismo a ser analisado. Além disso, a utilização desse software requer, ainda, informações concernentes ao *locus* de cada polimorfismo para a realização de

testes de associação. O banco de dados, utilizado nesse programa, trabalha com variáveis numéricas dispostas nas seguintes colunas:

1-“Pedigree” – identificador para a família do indivíduo

2-ID- identificador para o indivíduo

3 e 4 - ID do pai e da mãe, respectivamente – atribuiu-se o valor zero, pois essa informação não é conhecida.

5- Status da afecção- identifica caso-controle. O valor 1 corresponde aos indivíduos do grupo C e o valor 2 para indivíduos com PA e PC.

6- Gênero – valor 1 é dado para homens (M) e valor 2 para mulheres (F).

7-Genótipos- são atribuídos valores numéricos para os genótipos determinados de cada polimorfismo da seguinte maneira: Adenina (A)=1; Citosina (C)=2; Guanina (G) =3 e Timina (T)=4. A seguir, encontra-se uma planilha representativa que foi utilizada para o banco de dados referente aos *loci* do promotor da IL-10 (tabela 14).

Pedigree	ID	ID do pai	ID da mãe	Status da afecção	Gênero	IL-10 (-592)			IL-10 (-819)			IL-10 (-1082)		
						CC	2	2	CC	4	4	GG	3	3
1	1	0	0	C=1	M=1	CC	2	2	CC	4	4	GG	3	3
2	2	0	0	PA=2	F=2	CA	2	1	CT	4	2	GA	3	1
3	3	0	0	PC=2		AA	1	1	TT	2	2	AA	1	1

Tabela 14 - Tabela representativa de banco de dados para o promotor da IL-10, utilizados no Haploview.

Nesse trabalho, quando testado para uma associação entre polimorfismos nas regiões do promotor de IL-10 (-592,-819 e -1082; localizados no cromossoma 1) com a ocorrência da doença periodontal, o cálculo de valores não mostrou evidência para desequilíbrio de ligação entre todos os polimorfismos abordados neste estudo.

5.2 - PARTE II – ESTUDO FENOTÍPICO

Um dos objetivos específicos propostos neste trabalho compreende avaliar a expressão fenotípica de moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, em células isoladas a fresco ou submetidas ao estímulo com LPS, provenientes de indivíduos estratificados nos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC) estabelecendo associações entre a ocorrência dos polimorfismos gênicos e a expressão dessas moléculas.

Conforme demonstrado por E SILVA *et al.* (2012) nos resultados obtidos do artigo anexado no final deste exemplar (tabela 2 do Artigo - Anexo I), observou-se uma associação entre o genótipo T do polimorfismo do CD28, ou seja, indivíduos com genótipo CC, com a periodontite agressiva. Entretanto, não se obteve nenhum indivíduo com o genótipo CC portador de periodontite crônica. Portanto, devido à inexistência de indivíduos com periodontite crônica e genótipo CC, nesse trabalho, não seria possível estabelecer uma associação entre a ocorrência do polimorfismo gênico da molécula co-estimuladora CD28 (T/C) no *locus* +17 com a expressão dessa molécula em cada forma clínica. Outro ponto importante a ser mencionado é que, nesse mesmo artigo, notou-se ausência de associação entre o polimorfismo gênico da molécula co-estimuladora CTLA-4 (A/G) no *locus* +49 com a ocorrência da doença periodontal (tabela 3 do Artigo - Anexo I), justificando a impossibilidade de se fazer qualquer inferência entre o polimorfismo analisado e a expressão da molécula nos indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Entretanto, diferença significativa foi obtida ao se comparar a presença ou ausência do genótipo A⁺, considerando-se a perda de inserção clínica, apenas no grupo com periodontite agressiva (tabela 4 do Artigo – Anexo I). Porém, a baixa frequência do genótipo A⁻ (indivíduos com genótipo GG), levando-se em consideração o *n* de 424 indivíduos, não tornou possível esse tipo de comparação. Referente ao polimorfismo da citocina IL-10, a única associação encontrada foi entre o polimorfismo C/A, *locus* -592,

e a PA, quando considerada a população total. Entretanto, essa associação não se manteve quando considerado apenas não fumantes. Destaca-se que os estudos feitos para avaliar a expressão fenotípica das moléculas foram realizados apenas com indivíduos não fumantes, já que o fumo é um importante fator de risco para a doença periodontal. Diante do exposto, realizou-se a caracterização fenotípica e funcional de linfócitos de indivíduos com ou sem a doença periodontal, independentemente dos polimorfismos gênicos das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4. A análise de expressão de IL-10 foi realizada em outro trabalho do nosso grupo (LIMA *et al.*, 2011).

5.2.1 – Avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras CD28 e CTLA-4

Para determinar se havia diferença na frequência e intensidade média de fluorescência (IMF) de moléculas de superfície envolvidas, indiretamente, com o processo de ativação celular de linfócitos entre os diferentes estímulos e entre indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC), foram avaliadas a frequência de células duplo-positivas $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, $CD8^+CD28^+$ e $CD8^+CTLA-4^+$ e a IMF das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares. Para isso, duas abordagens foram empregadas para análise dos dados obtidos e descritas na sequência: A) comparação entre os diferentes estímulos, ou seja, entre células sob exposição de LPS de *E.coli*, células expostas ao LPS de *P. gingivalis* e células não submetidas ao tratamento dentro do mesmo grupo de indivíduos (dados apresentados na figura 5); B) comparação dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC) (dados apresentados na figura 6).

Referente às células $CD4^+CD28^+$, comparando-se os diferentes estímulos no grupo PA, foi possível notar que o estímulo com LPS de *E. coli* induziu um aumento

estatisticamente significativo na frequência dessas células, tanto em relação à cultura realizada apenas com meio quanto em relação às culturas sob estímulo de *P. gingivalis*. Entretanto, essa observação não esteve presente nos indivíduos dos grupos C e PC (FIGURA 5A).

Ao analisar-se a IMF de CD28 em células CD4⁺CD28⁺ estimuladas de indivíduos dos grupos C e PC, observou-se que o estímulo com *E. coli* levou ao aumento na IMF de CD28 em células CD4⁺CD28⁺ nesses grupos, quando comparados com os linfócitos tratados na ausência de estímulo. Foi possível notar também que, no grupo PC, o LPS de *P. gingivalis* proporcionou uma maior IMF de CD28 nas células CD4⁺CD28⁺ em relação às culturas sem estímulo. Contudo, ao comparar os diferentes estímulos no grupo PA, não se observou qualquer alteração significativa na IMF de CD28 pelas células CD4⁺CD28⁺ (FIGURA 5B).

Para as células CD4⁺CTLA-4⁺, ao se comparar os diferentes estímulos nos grupos C, PA e PC, notou-se que culturas realizadas com LPS de *E. coli* geraram um aumento na frequência dessas células em linfócitos de indivíduos de todos esses grupos de estudo, em relação às culturas sob ausência de estímulo, sendo maior o aumento observado no grupo PC. Entretanto, ao se comparar a frequência dessas células sob exposição de LPS de *E. coli* e LPS de *P. gingivalis* nos indivíduos dos grupos PA e PC, foi possível observar que o estímulo com *E. coli* gerou aumento na frequência das mesmas, comparando-se ao estímulo com LPS de *P. gingivalis* (FIGURA 5C).

Referente à avaliação da IMF de CTLA-4 em células CD4⁺CTLA-4⁺ de indivíduos dos grupos PA e PC, constatou-se que o estímulo com LPS de *E. coli* gerou um aumento na IMF de CTLA-4 em células CD4⁺CTLA-4⁺ quando comparado ao estímulo com LPS de *P. gingivalis*. Contudo, não foi possível essa observação nos

linfócitos de indivíduos do grupo C quando submetidos aos mesmos tratamentos. Ainda no grupo PC, ao serem avaliados os efeitos do tratamento com LPS de *E.coli* em relação às culturas realizadas apenas com meio, notou-se diferença significativa na IMF da molécula CTLA-4 nos linfócitos CD4⁺CTLA-4⁺, sendo possível observar que o estímulo com *E. coli* propiciou uma maior IMF da molécula co-estimuladora quando comparado às culturas realizadas com o meio (FIGURA 5D).

A análise da frequência das células CD8⁺CD28⁺ revelou que nenhum dos tratamentos causou alterações significativas na frequência de expressão de CD28 em células CD8⁺CD28⁺ nos grupos de indivíduos analisados (FIGURA 5E).

Com relação à IMF da molécula co-estimuladora CD28 em células CD8⁺CD28⁺, indivíduos do grupo C apresentaram maior IMF de CD28 após exposição ao estímulo de LPS de *P. gingivalis* em relação às culturas sem estímulo. No entanto, independentemente do tratamento realizado *in vitro*, linfócitos de indivíduos dos grupos PA e PC não apresentaram diferenças significativas na IMF de CD28 pelas células CD8⁺CD28⁺ (FIGURA 5F).

Para as células CD8⁺CTLA-4⁺, ao serem avaliados os efeitos entre os diferentes LPS nos grupos PA e PC, notou-se que o estímulo com LPS de *E. coli* levou ao aumento na frequência celular em relação às culturas tratadas com LPS de *P. gingivalis* em ambos os grupos. Além disso, em indivíduos do grupo PA, foi possível observar que culturas celulares submetidas ao tratamento com *E. coli* apresentaram uma maior frequência de células CD8⁺CTLA-4⁺ quando comparadas às culturas tratadas na ausência de estímulo. Por outro lado, ao serem aplicadas essas mesmas comparações para o grupo C não foi possível constatar alterações significativas (FIGURA 5G).

Finalmente, a análise da IMF de CTLA-4 pelos linfócitos CD8⁺CTLA-4⁺ de indivíduos do grupo C, considerando-se as diferentes condições de cultura, revelou que o estímulo com LPS de *E. coli* causou uma maior IMF de CTLA-4 pelos linfócitos CD8⁺CTLA-4⁺ em relação à das culturas tratadas na ausência de estímulo. Entretanto, não foi constatada nenhuma alteração na IMF nos grupos com doença periodontal (PA e PC), submetidos aos mesmos tratamentos (FIGURA 5H).

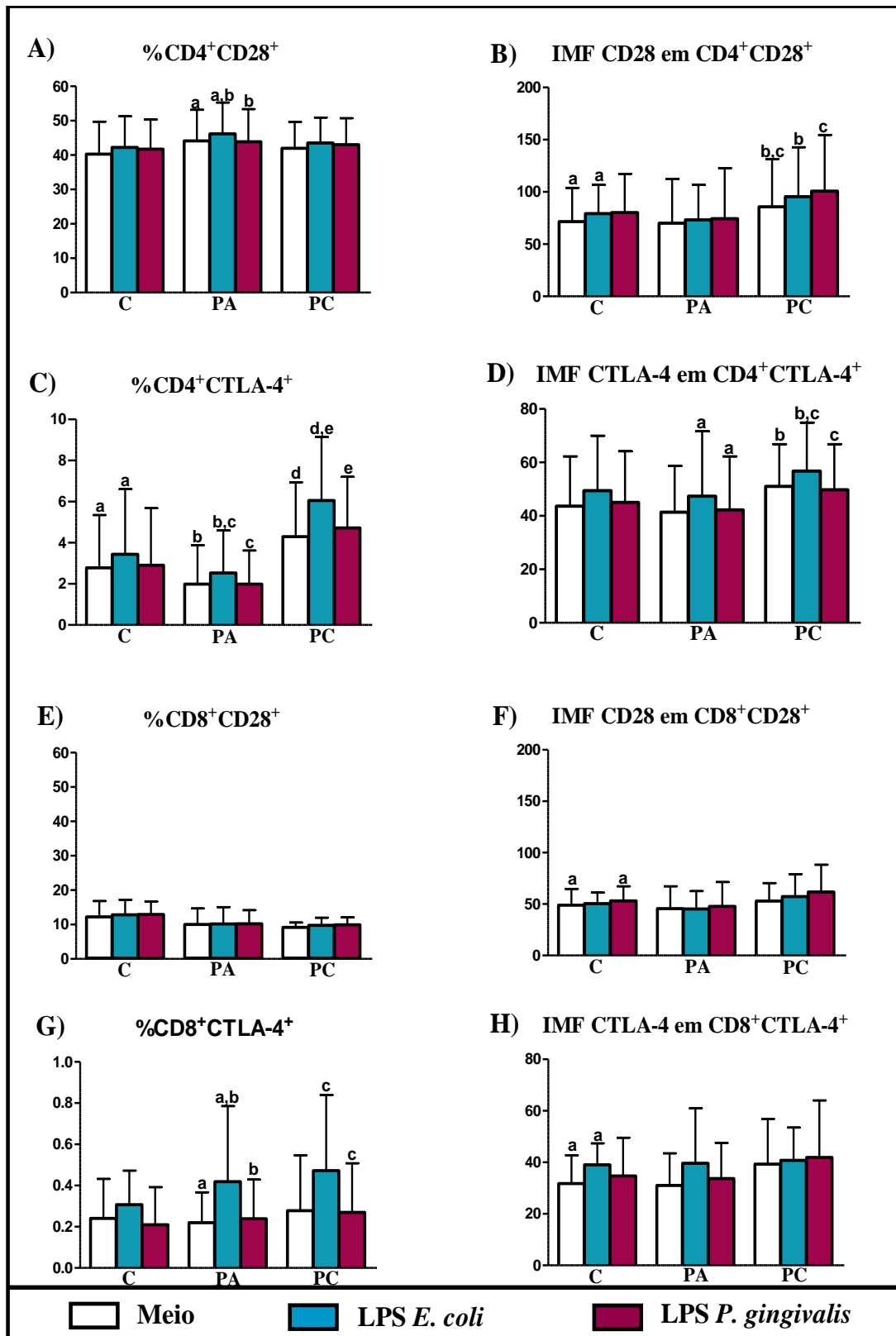


Figura 5: Análise da frequência das células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CTLA-4⁺ bem como a IMF das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares, considerando-se os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos. C (n=7), PA (n=9) e PC (n=7, exceto para análises envolvendo o CTLA-4 com n=6). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas estão representadas por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica. IMF=intensidade média de fluorescência.

A segunda abordagem utilizada para a avaliação das moléculas co-estimuladoras compreendeu verificar a frequência de expressão de células duplo-positivas $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, $CD8^+CD28^+$ e $CD8^+CTLA-4^+$, e a IMF de CD28 e CTLA-4 pelas células duplo-positivas oriundas de indivíduos dos diferentes grupos, num mesmo estímulo. Considerando-se as culturas sem estímulo, os dados apresentados na figura 6 revelaram, após comparações entre os diferentes grupos de indivíduos, ausência de alterações estatisticamente significativas na frequência de expressão de células duplo-positivas $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CTLA-4^+$, $CD8^+CD28^+$ e $CD8^+CTLA-4^+$, bem como na IMF de CD28 e CTLA-4, sugerindo um perfil de ativação semelhante para os linfócitos de indivíduos de todos os grupos analisados.

Em seguida, as mesmas comparações foram realizadas entre os diferentes grupos considerando o mesmo estímulo de LPS, com o intuito de verificar se os parâmetros mencionados acima poderiam ser influenciados entre os grupos, quando submetidos ao mesmo tratamento com LPS. Observou-se maior frequência de células $CD4^+CTLA-4^+$ no grupo PC em relação ao grupo PA, quando as células foram cultivadas sob estímulo de *E. coli*. Adicionalmente, o aumento na frequência de $CD4^+CTLA-4^+$ foi maior no grupo PC quando comparado com o do grupo PA, estando as células submetidas ao estímulo com LPS de *P. gingivalis* (FIGURA 6C). Entretanto, não se observou qualquer alteração significativa na IMF de CTLA-4 pelas células $CD4^+CTLA-4^+$ ao se comparar os diferentes grupos sob o mesmo estímulo de LPS (FIGURA 6D). Referente à frequência de células $CD4^+CD28^+$ (FIGURA 6A), $CD8^+CD28^+$ (FIGURA 6E) e $CD8^+CTLA-4^+$ (FIGURA 6G) e IMF de co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares (FIGURA 6B, F, H), não foi notada qualquer diferença significativa entre os grupos C, PA e PC, quando submetidos às mesmas condições.

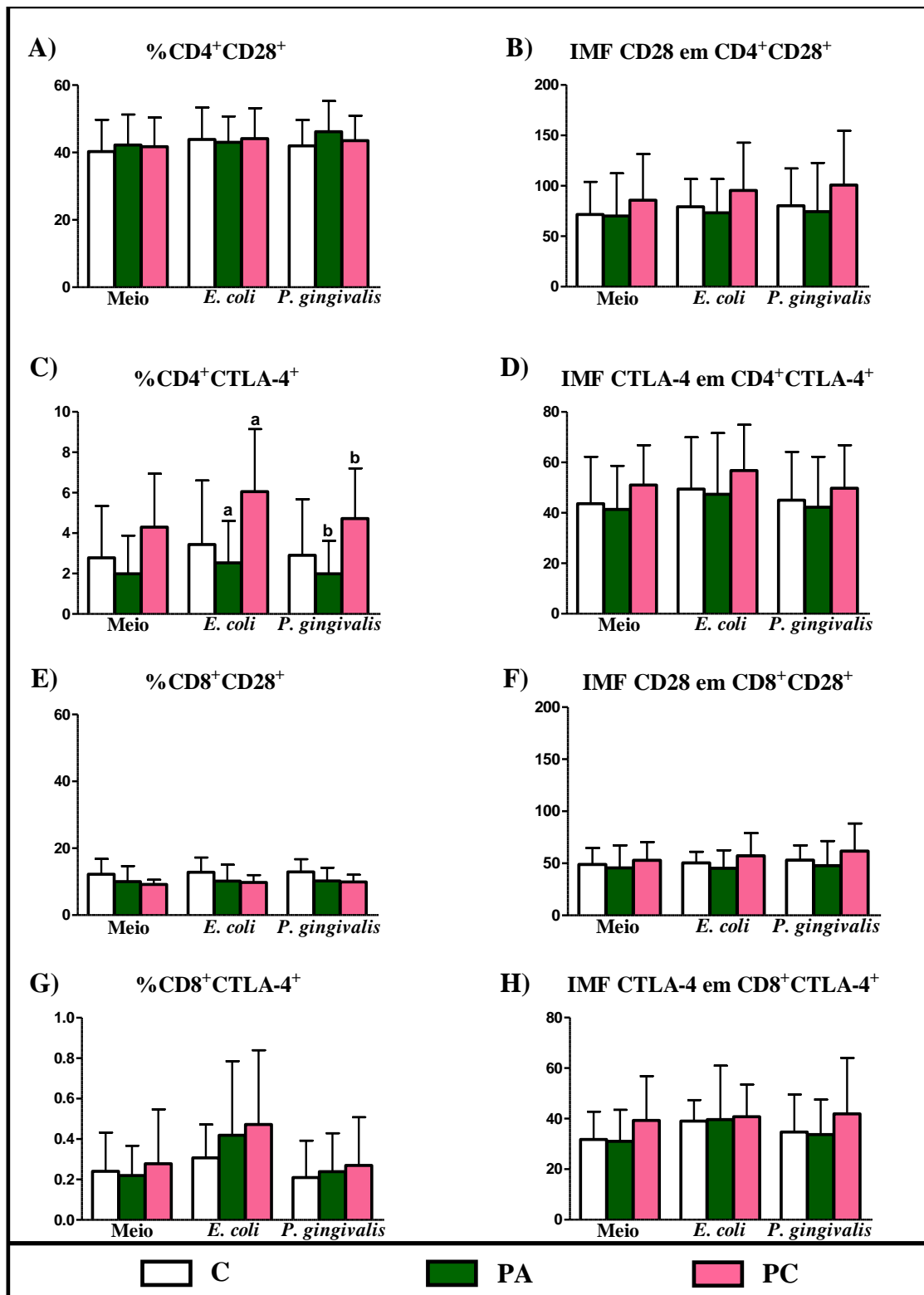


Figura 6: Análise da frequência das células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD8⁺CD28⁺ e CD8⁺CTLA-4⁺ bem como a IMF das moléculas co-estimuladoras, CD28 e CTLA-4, por essas populações celulares, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. C (n=7), PA (n=9) e PC (n=7, exceto para análises envolvendo o CTLA-4 com n=6). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas estão representadas por letras iguais (p<0.05). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica. IMF=intensidade média de fluorescência.

5.2.2- Avaliação de citocinas inflamatórias e moléculas citotóxicas por células de indivíduos sem a doença periodontal, com periodontite agressiva e periodontite crônica, na ausência ou presença de estímulo com LPS

Considerando-se a importância das moléculas co-estimuladoras no processo de ativação dos linfócitos, procedeu-se à análise de moléculas com importância funcional decorrente da ativação celular, tais como as citocinas inflamatórias, IFN- γ e IL-17, além de moléculas envolvidas no mecanismo de citotoxicidade, tais como granzima A e perforina.

Os resultados, listados abaixo, foram dispostos em subtópicos contendo informações relevantes sobre a percentagem de expressão de IFN- γ dentro da população celular total e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para IFN- γ , bem como a análise da contribuição de cada uma dessas subpopulações celulares para a produção de IFN- γ . Essa análise, também, foi empregada para a citocina inflamatória IL-17, e para as moléculas citotóxicas, granzima A e perforina, respectivamente. Assim como descrito para as moléculas co-estimuladoras, essa avaliação fenotípica utilizou-se de duas abordagens: A) comparação entre os diferentes estímulos, ou seja, entre células sob exposição de LPS de *E.coli*, células expostas ao LPS de *P. gingivalis* e células não submetidas ao tratamento dentro do mesmo grupo de indivíduos; B) comparação dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC).

5.2.2.1 - Avaliação da expressão de IFN- γ dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para IFN- γ

Considerando-se a presença de dados controversos no diz respeito à atuação desta citocina na patogênese da periodontite em humanos (SUÁREZ *et al.*, 2004;

HONDA *et al.*, 2006), foi de grande interesse avaliar a expressão dessa molécula pela população de linfócitos, bem como determinar a contribuição das diferentes subpopulações celulares de linfócitos T nas diferentes formas clínicas da periodontite.

Avaliando-se a expressão de IFN- γ total, considerando-se os diferentes estímulos em indivíduos do grupo C, dados apresentados na tabela 15 (resultado em vermelho) revelaram uma maior expressão dessa citocina pelas células cultivadas na ausência de estímulo, quando comparadas à expressão pelas células expostas ao estímulo de *P. gingivalis*, nesses mesmos indivíduos. Entretanto, ao se comparar os efeitos dos diferentes tratamentos na frequência de expressão de IFN- γ nos indivíduos dos grupos PA e PC, observou-se que o estímulo com LPS de *E. coli* gerou um aumento na produção total de IFN- γ apenas nos indivíduos com PA, quando comparado à expressão de IFN- γ pelas células cultivadas na ausência de estímulo.

Adicionalmente, além das informações obtidas sobre a expressão total de IFN- γ , analisada no sangue periférico, foi relevante avaliar a frequência de células positivas para essa citocina, ao se comparar as diferentes condições de cultura dentro do mesmo grupo de indivíduos. Desse modo, observou-se que, por meio de uma análise comparativa da frequência média das células T CD4⁺ expressando IFN- γ , não houve diferença significativa ao se comparar os diferentes tratamentos dentro de todos os grupos de indivíduos analisados (C, PA e PC) (tabela 15). Interessantemente, ao ser aplicada essa mesma comparação para análise da frequência de células T CD8⁺ expressando a citocina IFN- γ , verificou-se, nos indivíduos com PA, uma maior expressão nas células expostas ao estímulo de *P. gingivalis* em relação às células desses mesmos pacientes quando não cultivadas sob estímulo de LPS (tabela 15, resultado em vermelho). Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada nos demais grupos de estudo (C e PC), quando submetidos a condições diferentes. Em relação às células

duplo-negativas $CD4^+CD8^-$ expressando $IFN-\gamma$, não foi possível notar qualquer diferença significativa ao se realizar comparações dentro de todos os grupos de estudo (C, PA e PC) sob tratamentos diferentes (tabela 15).

A segunda abordagem referiu-se à verificação dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC). Concernente à expressão total de $IFN-\gamma$, não foram observadas alterações significativas entre os indivíduos de todos os grupos de estudo (tabela 15).

Um outro ponto considerável foi ponderar se havia diferenças na frequência das células positivas para $IFN-\gamma$, considerando-se os efeitos de cada tratamento entre os grupos de indivíduos analisados. Desse modo, observou-se, por meio de uma análise comparativa tanto da frequência média das células T $CD4^+$ quanto das células T $CD8^+$ expressando $IFN-\gamma$, a ausência de diferença significativa ao se comparar os indivíduos dos grupos C, PA e PC, sob as mesmas condições (tabela 15). Em relação às células duplo-negativas $CD4^+CD8^-$ expressando $IFN-\gamma$, nas culturas sem estímulo, constatou-se uma frequência significativamente maior somente nos indivíduos do grupo C em relação aos indivíduos do grupo PA (tabela 15, resultado em azul). Porém, a frequência de $CD4^+CD8^-$ expressando $IFN-\gamma$, nas culturas incubadas com os diferentes LPS, não apresentou diferenças significativas entre todos os grupos analisados.

GRUPOS	TRATAMENTO	IFN- γ Total	%T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	%T CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	%CD4 ⁻ CD8 ⁻ IFN- γ ⁺
C (n=7)	MEIO	^a1.08±1.22	0.29±0.62	0.38±0.42	^d0.41±0.27
	LPS- <i>E.coli</i>	0.99±0.60	0.23±0.40	0.33±0.17	0.43±0.21
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^a0.77±0.70	0.15±0.21	0.26±0.20	0.36±0.34
PA (n=9)	MEIO	^b0.44±0.21	0.10±0.08	^c0.19±0.14	^d0.15±0.15
	LPS- <i>E.coli</i>	^b0.81±0.70	0.13±0.07	0.30±0.25	0.38±0.45
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	0.58±0.28	0.11±0.07	^c0.26±0.21	0.21±0.14
PC (n=7)	MEIO	0.64±0.41	0.09±0.09	0.17±0.07	0.38±0.39
	LPS- <i>E.coli</i>	0.71±0.18	0.16±0.16	0.24±0.07	0.31±0.08
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	0.77±0.56	0.13±0.12	0.21±0.08	0.43±0.47

Tabela 15: Percentagem de expressão de IFN- γ dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para IFN- γ . Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas por letras iguais ($p < 0.05$). Diferenças identificadas em vermelho são referentes às comparações realizadas entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Diferenças identificadas em azul são referentes às comparações dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.2 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção da citocina IFN- γ

Para determinar a contribuição das diferentes subpopulações de linfócitos T na produção da citocina IFN- γ e identificar sua principal fonte produtora, procedeu-se, inicialmente, uma análise descritiva da proporção de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ expressando essa molécula. Por meio de dados discriminados na tabela 16, foi possível observar que, nas culturas feitas apenas na presença do meio tanto nos indivíduos do grupo C quanto nos do grupo PC, células duplo-negativas CD4⁻CD8⁻ contribuíram com mais de 43% na produção dessa citocina inflamatória, seguidas pelas células T CD8⁺ e com uma menor contribuição de células T CD4⁺. Ainda nestes mesmos grupos de indivíduos notou-se que, mesmo após o estímulo com os diferentes LPS, não houve mudança na contribuição de diferentes populações para a produção da citocina IFN- γ . Em relação às culturas feitas na ausência de estímulo nos indivíduos do grupo PA, foi possível identificar que as células T CD8⁺ foram as principais produtoras de IFN- γ , seguidas das células CD4⁻CD8⁻ e T CD4⁺, respectivamente. Tal observação se manteve quando culturas foram submetidas ao estímulo de LPS de *P. gingivalis* dentro desse mesmo grupo de indivíduos. Porém, após estímulo com LPS de *E. coli*, ainda dentro do grupo PA, notou-se que células duplo-negativas foram as principais produtoras de IFN- γ , seguidas pelas células T CD8⁺ e com uma contribuição de menos de 19% das células T CD4⁺.

Em seguida, as análises foram feitas da mesma maneira que as descritas nos itens anteriores, com o intuito de verificar se havia diferenças na contribuição de cada uma das subpopulações celulares, em particular, na produção da citocina inflamatória. Portanto, em um primeiro momento, comparou-se, especificamente, a proporção de cada uma das populações celulares, T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando IFN- γ ,

sob os diferentes estímulos de LPS em relação às culturas obtidas na ausência de estímulo dentro do mesmo grupo de estudo (C, PA e PC), sendo que os resultados apresentados na tabela 16 revelaram não haver diferenças significativas na contribuição de cada uma das subpopulações.

Em um segundo momento, comparou-se, especificamente, a proporção de cada uma das populações celulares, T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando IFN- γ , considerando-se os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC). Os resultados obtidos, por meio dessas comparações, mostraram ausência de significância na contribuição de T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ para a produção de IFN- γ (tabela 16).

Contribuição das subpopulações celulares na produção de IFN- γ				
GRUPOS	TRATAMENTO	%T CD4 ⁺	%T CD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁻
C (n=7)	MEIO	14.8±14.5	41.0±21.9	44.2±21.6
	LPS- <i>E.coli</i>	17.6±17.2	34.6±9.7	47.8±16.1
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	15±9.7	40.9±18.6	44.1±9.8
PA (n=9)	MEIO	24.0±23.0	45.1±22.3	30.9±20.0
	LPS- <i>E.coli</i>	18.4±6.0	38.6±15.5	43.0±18.3
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	19.0±12.0	42.4±21.6	38.5±17.0
PC (n=7)	MEIO	15.4±8.5	37.1±22.5	47.5±25.7
	LPS- <i>E.coli</i>	18.9±16.4	35.3±9.0	45.8±13.7
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	17.2±11.8	38.8±20.3	44.0±21.3

Tabela 16: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de IFN- γ . Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, não houve diferenças estatisticamente significativas. C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.3 - Avaliação da expressão de IL-17 dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ positivas para IL-17

Estudos têm relatado o envolvimento de células T na destruição óssea periodontal via produção de IL-17, a qual, por sua vez, está relacionada com a produção de mediadores inflamatórios pelas células adjacentes, contribuindo para uma exacerbação da lesão (BEKLEN *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2009). Contudo, estudos concernentes aos níveis de IL-17 na circulação, em indivíduos com presença ou ausência de doença periodontal, mostram-se necessários para uma melhor compreensão do papel desta citocina na patologia da periodontite.

Avaliando a expressão de IL-17 total, considerando os diferentes estímulos em indivíduos do grupo PC, a tabela 17 (resultado em vermelho) evidenciou uma maior frequência de expressão dessa citocina na população de linfócitos totais quando as células foram submetidas ao estímulo de *P. gingivalis* em relação ao estímulo de *E. coli*. Contudo, ao serem feitas comparações entre os efeitos das diferentes condições de cultura na frequência de expressão de IL-17 nos indivíduos dos grupos C e PA não se obteve significância estatística.

Importante também foi a avaliação da frequência de células positivas para IL-17, ao se comparar os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos (tabela 17). Nesse sentido, ao realizar-se uma análise comparativa da frequência média das células T CD4⁺ expressando IL-17 no grupo PC, uma maior frequência das mesmas foi notada quando as células foram tratadas com LPS de *E. coli* em relação às células tratadas na ausência de estímulo (tabela 17, resultado em vermelho). Entretanto, as comparações realizadas entre os diferentes estímulos, dentro do grupo de indivíduos C e PA, não identificaram diferenças significativas na frequência média de células T CD4⁺ expressando IL-17. Referente à análise da frequência de células T CD8⁺ expressando a

citocina IL-17, não houve alteração significativa ao se comparar os diferentes tratamentos dentro de todos os grupos de estudo (C, PA e PC). De modo interessante, ao ser empregada essa mesma comparação para análise da frequência de células CD4⁺CD8⁻ expressando IL-17, foi possível verificar, tanto no grupo PA quanto no grupo PC, que essas células apresentaram uma frequência significativamente maior sob estímulo de LPS de *P. gingivalis* quando comparadas às células estimuladas com LPS de *E. coli* (tabela 17, resultado em vermelho). Foi notável que, enquanto, no grupo PA, a expressão de IL-17 pelas duplo-negativas foi duas vezes superior, no grupo PC, a expressão dessa citocina foi três vezes maior, após exposição ao estímulo de *P. gingivalis* em relação ao estímulo de *E. coli*. Porém, ao serem feitas comparações entre os diferentes estímulos na frequência de CD4⁺CD8⁻ expressando IL17 nos indivíduos do grupo C, nenhuma alteração significativa foi constatada (tabela 17).

Adicionalmente, verificaram-se os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos analisados (C, PA e PC) tanto na expressão total de IL-17 quanto na frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ expressando essa citocina. Os dados obtidos na tabela 17 mostraram ausência de diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros avaliados.

GRUPOS	TRATAMENTO	IL-17 Total	% T CD4 ⁺ IL-17 ⁺	% T CD8 ⁺ IL-17 ⁺	% CD4 ⁻ CD8 ⁻ IL-17 ⁺
C (n=7)	MEIO	0.76±0.56	0.08±0.06	0.14±0.07	0.54±0.54
	LPS- <i>E.coli</i>	1.08±0.92	0.19±0.31	0.33±0.35	0.56±0.65
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	0.99±.64	0.10±0.09	0.20±0.14	0.69±0.52
PA (n=9)	MEIO	0.49±0.28	0.11±0.08	0.17±0.14	0.21±0.13
	LPS- <i>E.coli</i>	0.47±0.13	0.13±0.04	0.18±0.10	^c0.16±0.12
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	0.65±0.38	0.14±0.12	0.16±0.08	^c0.35±0.36
PC (n=7)	MEIO	0.78±0.40	^b0.11±0.10	0.19±0.09	0.48±0.39
	LPS- <i>E.coli</i>	^a0.69±0.38	^b0.17±0.12	0.22±0.12	^d0.30±0.25
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^a1.51±1.8	0.20±0.31	0.33±0.30	^d0.98±1.25

Tabela 17: Percentagem de expressão de IL-17 dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para IL-17. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas por letras iguais ($p < 0.05$). Diferenças identificadas em vermelho são referentes às comparações realizadas entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Referente às comparações dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.4 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção da citocina IL-17

Ainda referente à citocina IL-17, a identificação de uma subpopulação celular com atividade pró-inflamatória pode auxiliar de modo relevante para o estabelecimento de terapêuticas específicas para a doença. Dessa maneira, foi proposto realizar uma análise descritiva da contribuição de diferentes subpopulações de linfócitos T para a produção desta citocina. A tabela 18 mostrou que, tanto nas culturas feitas apenas na presença do meio quanto naquelas em que as células foram incubadas com os diferentes LPS em indivíduos do grupo C e PC, células duplo-negativas $CD4^-CD8^-$ foram as principais produtoras desta citocina, seguidas pelas células T $CD8^+$ e T $CD4^+$, respectivamente. No que diz respeito à contribuição de cada uma das populações celulares em indivíduos do grupo PA, tanto nas culturas feitas na ausência de estímulo, quanto na presença de *P. gingivalis*, foi possível notar que células duplo-negativas mostraram-se predominantes na produção de IL-17, seguidas pelas células T $CD8^+$. Contudo, quando as culturas foram submetidas ao estímulo com *E. coli*, ainda dentro do grupo PA, a participação dessas células se inverteu, com uma maior contribuição atribuída às T $CD8^+$, seguidas pelas $CD4^-CD8^-$.

Posteriormente, com o intuito de verificar se havia diferenças na contribuição de cada uma das subpopulações celulares, em particular, para a produção da citocina IL-17, procederam-se análises intragrupos, sob estímulos diferentes, e intergrupos, considerando o mesmo tratamento (tabela 18). Primeiramente, comparou-se a proporção de cada uma das populações celulares, T $CD4^+$, T $CD8^+$ e $CD4^-CD8^-$ expressando IL-17, sob os diferentes estímulos, dentro do mesmo grupo de estudo (C, PA e PC). Ao realizar-se uma análise da contribuição de células T $CD4^+$ para a produção de IL-17 no grupo PC, foi possível notar uma produção significativamente maior dessa citocina

pelas células T CD4⁺ após o estímulo com *E. coli*, tanto em relação ao meio quanto em relação ao estímulo com *P. gingivalis* (tabela 18, resultado em vermelho). Porém, as comparações realizadas entre os diferentes estímulos, dentro do grupo C e PA, não revelaram alterações significativas quanto à contribuição das células T CD4⁺ para a produção de IL-17. Referente à contribuição de células T CD8⁺ para a produção da citocina no grupo PA, foi interessante notar que essa subpopulação celular mostrou-se significativamente mais comprometida com a produção de IL-17, tanto na presença apenas do meio quanto sob estímulo de *E. coli*, em relação ao estímulo de *P. gingivalis* (tabela 18, resultado em vermelho). Entretanto, ao serem realizadas essas mesmas comparações entre os diferentes estímulos, dentro do grupo C e PC, não foi possível notar alterações significativas quanto à contribuição das células T CD8⁺ para a produção da citocina. Em relação à contribuição das CD4⁻CD8⁻ para a produção de IL-17 no grupo PA, verificou-se um comprometimento mais significativo dessas células nas culturas feitas na ausência de estímulo em detrimento daquelas sob exposição ao estímulo de *E. coli*. Notavelmente, ao analisar-se a contribuição de CD4⁻CD8⁻ para a produção de IL-17 em indivíduos do grupo PC, constatou-se que a produção dessa citocina pelas duplo-negativas foi significativamente maior após estímulo com *P. gingivalis* quando comparada à produção dessa citocina após estímulo com *E. coli* (tabela 18, resultado em vermelho). Contudo, essa mesma observação não se aplicou ao grupo PA. No tocante à contribuição dessas células no grupo C, não se observaram alterações significativas considerando-se os diferentes estímulos.

Em seguida, comparou-se, especificamente, a proporção de cada uma das subpopulações celulares, T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ para a produção de IL-17, considerando-se os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC). Portanto, os dados obtidos revelaram que LPS de *E. coli* ativou

mais células T CD4⁺ nos indivíduos com PA quando comparados àqueles do grupo C (tabela 18, resultado em azul). Entretanto, as células T CD4⁺, tanto nas culturas sem estímulo quanto naquelas expostas ao LPS de *P. gingivalis*, não mostraram diferenças significativas em sua contribuição para a produção de IL-17 entre todos os grupos de indivíduos analisados. Referente às contribuições específicas das células T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ para a produção de IL-17, levando-se em consideração os efeitos de cada condição de cultura, não houve alterações significativas entre os grupos de indivíduos analisados (tabela 18).

Contribuição das subpopulações celulares na produção de IL-17				
GRUPOS	TRATAMENTO	%T CD4 ⁺	%T CD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁺
C (n=7)	MEIO	11.3±9.3	24.6±20.2	64.1±21.5
	LPS- <i>E.coli</i>	^g 15.6±14.2	31.8±21.2	52.6±27.0
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	9.7±4.2	25.1±19.0	65.2±19.0
PA (n=9)	MEIO	22.8±12.5	^c 35.4±19.2	^e 41.7±18.7
	LPS- <i>E.coli</i>	^g 30.0±10.5	^d 38.8±19.3	^e 31.2±19.1
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	24.2±21.2	^{c,d} 29.8±19.4	46.0±20.4
PC (n=7)	MEIO	^a 14.8±8.8	33.2±29.3	52.0±31.7
	LPS- <i>E.coli</i>	^{a,b} 25.5±15.4	36.7±21.5	^f 37.8±20.8
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^b 11.3±5.3	31.6±24.8	^f 57.1±27.1

Tabela 18: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de IL-17. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas por letras iguais ($p < 0.05$). Diferenças identificadas em vermelho são referentes às comparações realizadas entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Diferenças identificadas em azul são referentes às comparações dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.5 - Avaliação da expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para granzima A.

A exocitose de grânulos contendo moléculas efetoras citolíticas, tais como granzima A e perforina, é uma das principais vias de citotoxicidade mediada por linfócitos (LIEBERMAN, 2003). Entretanto, informações pertinentes sobre a expressão dessas moléculas, bem como o comprometimento de diferentes populações celulares na produção das mesmas são inexistentes no contexto da periodontite humana.

Portanto, verificou-se, inicialmente, a expressão de granzima A na população total de linfócitos comparando-se os efeitos do tratamento com os diferentes LPS em relação às culturas realizadas apenas com meio, dentro do mesmo grupo (C, PA e PC). Por meio de resultados apresentados na tabela 19 (resultados em vermelho), constatou-se que células de indivíduos provenientes dos grupos PA e PC apresentaram uma menor frequência da molécula citotóxica granzima A após exposição ao estímulo de LPS de *P. gingivalis* em relação às células cultivadas apenas com meio. Entretanto, essa observação não foi verificada em células de indivíduos do grupo C.

Da mesma maneira como descrito para as citocinas IFN- γ e IL-17, mostrou-se relevante avaliar a frequência de células positivas para granzima A, ao se comparar as diferentes condições de cultura dentro do mesmo grupo de indivíduos (tabela 19). Logo, observou-se, por meio de uma análise comparativa da frequência média das células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando granzima A, ausência de diferença significativa ao se comparar os diferentes tratamentos dentro de todos os grupos de estudo (C, PA e PC). No contexto das células CD4⁻CD8⁻ expressando granzima A, nos indivíduos dos grupos PA e PC, notou-se uma frequência significativamente menor quando as culturas foram

submetidas ao LPS de *P. gingivalis*, comparando-se aos valores obtidos de culturas realizadas apenas com meio (tabela 19, resultados em vermelho).

GRUPOS	TRATAMENTO	Granzima A Total	%T CD4 ⁺ Granzima A ⁺	%T CD8 ⁺ Granzima A ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁺ Granzima A ⁺
C (n=7)	MEIO	17.50±6.52	2.00±1.03	7.22±3.50	8.28±3.33
	LPS- <i>E.coli</i>	17.73±6.19	2.09±1.40	7.27±4.39	8.37±2.73
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	17.91±7.39	2.21±1.57	7.31±4.84	8.39±2.93
PA (n=9)	MEIO	^a23.78±13.32	3.12±3.20	8.01±7.37	^c12.65±4.51
	LPS- <i>E.coli</i>	22.48±13.04	3.06±3.09	6.23±3.10	13.19±7.98
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^a22.03±13.20	2.86±2.68	8.04±6.84	^c11.13±4.91
PC (n=7)	MEIO	^b27.86±8.55	3.06±1.28	7.48±4.90	^d17.32±7.58
	LPS- <i>E.coli</i>	26.29±9.20	3.23±1.69	6.67±4.57	16.39±7.19
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^b25.42±8.50	2.47±1.11	6.59±3.86	^d16.36±7.64

Tabela 19: Percentagem de expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺ positivas para granzima A, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em vermelho, por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

De modo complementar, verificaram-se os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo (C, PA e PC) tanto na expressão total de granzima A quanto na frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ expressando essa molécula citotóxica (tabela 20). Concernente à expressão total de Granzima A nas culturas sem estímulo, verificou-se uma frequência significativamente maior somente nos indivíduos do grupo PC em relação aos indivíduos do grupo C (tabela 20, resultado em azul). Contudo, essa mesma constatação não esteve presente ao se analisar os efeitos dos diferentes estímulos de LPS em todos os grupos (C, PA e PC).

Adicionalmente, empregaram-se essas mesmas comparações para verificar se havia diferenças na frequência de células positivas para granzima A, considerando os efeitos de cada tratamento entre todos os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Dessa maneira, os resultados apresentados na tabela 20 evidenciaram que a frequência média de células T CD4⁺ e T CD8⁺, expressando a molécula citolítica efetora, não se mostrou significativamente diferente ao se comparar os grupos C, PA e PC, sob as mesmas condições. Por outro lado, curiosamente, células duplo-negativas CD4⁻CD8⁻ expressando granzima A, tanto nas culturas cultivadas apenas na presença do meio quanto nas culturas cultivadas na presença dos diferentes LPS, revelaram uma frequência significativamente maior somente nos indivíduos do grupo PC em relação aos indivíduos do grupo C (tabela 20, resultado em azul). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de CD4⁻CD8⁻ expressando granzima A ao se realizarem essas mesmas comparações entre indivíduos do grupo PA e indivíduos do grupo C, bem como entre indivíduos dos grupos PA e PC.

GRUPOS	TRATAMENTO	Granzima A Total	%T CD4 ⁺ Granzima A ⁺	%T CD8 ⁺ Granzima A ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁺ Granzima A ⁺
C (n=7)	MEIO	^a 17.50±6.52	2.00±1.03	7.22±3.50	^b 8.28±3.33
	LPS- <i>E.coli</i>	17.73±6.19	2.09±1.40	7.27±4.39	^c 8.37±2.73
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	17.91±7.39	2.21±1.57	7.31±4.84	^d 8.39±2.93
PA (n=9)	MEIO	23.78±13.32	3.12±3.20	8.01±7.37	12.65±4.51
	LPS- <i>E.coli</i>	22.48±13.04	3.06±3.09	6.23±3.10	13.19±7.98
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	22.03±13.20	2.86±2.68	8.04±6.84	11.13±4.91
PC (n=7)	MEIO	^a 27.86±8.55	3.06±1.28	7.48±4.90	^b 17.32±7.58
	LPS- <i>E.coli</i>	26.29±9.20	3.23±1.69	6.67±4.57	^c 16.39±7.19
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	25.42±8.50	2.47±1.11	6.59±3.86	^d 16.36±7.64

Tabela 20: Percentagem de expressão de granzima A dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁺ positivas para granzima A, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em azul, por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.6 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção de granzima

A

Baseando-se na proposição de que subpopulações celulares apresentariam um maior comprometimento com um perfil citotóxico, procedeu-se, inicialmente, à uma análise descritiva da contribuição de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ na produção da molécula citotóxica, granzima A. De acordo com a tabela 21, dados relevantes, sobre a contribuição das subpopulações celulares para a produção de granzima A, mostraram que células CD4⁻CD8⁻ são as principais fontes produtoras desta molécula citotóxica, com contribuições superiores a 47% no grupo C, 53% no grupo PA e 61% no grupo PC. Em segundo lugar, encontram-se as células T CD8⁺ com contribuições superiores a 38% no grupo C, 28% no grupo PA e 25% no grupo PC. Uma menor contribuição na produção de granzima A foi atribuída às células T CD4⁺ com percentagens superiores a 12%, tanto em indivíduos do grupo C quanto em indivíduos do grupo PA, e percentagem superior a 9% em indivíduos do grupo PC. Acrescenta-se à esses dados que as subpopulações celulares apresentaram essas contribuições em todos os grupos de indivíduos analisados, independente dos estímulos.

Posteriormente, propôs-se executar as mesmas análises já descritas para as citocinas IFN- γ e IL-17, a fim de se verificar possíveis diferenças na contribuição de cada uma das subpopulações estudadas, em específico, para a produção da molécula citolítica efetora. Dessa forma, verificou-se primeiramente, se a proporção de cada uma das populações celulares, T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando granzima A, seria influenciada quando submetidas a tratamentos diferentes dentro do mesmo grupo de estudo (C, PA e PC), sendo que os resultados identificados na tabela 21 revelaram não haver diferenças significativas na contribuição de cada uma das subpopulações, em particular.

De modo complementar, análises adicionais foram realizadas com o intuito de verificar se a contribuição das células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando Granzima A, seria influenciada ao se considerar os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos. Nesse sentido, foi possível notar nas culturas sem estímulo, uma maior contribuição de T CD8⁺ para a produção de granzima A nos indivíduos do grupo C quando comparados àqueles do grupo PA. Essa mesma observação também esteve presente quando se considerou as culturas incubadas com LPS de *E. coli* (tabela 21, resultado em azul). Entretanto, as células T CD8⁺, nas culturas expostas ao LPS de *P. gingivalis*, não mostraram diferenças significativas em sua contribuição para a produção de Granzima A entre todos os grupos de indivíduos analisados. Referente às contribuições específicas das células T CD4⁺ e CD4⁻CD8⁻ para a produção de Granzima A, levando-se em consideração os efeitos de cada tratamento, notou-se ausência de alterações significativas entre os grupos de indivíduos analisados (tabela 21).

Contribuição das subpopulações celulares na produção de Granzima A				
GRUPOS	TRATAMENTO	% T CD4 ⁺	% T CD8 ⁺	% CD4 ⁺ CD8 ⁺
C (n=7)	MEIO	12.3±6.6	^a 40.2±8.6	47.5±10.0
	LPS- <i>E.coli</i>	12.6±8.2	^b 39.2±11.3	48.2±12.4
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	13.1±8.1	38.3±10.1	48.6±11.6
PA (n=9)	MEIO	12.4±11.4	^a 30.3±9.1	57.3±11.8
	LPS- <i>E.coli</i>	12.6±9.6	^b 28.4±5.5	59.0±8.6
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	12.7±9.6	34.2±10.5	53.1±10.5
PC (n=7)	MEIO	11.0±3.7	27.0±14.8	62.0±15.88
	LPS- <i>E.coli</i>	12.9±7.5	25.2±13.7	61.9±15.6
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	9.8±3.1	26.9±14.7	63.3±15.3

Tabela 21: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de Granzima A. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=7), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=9) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=7). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas por letras iguais ($p < 0.05$). Referente às comparações realizadas entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos, não foi observada diferença significativa. Diferenças identificadas em azul são referentes às comparações dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.7 - Avaliação da expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ positivas para perforina

Outra molécula importante no mecanismo de citotoxicidade é a perforina, proteína formadora de poros na membrana da célula-alvo (LIEBERMAN, 2003).

Neste subtópico, a análise do perfil de citotoxicidade foi realizada de modo semelhante às análises dos itens anteriores. Ao avaliar a expressão de perforina total, considerando os diferentes estímulos em indivíduos do grupo C, os resultados apresentados na tabela 22 mostraram uma maior expressão dessa proteína pelas células cultivadas com LPS de *E. coli* quando comparada à sua expressão tanto pelas células cultivadas apenas na presença do meio quanto pelas células cultivadas com LPS de *P. gingivalis*. Adicionalmente, essas mesmas observações sobre a expressão de perforina pela população total de linfócitos também foram constatadas nos grupos PA e PC (tabela 22, resultados em vermelho).

Além disso, dados interessantes também foram obtidos sobre a frequência de células positivas para perforina ao se comparar os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de estudo (tabela 22). Logo, ao realizar-se uma análise comparativa da frequência média das células T CD4⁺ expressando perforina nos grupos C e PA, uma maior frequência das mesmas foi notada quando as células foram tratadas com LPS de *E. coli* em relação às células tratadas na ausência de estímulo. Resultado relevante ainda foi observado para as células T CD4⁺ expressando perforina, nos indivíduos com PA, que apresentaram uma frequência menor quando as células foram expostas ao LPS de *P. gingivalis* em relação às células expostas ao LPS de *E. coli* (tabela 22, resultados em vermelho). Entretanto, as comparações realizadas entre os diferentes estímulos, dentro do grupo PC, não identificaram diferenças significativas na frequência média de células

T CD4⁺ expressando perforina. No contexto da frequência de células T CD8⁺ expressando a molécula citotóxica, alterações significativas estiveram presentes ao se comparar os diferentes tratamentos dentro de todos os grupos de estudo. Portanto, ao se avaliar a frequência de T CD8⁺, considerando os diferentes estímulos em indivíduos do grupo C, PA e PC, os resultados apresentados na tabela 22, em vermelho, mostraram uma maior frequência dessas células quando cultivadas com LPS de *E. coli* se comparada à sua frequência tanto pelas células cultivadas apenas na presença do meio quanto pelas células cultivadas com LPS de *P. gingivalis*. Referente à frequência de células CD4⁻CD8⁻ expressando perforina, foi possível verificar, tanto no grupo C quanto no grupo PA, que essas células apresentaram uma frequência significativamente maior sob estímulo de LPS de *E. coli* quando comparadas tanto às células cultivadas apenas na presença do meio quanto às células estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (tabela 22, resultados em vermelho). Entretanto, não houve diferenças notáveis na frequência de CD4⁻CD8⁻ expressando perforina ao se considerar os diferentes tratamentos dentro de PC.

GRUPOS	TRATAMENTO	Perforina Total	% T CD4 ⁺ Perforina ⁺	% T CD8 ⁺ Perforina ⁺	% CD4 ⁺ CD8 ⁻ Perforina ⁺
C (n=6)	MEIO	^a 13.46±9.29	^g 1.13±1.66	^j 4.49±6.23	^p 7.84±3.37
	LPS- <i>E.coli</i>	^{a,b} 18.56±11.43	^g 1.72±2.22	^{j,k} 7.62±7.82	^{p,q} 9.22±3.55
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^b 13.70±9.84	1.10±1.54	^k 5.00±7.24	^q 7.60±3.10
PA (n=8)	MEIO	^c 13.70±5.80	^h 1.27±2.67	^l 2.71±3.64	^r 9.72±2.91
	LPS- <i>E.coli</i>	^{c,d} 18.58±7.12	^{h,i} 2.16±3.94	^{l,m} 5.17±4.26	^{r,s} 11.25±2.81
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^d 13.55±4.62	ⁱ 0.91±1.39	^m 2.66±3.71	^s 9.98±2.79
PC (n=5)	MEIO	^e 20.49±6.27	0.80±0.68	ⁿ 2.98±2.45	16.71±4.65
	LPS- <i>E.coli</i>	^{e,f} 25.07±7.90	1.09±0.73	^{n,o} 5.22±3.19	18.76±6.16
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^f 21.03±6.67	0.75±0.48	^o 3.10±2.24	17.18±5.58

Tabela 22: Percentagem de expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ positivas para perforina, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=6), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=8) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=5). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em vermelho, por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

Em seguida, procederam-se as análises dos efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos tanto na expressão total de perforina quanto na frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ expressando a molécula citotóxica (tabela 23). Interessantemente, a produção total de perforina nas culturas submetidas ao estímulo derivado de *P. gingivalis* apresentou-se significativamente aumentada nos indivíduos do grupo PC em relação aos indivíduos do grupo PA (tabela 23, resultado em azul). Contudo, ao se verificar os efeitos das culturas sem estímulo e das culturas submetidas ao estímulo derivado de *E. coli*, na expressão total de perforina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre todos os grupos de indivíduos analisados.

Outro ponto relevante foi verificar a possível presença de diferenças quanto à frequência de células positivas para perforina, considerando-se os efeitos das mesmas condições de cultura entre os diferentes grupos de estudo (tabela 23). Desse modo, observou-se, por meio de uma análise comparativa tanto da frequência média das células T CD4⁺ quanto das células T CD8⁺ expressando perforina, a ausência de diferença significativa ao se comparar os indivíduos dos grupos C, PA e PC, sob as mesmas condições. Entretanto, informações interessantes foram obtidas com relação à frequência de CD4⁻CD8⁻ expressando perforina, sendo possível verificar um aumento duas vezes maior na frequência média de CD4⁻CD8⁻ nos indivíduos do grupo PC quando comparados aos do grupo C, sob os mesmos tratamentos. Novamente, uma frequência aumentada de duplo-negativas expressando perforina foi verificada nos indivíduos do grupo PC em relação aos do grupo PA submetidos às mesmas condições (Tabela 23, resultados em azul).

GRUPOS	TRATAMENTO	Perforina Total	% T CD4 ⁺ Perforina ⁺	% T CD8 ⁺ Perforina ⁺	% CD4 ⁺ CD8 ⁻ Perforina ⁺
C (n=6)	MEIO	13.46±9.29	1.13±1.66	4.49±6.23	^b 7.84±3.37
	LPS- <i>E.coli</i>	18.56±11.43	1.72±2.22	7.62±7.82	^c 9.22±3.55
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	13.70±9.84	1.10±1.54	5.00±7.24	^d 7.60±3.10
PA (n=8)	MEIO	13.70±5.80	1.27±2.67	2.71±3.64	^e 9.72±2.91
	LPS- <i>E.coli</i>	18.58±7.12	2.16±3.94	5.17±4.26	^f 11.25±2.81
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^a 13.55±4.62	0.91±1.39	2.66±3.71	^g 9.98±2.79
PC (n=5)	MEIO	20.49±6.27	0.80±0.68	2.98±2.45	^{b,e} 16.71±4.65
	LPS- <i>E.coli</i>	25.07±7.90	1.09±0.73	5.22±3.19	^{c,f} 18.76±6.16
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^a 21.03±6.67	0.75±0.48	3.10±2.24	^{d,g} 17.18±5.58

Tabela 23: Percentagem de expressão de perforina dentro da população total de linfócitos e frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁺CD8⁻ positivas para perforina, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=6), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=8) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=5). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão (σ). Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em azul, por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

5.2.2.8 – Contribuição das subpopulações celulares para a produção de perforina

Ainda no âmbito da citotoxicidade, avaliou-se a contribuição das subpopulações celulares na produção da proteína citolítica perforina. Descritivamente, os dados identificados na tabela 24 mostraram que, nas culturas sem estímulo bem como nas culturas submetidas aos diferentes LPS em indivíduos dos diferentes grupos (C, PA e PC), as duplo-negativas CD4⁻CD8⁻ foram as principais fontes produtoras desta molécula citotóxica, seguidas pelas T CD8⁺ e pelas T CD4⁺, respectivamente.

Em seguida, análises adicionais foram feitas com o objetivo de verificar se as subpopulações celulares, em questão, poderiam contribuir de modo significativo para a produção de perforina (tabela 24). Portanto, verificou-se primeiramente, se a proporção de cada uma das populações celulares, T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando perforina, seria influenciada quando submetidas a tratamentos diferentes dentro do mesmo grupo de estudo (C, PA e PC). Referente à contribuição de células T CD4⁺ para a produção de perforina no grupo PA, foi possível notar uma produção significativamente maior dessa molécula citotóxica pelas células T CD4⁺ após o estímulo com *E. coli*, tanto em relação ao meio quanto em relação ao estímulo com *P. gingivalis* (tabela 24, resultados em vermelho). Porém, as comparações realizadas entre os diferentes estímulos, dentro do grupo C e PC, não revelaram alterações significativas quanto à contribuição das células T CD4⁺ para a produção de perforina. Relativo à contribuição de células T CD8⁺ em todos os grupos de estudo (C, PA e PC), foi interessante notar que essa subpopulação celular mostrou-se significativamente mais comprometida com a produção de perforina, após o estímulo com *E. coli*, tanto em relação ao meio quanto em relação ao estímulo com *P. gingivalis* (tabela 24, resultados em vermelho). Em relação à contribuição das CD4⁻CD8⁻ para a produção de perforina nos grupos C e PA, verificou-se um comprometimento mais significativo dessas células

nas culturas feitas na ausência de estímulo em detrimento daquelas sob exposição ao estímulo de *E. coli*. Entretanto, essa observação não esteve presente ao se aplicar a mesma comparação para o grupo PC. Notavelmente, células CD4⁺CD8⁻, em todos os grupos de indivíduos analisados, revelaram-se mais comprometidas com a produção de perforina após estímulo com *P. gingivalis* em relação ao estímulo com *E. coli* (tabela 24, resultados em vermelho).

Contribuição das subpopulações celulares na produção de Perforina				
GRUPOS	TRATAMENTO	%T CD4 ⁺	%T CD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁻
C (n=6)	MEIO	8.2±10.7	^c 26.9±17.6	ⁱ 64.9±17.2
	LPS- <i>E.coli</i>	9.0±10.1	^{c,d} 36.7±14.2	^{i,j} 54.3±12.5
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	8.1±10.0	^d 28.3±20.5	^j 63.6±19.2
PA (n=8)	MEIO	^a 6.6±10.80	^e 15.7±16.74	^k 77.6±22.63
	LPS- <i>E.coli</i>	^{a,b} 9.0±12.1	^{e,f} 24.8±15.1	^{k,l} 66.2±20.3
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	^b 6.1±8.0	^f 15.9±16.8	^l 78.0±19.8
PC (n=5)	MEIO	4.2±3.7	^g 13.5±8.0	82.3±6.8
	LPS- <i>E.coli</i>	4.7±2.7	^{g,h} 20.3±9.4	^m 75.0±10.7
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	4.0±2.6	^h 14.1±8.8	^m 81.9±7.3

Tabela 24: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de perforina, considerando os diferentes tratamentos dentro do mesmo grupo de indivíduos. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=6), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=8) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=5). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em vermelho, por letras iguais ($p < 0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

Finalmente, comparações adicionais foram feitas para verificar se a contribuição, das células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, expressando perforina, em particular, seria influenciada ao se considerar os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos (tabela 25). Nesse contexto, foi possível notar nas culturas submetidas ao estímulo derivado de *E. coli*, uma maior contribuição de CD4⁻CD8⁻ para a produção de perforina nos indivíduos do grupo PC quando comparados àqueles do grupo C (tabela 25, resultado em azul). Entretanto, as células CD4⁻CD8⁻, tanto nas culturas sem estímulo quanto naquelas expostas ao LPS de *P. gingivalis*, não mostraram diferenças significativas em sua contribuição para a produção de perforina entre todos os grupos de indivíduos analisados. Referente às contribuições específicas das células T CD4⁺ e T CD8⁺ para a produção da molécula citolítica efetora, levando-se em consideração os efeitos das diferentes condições de cultura, não houve alterações significativas entre os grupos de indivíduos analisados.

Contribuição das subpopulações celulares na produção de Perforina				
GRUPOS	TRATAMENTO	%T CD4 ⁺	%T CD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁻
C (n=6)	MEIO	8.2±10.7	26.9±17.6	64.9±17.2
	LPS- <i>E.coli</i>	9.0±10.1	36.7±14.2	^a 54.3±12.5
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	8.1±10.0	28.3±20.5	63.6±19.2
PA (n=8)	MEIO	6.7±10.8	15.7±16.7	77.6±22.6
	LPS- <i>E.coli</i>	9.0±12.1	24.8±15.1	66.2±20.3
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	6.1±8.0	15.9±16.8	78.0±19.8
PC (n=5)	MEIO	4.2±3.7	13.5±8.0	82.3±6.8
	LPS- <i>E.coli</i>	4.7±2.7	20.3±9.4	^a 75.0±10.7
	LPS- <i>P.gingivalis</i>	4.0±2.6	14.1±8.2	81.9±7.3

Tabela 25: Análise da contribuição das subpopulações celulares na expressão de perforina, considerando os efeitos de cada tratamento entre os indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos pertencentes ao grupo C (n=6), indivíduos pertencentes ao grupo PA (n=8) e indivíduos pertencentes ao grupo PC (n=5). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio-padrão. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas foram representadas, em azul, por letras iguais ($p<0.05$). C=controle; PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

Outro aspecto importante, neste trabalho, consistiu em avaliar a existência de correlação entre as citocinas e moléculas citotóxicas, considerando-se a população linfocitária total. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas (dados não mostrados).

6-DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória associada a uma infecção bacteriana, sendo que a resposta inflamatória dos tecidos periodontais à essa infecção é influenciada por inúmeros fatores, dentre os quais podem ser citados os fatores ambientais e os genéticos. A observação de que a doença periodontal apresenta uma etiologia multifatorial tem justificado o grande número de estudos com o intuito de se pesquisar por fatores de risco predisponentes à doença ou predisponentes às suas principais manifestações clínicas (STABHOLZ *et al.*, 2010).

Apesar de estudos realizados em humanos mostrarem que o acúmulo e a maturação do biofilme dental desencadeiam uma inflamação nos tecidos gengivais circunvizinhos, a duração do início (PAGE, 1986) e intensidade do processo inflamatório (OLIVER *et al.*, 1998) variam consideravelmente de indivíduo para indivíduo, sugerindo a participação da genética humana na resposta imune na doença periodontal. Dessa forma, acredita-se que a elucidação da base genética da doença periodontal contribuirá para uma melhor compreensão de sua etiologia, classificação, diagnóstico e tratamento (KINANE *et al.*, 2005). Assim, numerosas pesquisas têm sido feitas para identificar marcadores genéticos que possam estar associados com a susceptibilidade do indivíduo a essa importante doença inflamatória.

Polimorfismos gênicos têm sido investigados como possíveis marcadores para uma susceptibilidade aumentada do indivíduo à doença periodontal e, nesse contexto, é útil mencionar a valiosa contribuição de KORNMAN *et al.* (1997) que verificaram a presença de uma associação entre a gravidade da periodontite crônica e polimorfismos das citocinas IL-1A (-889) e IL-1B (+3954). Este achado, por sua vez, despertou interesse na investigação de possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e a

doença periodontal, sendo a maioria das investigações direcionadas para as citocinas (PARKHILL *et al.*, 2000; SOGA *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2005).

Uma das citocinas cruciais na prevenção de patologias inflamatórias e auto-imunes é a citocina IL-10, sendo que aproximadamente 50 a 80% de sua produção está relacionada a fatores genéticos (CRAWLEY *et al.*, 1999), dentre os quais estão os SNPs no promotor de IL-10 (TURNER, 1997; REICHERT *et al.*, 2008). Neste estudo, a ocorrência de polimorfismos funcionais nos seguintes *loci* do promotor da IL-10 (-592, -819 e -1082) foi avaliada em uma parcela da população brasileira, do Sudeste de Minas Gerais (MG), e dados obtidos forneceram informações importantes sobre a contribuição genética dessa citocina para a doença periodontal nessa população. Embora a população brasileira seja muito miscigenada, a população de MG é uma população interessante de ser estudada, uma vez que suas características genéticas são bastante representativas da população brasileira como um todo, no tocante a herança étnica (PARRA *et al.*, 2003). Assim, embora haja diferenças individuais, do ponto de vista da população, a população de MG é uma boa referência para a população brasileira como um todo.

Associação do polimorfismo C/A, no *locus* -592, do gene *IL-10* com o grupo de indivíduos com PA foi observada, sendo que o genótipo A⁺ conferiu uma chance duas vezes maior dos indivíduos serem diagnosticados com a forma PA (tabela 5). Este resultado é divergente da maioria dos trabalhos que não verificou associação deste polimorfismo com a PA. REICHERT *et al.* (2008), ao investigarem esse mesmo *locus* em alemães, não encontraram diferenças significantes nas frequências genótípicas entre indivíduos com PA e indivíduos com ausência da doença periodontal. Essas mesmas observações também foram constatadas por HU *et al.* (2009) em uma população taiwanesa. Relevante dizer que, em nosso estudo, a associação com o polimorfismo no *locus* -592 não foi constatada ao se excluírem os fumantes da análise, o que reforça a

importância desse fator de risco ambiental para a doença periodontal. Por outro lado, a falta de associação nos estudos realizados por REICHERT *et al.* (2008) e HU *et al.* (2009) esteve presente mesmo quando as análises incluíram os fumantes.

Além disso, nenhuma associação de qualquer genótipo ou alelo com a PC foi observada quando avaliado o *locus* -592 (tabela 5). Resultados similares relatados por GONZALES *et al.* (2002) evidenciaram a ausência de associação deste polimorfismo com PC em caucasianos. HU *et al.* (2009), por outro lado, observaram que o genótipo AC desempenhou um papel mais protetor em taiwaneses não fumantes com PC. Entretanto, SCAREL-CAMINAGA *et al.* (2004) observaram associação deste polimorfismo entre os grupos C e PC, em indivíduos brasileiros provenientes de Piracicaba/SP (São Paulo – Brasil), refletindo o fato de que diferenças genótípicas podem ser diferentemente herdadas de populações etnicamente diferentes (PARRA *et al.*, 2003).

No presente trabalho observou-se uma maior frequência do genótipo A⁺, no *locus* -592, em torno de 55%, nos indivíduos não fumantes com PC, em relação aos indivíduos do grupo C, em torno de 45%, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas. SCAREL-CAMINAGA *et al.* (2004), por sua vez, encontraram alterações significativas nas frequências genótípicas entre os grupos PC e C, de 71.6% e 51.2%, respectivamente. CLAUDINO *et al.* (2008), em investigações realizadas em indivíduos de Ribeirão-Preto/SP -Brasil, também relataram uma incidência significativamente maior do genótipo A⁺ no grupo PC quando comparada à do grupo C e com valores semelhantes aos obtidos por SCAREL-CAMINAGA *et al.* (2004). Além das limitações da amostragem utilizada neste estudo, uma explicação plausível para a discrepância entre os dados apresentados nesta pesquisa e as observações constatadas por outros autores no estudo do polimorfismo do gene *IL-10*

(*locus* -592) dentro da população brasileira pode se relacionar à grande miscigenação presente em nossa população (SCAREL-CAMINAGA *et al.*, 2002). Além disso, mesmo levando-se em consideração que indivíduos de uma mesma região geográfica são mais similares entre si do que indivíduos distantes, é oportuno lembrar que 95% da variabilidade genética humana está contida dentro das próprias populações (ROSENBERG *et al.*, 2002).

Em relação ao parâmetro clínico de gravidade da doença periodontal, PI, a falta de associação entre o polimorfismo C/A, *locus* -592, do gene *IL-10* e a PC, no atual estudo (tabela 6), não esteve em concordância com dados relatados por SUMER *et al.* (2007) em turcos. Dados obtidos por estes autores, em não fumantes, mostraram que o genótipo A⁺ foi prevalente em 68% dos turcos com a forma grave da PC enquanto que, nesse trabalho, o genótipo A⁺ apresentou uma prevalência em torno de 54%, nos indivíduos não fumantes com a forma grave da PC, reforçando a presença de diferenças genótípicas entre populações etnicamente diferentes (PARRA *et al.*, 2003). CLAUDINO *et al.* (2008), por sua vez, demonstraram que indivíduos da região de Ribeirão Preto/SP com genótipo A⁺ apresentaram valores maiores de média de profundidade de sondagem do que indivíduos com genótipo A⁻. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao se considerar apenas a PI, assim como obtido no presente estudo em indivíduos da região de MG. Tendo-se em vista que dados da literatura mencionam a PI como uma medida mais representativa de gravidade da doença em termos de perda de estrutura dentária de suporte, essa informação fundamentou o uso desse parâmetro clínico no atual trabalho (PIHLSTROM, 2001).

Referente ao polimorfismo C/T, no *locus* -819, do gene *IL-10*, não foi constatada associação com a susceptibilidade à doença periodontal (tabela 7). Esse achado está de acordo com dados obtidos em japoneses (YAMAZAKI *et al.*, 2001) e alemães

(GONZALES *et al.*, 2002; REICHERT *et al.*, 2008). Contudo, está em desacordo com observações descritas em uma parcela da população brasileira (SCAREL-CAMINAGA *et al.*, 2004). No atual trabalho, indivíduos não fumantes do grupo PC apresentavam a frequência do genótipo T⁺ em torno de 63%, enquanto que nos indivíduos não fumantes do grupo C essa frequência esteve em torno de 59%. Resultados obtidos em indivíduos brasileiros da região de Piracicaba/SP revelaram uma frequência de 77%, para o genótipo T⁺, naqueles pertencentes ao grupo PC, em contraposição à frequência de 51% nos indivíduos do grupo C.

No âmbito da gravidade da doença periodontal, também se verificou ausência de associação com o polimorfismo C/T, no *locus* -819 (tabela 8). SCAREL-CAMINAGA *et al.* (2004), apesar de encontrarem uma relevante associação desse polimorfismo com a PC, não forneceram informações com referência a uma possível associação com a gravidade nessa forma clínica.

Ausência de associação também foi notada entre genótipos e alelos com os diferentes grupos de estudo e o polimorfismo G/A, no *locus* -1082 (tabela 9). Estes estudos foram iniciados em nosso grupo e reportados por MOREIRA *et al.* (2009). No presente trabalho, completamos os dados publicados por Moreira, pareando os pacientes para as análises dos três polimorfismos citados, com o objetivo de avaliar a influência dos prováveis haplótipos formados por eles na susceptibilidade à doença periodontal. Resultados evidenciando uma ausência de associação entre o polimorfismo (G/A), no *locus* -1082, do gene *IL-10* e a doença periodontal também foram descritos por MELLATI *et al.* (2007) em iranianos com PA. Interessantemente, em nosso estudo, a distribuição genotípica em não fumantes pertencentes ao grupo C (18% para GG, 45% para GA e 37% para AA) foi semelhante àquela obtida em iranianos não fumantes (11.5% para GG, 50.8 para GA e 37.7% para AA), mostrando que apesar das

populações serem diferentes, a distribuição genotípica foi praticamente a mesma. Contudo, essa observação não se manteve ao se comparar as distribuições genotípicas em não fumantes com PA, no presente trabalho (8% para GG, 42% para GA e 50% para AA), com as distribuições genotípicas observadas em iranianos não fumantes com PA (17% para GG, 52% para GA e 31% para AA), indicando que a atuação desse polimorfismo na susceptibilidade à forma agressiva da doença periodontal pode ser mascarado por outros fatores ambientais ou genéticos que podem ser diferentes nas duas populações.

Por outro lado, BERGLUNDH *et al.* (2003) evidenciaram uma associação do polimorfismo G/A, no *locus* -1082, relatando uma maior prevalência do genótipo GG (61%) em suecos não fumantes com a forma grave da PC, sendo a mesma não observada neste estudo realizado em brasileiros não fumantes de MG (7%) (tabela 10). Em caucasianos da Macedônia foi notada uma distribuição significativamente diferente dos genótipos GG entre indivíduos dos grupos PC e C (13.5% e 5.7%, respectivamente), verificando-se que esses genótipos apresentavam uma associação susceptível com a PC, representada por um *odds ratio* de 2.59 (ATANASOVSKA-STOJANOVSKA *et al.*, 2012). Contudo, investigações anteriores feitas na população japonesa demonstraram a ausência do alelo G (YAMAZAKI *et al.*, 2001). Todos esses resultados reforçam a existência de variações genotípicas em populações com diferenças étnicas.

Nesse corrente estudo, para todos os polimorfismos abordados na região promotora do gene *IL-10*, as análises utilizadas, incluindo também os fumantes, estiveram em concordância com dados reportados previamente por outros autores (GALBRAITH *et al.*, 1999; BERGLUNDH *et al.*, 2003). Entretanto, devidos aos conhecidos efeitos entre o fumo e doença periodontal (ERDEMIR *et al.*, 2004; PALMER *et al.*, 2005; GAUTAM *et al.*, 2011), nossos resultados incluíram ainda

observações verificadas após a exclusão de indivíduos fumantes, com o intuito de demonstrar se os polimorfismos investigados apresentariam uma influência preponderante na doença periodontal.

Com o objetivo de investigar o impacto dos polimorfismos genéticos na região promotora da IL-10 na doença periodontal, foi empregada a análise multivariada com regressão logística binária. Além disso, pretendeu-se verificar a possibilidade de se obter um modelo capaz de estimar a probabilidade de ocorrência de uma das formas clínicas (PA ou PC) também em função de outros fatores (idade; gênero; presença ou ausência do hábito de fumar e presença ou ausência da variante polimórfica). Por meio desta técnica estatística foi possível verificar na forma clínica PA que o *odds ratio* foi aumentado para a presença do genótipo A⁺, no *locus* -592, quando ajustado para os outros fatores de confusão já citados (tabela 12). Em contrapartida, confirmou-se a falta de associação entre os polimorfismos nos dois outros *loci*, -819 e -1082, com a essa forma clínica. Dados da literatura mostraram uma associação do haplótipo ATA, relacionados à baixa produção da citocina IL-10, e indivíduos com PA (REICHERT *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009), embora informações sobre a associação dos genótipos, individualmente, não tenham sido apontadas, utilizando-se de regressão logística. No presente estudo, por sua vez, não foi possível verificar associação com haplótipos. Interessantemente, um *odds ratio* aumentado para a co-variável fumo reforçou a importante participação desse fator de risco na PA, (STABHOLZ *et al.*, 2010), enfatizando o seu efeito aditivo nos indivíduos que possuíam o genótipo A⁺ de IL-10, *locus* -592, para a forma clínica PA.

Referente ao modelo obtido para a forma clínica PC, assim como observado em PA, notou-se um *odds ratio* aumentado para a presença do genótipo A⁺, no *locus* -592, quando igualmente ajustado para os outros fatores de confusão (tabela 13). Além disso,

a falta de associação com os polimorfismos nas posições -819 e -1082 também esteve presente. HU *et al.* (2009) encontraram que carreadores dos haplótipos ATA/ACC foram menos prováveis de desenvolverem a PC do que indivíduos com outros haplótipos (OR=0.46), embora nenhuma informação tenha sido dada sobre a associação individual dos genótipos, por meio da técnica estatística de regressão. Contudo, no modelo atual de PC, a informação sobre associação com haplótipos não pôde ser testada, devido a inexistência dos mesmos. Outro dado de considerável importância foi um *odds ratio* aumentado para a co-variável fumo, fortalecendo a associação desse fator de risco com a PC (STABHOLZ *et al.*, 2010), enfatizando o efeito aditivo que o hábito de fumar apresentaria nos indivíduos com genótipo A⁺ de IL-10, *locus* -592, para a forma clínica PC, assim como também notado para o modelo de PA. Além disso, a associação da idade nesse modelo de estudo sugere que a prevalência da PC aumente com a idade (ALBANDAR, 2002). Entretanto, esse fator de risco não se mostrou associado no modelo de PC descrito em taiwaneses (HU *et al.*, 2009).

Dados da literatura relatam que um SNP pode contribuir diretamente ou estar em desequilíbrio de ligação com outra variante próxima que verdadeiramente confere susceptibilidade ou resistência à doença (WOHLFAHRT *et al.*, 2006). Associações positivas entre os polimorfismos gênicos da IL-10, nos *loci* -592, -819 e -1082, sugeriram que esses polimorfismos podem estar em desequilíbrio de ligação. Entretanto, essa observação não foi constatada no presente estudo. DASHASH *et al.* (2006) demonstraram que o polimorfismo C/A, no *locus* -592, está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo C/T, no *locus* -819, ao estudarem crianças britânicas com gengivite. Entretanto, informações sobre a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os alelos dos polimorfismos no promotor da IL-10 são escassas na doença periodontal, ressaltando a importância de serem executados mais estudos nessa área.

Outras moléculas também importantes na resposta imune do hospedeiro na doença periodontal são as co-estimuladoras, embora os estudos dedicados a uma melhor compreensão de seu papel, tanto no campo genotípico quanto no fenotípico, ainda se mostram insuficientes. Portanto, o atual trabalho mostrou que os polimorfismos nos genes *CD28*, no *locus* +17 (T/C), e *CTLA-4*, no *locus* +49 (A/G), são possíveis marcadores de susceptibilidade e gravidade na doença periodontal. Uma melhor discussão sobre esses polimorfismos está abordada, adequadamente, no artigo anexado no final deste volume.

Considerando-se etiologia multifatorial da doença periodontal, é notável que numerosos estudos têm sido realizados para se avaliar o efeito de polimorfismos genéticos na patogênese dessa doença inflamatória nas diversas populações. Desse modo, torna-se relevante avaliar o perfil imune de indivíduos que apresentem determinado polimorfismo. Contudo, no atual trabalho, a avaliação de características fenotípicas e funcionais de leucócitos provenientes de indivíduos, com presença ou ausência de doença periodontal, baseando-se nos diferentes genótipos, apresentou algumas limitações. Referente ao polimorfismo do CD28, a análise não foi possível devido à ausência de indivíduos com genótipo CC, pertencentes à periodontite crônica. Quanto ao polimorfismo do CTLA-4, essa caracterização também não foi possível pelo fato de não haver associação entre esse polimorfismo e a ocorrência da doença periodontal. Em relação aos polimorfismos nas regiões do promotor de IL-10, também se observou a ausência de associação entre esses polimorfismos e a periodontite, em indivíduos não fumantes. Em adição, trabalhos realizados, anteriormente, por nosso grupo relataram aumento na frequência de células IL-10⁺ em monócitos CD14⁺ em indivíduos com PC quando comparada à de indivíduos do grupo C (LIMA *et al.*, 2011). É interessante notar que, apesar dos polimorfismos do gene *IL-10*, abordados nesse

trabalho, não serem marcadores de susceptibilidade ou gravidade na doença periodontal, a citocina IL-10 encontrou-se associada à PC. Portanto, considerando o resultado obtido no atual estudo e os dados mostrados por LIMA *et al.* (2011), optou-se por não reavaliar a expressão funcional de IL-10.

Entretanto, sabendo-se que processos inflamatórios e imunes na periodontite são complexos e várias questões necessitam ser esclarecidas, essa pesquisa avaliou as características fenotípicas e funcionais de leucócitos de indivíduos, com ou sem doença periodontal, independente dos polimorfismos gênicos estudados, frente aos estímulos de LPS de *E.coli* e *P. gingivalis*.

Primeiramente, verificou-se existiam diferenças na expressão de moléculas relacionadas com o processo de ativação celular por linfócitos, submetidos ou não ao tratamento de LPS, dentro do mesmo grupo de estudo (figura 5). Os resultados revelaram que, no grupo PA, houve uma diminuição na frequência de células CD4⁺CD28⁺ nos linfócitos tratados com LPS de *P. gingivalis* quando comparado ao de *E. coli*, fortalecendo dados da literatura que demonstraram alterações significantes na resposta do hospedeiro devido a diferenças estruturais importantes no LPS entre diferentes espécies bacterianas (KUMADA *et al.*, 1995). Essa justificativa também pode ser estendida para a diminuição na frequência de CD4⁺CTLA-4⁺ e IMF de CTLA-4 em CD4⁺CTLA-4⁺, nos grupos PA e PC e para a frequência de CD8⁺CTLA-4⁺, nos grupos PA e PC.

JUNE *et al.* (1990) verificaram que CD28 é expresso na superfície da maioria de células T CD4⁺ e em cerca de 50% de células T CD8⁺, em humanos. No presente estudo, indivíduos do grupo PA apresentavam a média de células T CD4⁺ expressando CD28 em torno de 45%, enquanto que a média de células T CD8⁺ expressando CD28

esteve em torno de 10%. Existem pelo menos duas possibilidades para explicar esse achado: (1) as células CD4⁺ e CD8⁺ foram ativadas durante a doença e deixaram de expressar o CD28 ou (2) as células CD28⁺ podem ter sido recrutadas para as lesões. De fato, ORIMA *et al.* (1999) mostraram maiores frequências de células T para CD28 nas lesões periodontais, contudo suas observações foram constatadas apenas em indivíduos do grupo PC. No atual trabalho, o fato de não serem encontradas uma frequência muito alta de células T CD4⁺CD28⁺, no sangue periférico, indica possivelmente uma maior ativação das mesmas em sítios próximos aos locais de inflamação. A diminuição de expressão de CD28 após a ativação celular é bem aceita na literatura (AZUMA *et al.*, 1993). DUTRA *et al.* (1994) mostraram que pacientes chagásicos possuem elevada frequência de células T ativadas em sua circulação e, posteriormente, que essas células não expressam a molécula CD28 (DUTRA *et al.*, 1996). Assim, é possível que a ativação dessas células, em pacientes com a doença, seja responsável pela diminuição da expressão de CD28.

As análises relativas aos efeitos de cada tratamento entre os diferentes grupos de estudo (C, PA e PC) demonstraram ausência de alterações nas frequências de expressão de células CD4⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁺ e IMF de CD28 pelos linfócitos, submetidos ou não aos diferentes LPS (figura 6), sugerindo que o percentual de CD28 pode não refletir diferenças no status clínico. Esses achados corroboraram com os de AOYAGI *et al.* (2000) que observaram ausência de diferenças significativas no percentual de CD28, após as células do sangue periférico, provenientes de indivíduos com PC, terem sido estimuladas com membrana externa de *P. gingivalis*. Notavelmente, GEMMELL *et al.* (2001) não encontraram alterações significativas no percentual de CD28, ao compararem infiltrados teciduais de indivíduos com presença e ausência de doença periodontal, sem a presença de qualquer estímulo.

ORIMA *et al.* (1999), ao estudarem a cinética de expressão de CTLA-4 em células T no sangue periférico, verificaram que 2.59% dessas células eram positivas para CTLA-4 em um período de 24 h de cultura. Essa observação assemelha-se aos resultados encontrados no presente estudo, com culturas realizadas em um período de 16 h, quanto à frequência de células CD4⁺CTLA-4⁺, no grupo PA, após estímulo com LPS de *E.coli* se comparado ao meio. Adicionalmente, foi possível notar um aumento na frequência de CD4⁺CTLA-4⁺, nos grupos C e PC, após estímulo com LPS de *E.coli* se comparado ao meio, indicando, em todos os grupos de indivíduos analisados, uma regulação positiva da expressão de CTLA-4, após a estimulação com LPS de *E.coli* (figura 5).

É bem estabelecido que o pico de expressão superficial de CTLA-4 ocorre em 48 horas após a ativação (LINSLEY *et al.*, 1992). No atual trabalho, a detecção de uma baixa expressão superficial de CTLA-4, ao serem comparados os diferentes estímulos em todos os grupos de estudo, provavelmente ocorreu pelo menor de tempo de cultura utilizado em nossos experimentos de estimulação *in vitro*. Outra constatação interessante foi a maior expressão superficial de CTLA-4 pelas CD4⁺, em relação às CD8⁺, ao serem comparados os diferentes estímulos em todos os grupos de estudo, dado esse que se contrapõe ao de LINSLEY *et al.*, (1992), o qual mostrou que, em linfócitos ativados, CTLA-4 foi igualmente expresso pelas subpopulações celulares CD4⁺ e CD8⁺, indicando que a expressão dessa molécula é regulada de modo similar em ambas as subpopulações celulares de células T.

De modo interessante, nesse presente estudo, o uso de estímulo derivado de *P. gingivalis* promoveu um aumento significativo no percentual de células T CD4⁺ expressando CTLA-4 em indivíduos com PC quando comparados aos indivíduos com PA (figura 6). Estes dados sugerem uma maior inibição dos linfócitos T com

diminuição da resposta proliferativa dessas células, acarretando, conseqüentemente, uma menor intensidade no processo de destruição tecidual observado em indivíduos com PC, ou seja, haveria uma maior possibilidade dos linfócitos serem controlados em suas respostas em indivíduos com essa forma clínica. Em contrapartida, esse mesmo estímulo não gerou diferenças no percentual de células T CD4⁺CTLA-4⁺ quando foram feitas comparações entre os indivíduos dos grupos PA e PC com o grupo C, não estando em concordância com AOYAGI *et al.* (2000) que demonstraram um percentual aumentado de CTLA-4 em CD4⁺ nos indivíduos com PC em relação ao de indivíduos do grupo C, após estímulo com membrana externa de *P. gingivalis*. É possível que as respostas das células T ao LPS de *P. gingivalis*, entre indivíduos com ausência de doença periodontal e indivíduos com as formas clínicas PA ou PC, possam ser reguladas preferencialmente por citocinas imunomodulatórias e não pela molécula CTLA-4. Contudo, análises mais detalhadas são necessárias para esclarecer este ponto. Hipotetizando, é provável que a diminuição da expressão de CD28 esteja relacionada à ativação celular. Sabe-se que a expressão de CTLA-4 é induzida pela ativação celular intensa, com o intuito de controlar a resposta celular (SAITO & YAMASAKI, 2003). Assim, os dados desse trabalho apresentam certa coerência: diminuição de CD28 e aumento de CTLA-4.

A interação entre moléculas co-estimuladoras (CD28 e CTLA-4) e seus ligantes (B7-1 e B7-2) é uma etapa importante no controle de respostas celulares, influenciando perfis de citocinas que, por sua vez, podem atuar na reabsorção de tecidos de suporte do periodonto (BODET *et al.*, 2006). Desse modo, julgamos importante a análise de citocinas, tais como IFN- γ e IL-17, além de moléculas citotóxicas, granzima A e perforina. Relacionado à essas últimas, estudos se mostram pertinentes já que o papel da

citotoxicidade, mediado por essas moléculas, na defesa contra a infecção por bactérias periodontopatogênicas não se encontra caracterizado até o momento.

Uma das citocinas inflamatórias, cujo papel não se encontra bem estabelecido no mecanismo de destruição tecidual nas diferentes formas clínicas da doença periodontal, é o IFN- γ . Referente às comparações feitas entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos (tabela 15), foi possível notar no grupo C uma diminuição na expressão total de IFN- γ após estímulo com LPS de *P.gingivalis* em relação ao estímulo com meio, o que poderia sugerir que diversidades individuais na produção dessa citocina inflamatória estariam relacionadas com a habilidade de monócitos em produzir IL-12 (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Além disso, as células provenientes de indivíduos com PA e PC produziram níveis semelhantes de IFN- γ em resposta ao LPS de *P. gingivalis* se comparadas àquelas estimuladas com LPS de *E. coli*, sendo possível apontar que a produção total de IFN- γ observada, nesse caso, não foi antígeno-específica (KOBAYASHI *et al.*, 2000). Trabalhos anteriores relataram que a avaliação de subpopulações linfocíticas secretando citocinas pode contribuir na triagem de indivíduos susceptíveis à doença periodontal ou influenciar as possibilidades de estratégias terapêuticas (GÓRSKA *et al.*, 2005). Nesse sentido, a maior frequência de células T CD8⁺ secretando IFN- γ , em PA, quando estimuladas por *P. gingivalis* em relação às células cultivadas sem estímulo, poderia indicar que a produção de IFN- γ pelas T CD8⁺ seria crítica na atividade dessas células para osteoclastogênese. Adicionalmente, apesar da diferença na expressão dessa citocina pelas T CD8⁺ ser pequena, ao se comparar o estímulo com *P. gingivalis* e o meio, pode se inferir que essa expressão resultaria em uma maior propensão à destruição tecidual, nos indivíduos com PA (HONDA *et al.*, 2006). É possível, nesse caso, que a maior expressão de IFN- γ pelas células T CD8⁺ estimule a formação osteoclástica e perda óssea, *in vivo*, via

quimioatração de células RANKL⁺ (GARLET *et al.*, 2008). Contudo, estudos direcionados para as vias de sinalização se fazem necessários para elucidar essa questão.

Ao serem realizadas as comparações dos efeitos de cada tratamento entre os diferentes grupos, observou-se que não houve diferenças significativas na produção total de IFN- γ (tabela 15). Ausência de alterações na expressão do RNAm dessa citocina inflamatória foi relatada por SUARÉZ *et al.* (2004) entre indivíduos dos grupos C e PA, sugerindo que não houve associação entre a expressão do IFN- γ e a patogênese da doença periodontal. Outrossim, verificou-se no grupo C, do atual trabalho, uma maior frequência de células CD4⁺CD8⁻ expressando o IFN- γ em relação ao grupo PA, nas culturas sem estímulo. É importante mencionar que o termo de células T CD4⁺CD8⁻ não pôde ser utilizado, devido ao fato de não ter sido realizada a marcação para TCR. Portanto, nesse trabalho, as células que não expressavam os co-receptores CD4 e CD8 poderiam ser linfócitos T duplo-negativos, células NK ou linfócitos B. É pouco provável que sejam as últimas, uma vez que linfócitos B são pobres produtores dessa citocina. Estudos avaliando a resposta celular a antígenos bacterianos, sobretudo LPS, já mostraram que células T duplo-negativas respondem ativamente a estes estímulos (BENIHOUD *et al.*, 1997). Assim, embora nossos estudos não tenham esclarecido a identidade dessa população de células duplo-negativas, fica claro que elas são importantes na imunorregulação na doença periodontal, por serem importantes produtoras de citocinas.

Para se determinar um possível papel funcional de uma subpopulação celular, em específico, seja em uma resposta imune protetora ou patogênica, torna-se importante determinar a contribuição de uma subpopulação comprometida com a produção de citocinas específicas. Desse modo, no contexto da contribuição das subpopulações

celulares para a produção de IFN- γ , a análise descritiva revelou um maior comprometimento das células CD4⁻CD8⁻, seguidas pelas T CD8⁺ nos grupos C e PC, independentemente do estímulo utilizado (tabela 16). Em periodontite, células NK T são ativadas para produzirem grandes quantidades de IFN- γ e a elevada proporção de NK T em lesões de indivíduos com PC, quando comparadas aos tecidos gengivais e sangue periférico, é um fenômeno comumente observado durante a infecção periodontal (YAMAZAKI *et al.*, 2001). Dados obtidos por GÓRSKA *et al.* (2005) evidenciaram percentagens aumentadas de células NK, no sangue periférico, em indivíduos do grupo PC em relação ao grupo C, embora não tenham observado o comprometimento dessas células com a produção de IFN- γ . Tendo-se em vista os dados apresentados nesse trabalho, CD4⁻CD8⁻ foram as principais fontes para a produção de IFN- γ , geralmente. Considerando-se que essa subpopulação celular também englobaria as células NK T, mais investigações nessa área tornam-se essenciais para verificar a verdadeira participação dessas células para a produção de IFN- γ , no sangue periférico de todos os grupos de indivíduos analisados.

ANDRUKHOV *et al.* (2011) mostraram que níveis séricos maiores de IFN- γ poderiam ser causados pelo aumento na produção desta citocina por células NK, contudo as proporções aumentadas dessas células estiveram significativamente associadas com altas cargas de *A. actinomycetemcomitans* e não com *P. gingivalis*, estando relacionadas, portanto, com a PA. Esses achados não são suportados pelas observações feitas no presente estudo referentes à contribuição das fontes celulares no grupo PA, no qual a principal fonte produtora de IFN- γ foi a subpopulação T CD8⁺, geralmente (tabela 16). É possível que frente ao estímulo com LPS de *P. gingivalis*, T CD8⁺ estejam, preferencialmente, mais comprometidas com a produção de IFN- γ que

células NK ou NK T, sendo aceitável especular que o uso da bactéria *A. actinomycetemcomitans*, mais associada com a PA, poderia ser um importante contribuinte para mudanças nas proporções das subpopulações linfocíticas (ANDRUKHOV *et al.*, 2011).

Ainda referente à contribuição das fontes celulares para a produção do IFN- γ , ausência de significância foi notada quando as comparações dentro do mesmo grupo de indivíduos ou entre grupos (C, PA e PC) foram realizadas (tabela 16). Nossos resultados corroboram com os de PETIT *et al.* (2001) que também não observaram alterações significantes nas subpopulações celulares T CD4⁺ e T CD8⁺ comprometidas com a produção de IFN- γ , entre pacientes com gengivite e pacientes com PC. GÓRSKA *et al.* (2005), por sua vez, mostraram diferenças significativas na subpopulações celulares de T CD4⁺ entre indivíduos dos grupos PC e C, embora não tenham sido notadas diferenças para T CD8⁺, sendo possível que a presença contínua do antígeno desencadeie alterações nas subpopulações linfocíticas do sangue periférico.

Pesquisas recentes têm focado na identificação e caracterização da citocina IL-17, devido ao seu papel na regulação do sistema imune e sua possível contribuição para desordens clínicas, tais como leishmaniose cutânea (KEESEN, 2010), artrite reumatóide (MOON *et al.*, 2012) e doença de Chagas (VALENTE, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2013). No atual trabalho, foi possível notar um aumento na expressão total de IL-17, no grupo PC, após estímulo com LPS de *P. gingivalis* em relação ao LPS de *E. coli* (tabela 17). Além das diferenças estruturais citadas entre os LPS de diferentes espécies bacterianas, o LPS de *P. gingivalis* apresenta um menor potencial na indução de citocinas pró-inflamatórias se comparado ao de *E. coli* (MARTIN *et al.*, 2001). Contudo, o aumento na produção de IL-17 no grupo PC se relaciona, provavelmente, ao

fato de ter sido utilizado o LPS da bactéria mais associada com a forma crônica da periodontite. De modo notável foi o aumento na frequência de células CD4⁺CD8⁻ expressando a citocina IL-17 nas duas formas clínicas, PA e PC, após estímulo derivado de *P. gingivalis* em relação ao de *E. coli*, podendo-se admitir que a superexpressão de tal mediador inflamatório pelas células CD4⁺CD8⁻, no sangue periférico de indivíduos com PA e PC, esteja relacionada a uma hiperreatividade potencial dessas células nestes indivíduos que pode favorecer a destruição tecidual, nas duas formas clínicas principais da doença periodontal (DUARTE *et al.*, 2010). Somando-se a esse dado, a frequência dessas células expressando IL-17, no grupo PC, apresentou-se três vezes maior após estímulo com *P. gingivalis*, enquanto que no grupo PA, a frequência foi duas vezes maior após o mesmo estímulo; todos em relação ao estímulo com *E. coli*, reforçando a justificativa de que diferentes LPS estejam relacionados à diversidade na resposta do hospedeiro. Além disso, ao comparar-se o efeito do LPS de *P. gingivalis* entre os indivíduos dos grupos PA e PC, apesar de não se detectar significância estatística, notou-se que a expressão de IL-17 pelas CD4⁺CD8⁻ foi maior no grupo PC. Como é bem reconhecido na literatura que *A. actinomycetemcomitans* apresenta um papel principal em PA, enquanto *P. gingivalis* é o patógeno mais envolvido com PC (KOBAYASHI *et al.*, 2000), é possível que o maior aumento observado nesta última se deva ao uso do LPS da bactéria mais associada com a PC.

Todavia, análises relativas aos efeitos dos diferentes tratamentos, entre os grupos, não demonstraram alterações significantes na produção de total de IL-17 (tabela 17). No estudo realizado por DUARTE *et al.* (2010) notou-se diminuição nos níveis de IL-17 nos indivíduos com PA, após 6 meses de terapia periodontal não cirúrgica. Interessantemente, após o tratamento, esses níveis foram semelhantes aos de indivíduos saudáveis do ponto de vista periodontal. A ausência de significância na produção total

de IL-17 entre os indivíduos com PA ou PC e indivíduos do grupo C, observado no presente estudo, pode ser devida ao fato de que os indivíduos com doença periodontal utilizados nestes experimentos *in vitro* já se encontravam em tratamento periodontal. Nesse sentido, os resultados obtidos levantam certos aspectos na metodologia, na qual seria ideal que todos os indivíduos recrutados, para os experimentos com culturas celulares, estivessem sob o mesmo tempo de tratamento periodontal. Embora, esse tenha sido um limitante do presente estudo, devido à inviabilidade em se conseguir, simultaneamente, indivíduos com as formas clínicas PA e PC que estivessem sob o mesmo tempo de tratamento, os resultados apresentados aqui são bastante relevantes, pois a maioria das pesquisas realizadas *in vitro* no campo imunopatologia da periodontite não leva em consideração o tempo de tratamento periodontal. Nossos resultados corroboram também com os de BORCH *et al.* (2009), que não encontraram diferenças na liberação de IL-17 por células mononucleares entre indivíduos dos grupos C e PA. De modo semelhante, ÖZÇAKA *et al.* (2011), por sua vez, obtiveram concentrações plasmáticas de IL-17 similares entre indivíduos dos grupos C e PC, sendo todos não fumantes. Ocasionalmente, amostras de plasma podem não revelar efeitos significantes no conteúdo da IL-17 e, de fato, isto parece ser o caso de acordo com os presentes achados.

Diferentemente, alguns estudos clínicos evidenciaram níveis significativamente maiores de IL-17 no fluido crevicular e em sobrenadantes de culturas celulares de tecidos gengivais de pacientes com PC em relação aos indivíduos do grupo C (VERNAL *et al.*, 2005). DUTZAN *et al.* (2009), por sua vez, demonstraram aumento na expressão de IL-17 em lesões periodontais progressivas quando comparadas à lesões quiescentes de indivíduos com PC, levando à especulação que IL-17 pode ser um

marcador de atividade de doença periodontal, hipótese também compartilhada por SCHEINKEIN *et al.* (2010) sobre a atuação de IL-17 na patogênese da PA.

Embora estudos prévios tenham demonstrado que células Th17 são as principais produtoras da citocina IL-17A, recentemente tem sido relatado que esta citocina, em algum grau, pode ser produzida também por neutrófilos e NK T, sendo todas essas células encontradas em lesões periodontais (SEYMOUR *et al.*, 1993). VERNAL *et al.* (2005), utilizando-se de culturas celulares provenientes de tecido gengival de indivíduos com PC, demonstraram que linfócitos são as células predominantes e que T CD4⁺ estavam em maior quantidade em relação às T CD8⁺. Além do mais, a maioria das células T CD4⁺ que expressavam IL-17, infiltrantes nas lesões periodontais, eram do tipo CD45RO⁺. De modo geral, nesse presente estudo, o baixo percentual de células T CD4⁺, comprometidas com a produção de IL-17, no sangue periférico, quando comparado ao percentual de T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ (tabela 18), pode indicar uma maior migração de células T CD4⁺ e uma menor migração de CD4⁻CD8⁻ para os sítios inflamatórios. É interessante notar, em outras doenças infecciosas, que células T CD4⁻CD8⁻ foram as mais implicadas com a produção de IL-17 em indivíduos chagásicos na fase aguda (VALENTE, 2012). Várias linhas de evidência sugerem a participação de T CD4⁻CD8⁻ na patogênese de doenças auto-imunes e, nesse cenário, investigações realizadas por ALUNNO *et al.* (2012), em pacientes com Síndrome de Sjögren, evidenciaram um maior comprometimento de T CD4⁻CD8⁻ com a produção de IL-17 e consequente dano às glândulas salivares.

Tomados em conjunto, os dados obtidos quanto à contribuição das populações celulares para a produção de IL-17 permitiram algumas apreciações relevantes, ao serem comparados os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos (tabela 18). Nesse contexto, células T CD4⁺ estavam mais comprometidas com a produção de

IL-17, no grupo PC, quando estimuladas com *E. coli* e não com *P. gingivalis*, sendo razoável admitir que o estímulo da bactéria mais associada com a PC possa ter desencadeado uma maior migração de células T CD4⁺ para os locais de destruição tecidual. Em contrapartida, nesses mesmos indivíduos, a maior contribuição de células CD4⁻CD8⁻ para a produção da IL-17, frente ao estímulo com *P. gingivalis* em relação ao de *E.coli*, sugere que essas populações celulares desempenhem um importante papel no sangue periférico e apresentem uma menor migração para as lesões periodontais, estando em concordância com resultados apresentados por VERNAL *et al.* (2005). Estudos realizados em outras doenças infecciosas, tais como a leishmaniose cutânea, comprovaram o maior comprometimento de células NK T duplo-negativas, no sangue periférico, com a produção de IL-17 após estímulo com antígeno solúvel de leishmania, identificando o papel patogênico dessas subpopulações celulares na leishmaniose cutânea (KEESEN, 2010). Tais achados despertam a necessidade de uma maior compreensão sobre a atuação dessas células duplo-negativas na patogênese da doença periodontal.

Por outro lado, foi interessante notar no grupo PA que células T CD8⁺ foram as principais produtoras da citocina inflamatória IL-17 no grupo PA, quando estimuladas com LPS de *E.coli* em relação ao de *P. gingivalis* (tabela 18). Assim como admitido para o grupo PC, é possível supor que o estímulo com *P. gingivalis* desencadeie uma maior migração dessas células para os sítios inflamatórios. SIGUSCH *et al.* (2006) obtiveram números aumentados para T CD8⁺ no fluido crevicular de indivíduos com PA em relação aos indivíduos dos grupos C e PC.

Referente aos efeitos de cada tratamento entre os diferentes grupos de indivíduos analisados sobre a contribuição das subpopulações celulares para a produção da citocina inflamatória IL-17, o presente trabalho evidenciou, de modo geral, ausência de

significância (tabela 18). Os resultados identificados corroboram, em parte, com aqueles de SUÁREZ *et al.* (2004) que detectaram ausência de alterações significantes na subpopulação T CD8⁺ de lesões periodontais de indivíduos com PA, quando comparada à de indivíduos saudáveis do ponto de vista periodontal, indicando, provavelmente, um papel limitado para T CD8⁺ nas lesões de indivíduos com PA.

A importância dos linfócitos é bem descrita na doença periodontal, embora estudos sobre o potencial citotóxico dos mesmos no sangue mostrem-se, até o momento, escassos. Dessa maneira, os dados apresentados, neste trabalho, sobre as moléculas citotóxicas granzima A e perforina forneceram informações relevantes. Com relação à expressão total de granzima A, indivíduos dos grupos PA e PC apresentaram uma produção reduzida dessa molécula citotóxica após o estímulo com LPS de *P. gingivalis* quando comparado ao meio (tabela 19). Pesquisas conduzidas com linfócitos T CD8⁺ levedura-específicos, em humanos, identificaram que essas células sofreram degranulação após estímulo específico de leveduras no sangue total (BREINIG *et al.*, 2012). Esses achados nos levam a sugerir que o estímulo de *P. gingivalis* promoveu, nos indivíduos que já apresentavam a doença periodontal PA ou PC, uma menor degranulação pelas subpopulações celulares, justificando uma produção total diminuída de granzima A. De modo correspondente, os indivíduos desses mesmos grupos PA e PC apresentaram uma redução na frequência de CD4⁻CD8⁻ expressando granzima A após o estímulo proveniente da bactéria periodontopatogênica *P. gingivalis*, indicando, provavelmente, uma regulação negativa dessas células.

Ao serem realizadas as comparações entre os grupos (tabela 20), a expressão de granzima A total aumentou no grupo PC em relação ao grupo C, mesmo na ausência de estímulo, sugerindo uma regulação positiva da molécula citolítica nos indivíduos com a forma crônica da doença. Notavelmente, os indivíduos do grupo PC apresentaram

frequências aumentadas de células CD4⁻CD8⁻ expressando granzima A, em relação aos indivíduos do grupo C, em todas as condições de cultura, indicando, possivelmente que o aumento deste mediador citotóxico pelas subpopulações CD4⁻CD8⁻ desempenharia um importante papel na patogênese da PC. É válido mencionar, novamente, que as células aqui referidas como CD4⁻CD8⁻ compreenderiam, por exemplo, as células NK T. HODGE *et al.* (2012), em seu relevante trabalho sobre bronquiolite obliterante, demonstraram uma percentagem aumentada de células de NK T expressando granzima A no sangue periférico de indivíduos com a síndrome em relação aos indivíduos com ausência de doença pulmonar. Entretanto, para que essa afirmativa se aplique no presente estudo sobre a doença periodontal, faz-se necessário o uso de marcadores específicos para identificar qual a real proporção das subpopulações celulares, dentro das denominadas CD4⁻CD8⁻, que estão comprometidas, predominantemente, com uma maior produção de granzima A.

A granzima A é a protease mais abundante nos grânulos citotóxicos de células NK e linfócitos T citotóxicos, sendo constitutivamente expressa nas primeiras e induzida em linfócitos T CD8⁺ após encontro com o seu antígeno (LIEBERMAN, 2003). Neste trabalho, a análise descritiva das fontes produtoras de granzima A no sangue periférico revelou o maior comprometimento de células CD4⁻CD8⁻, seguidas pelas T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente, em todos os grupos de estudo (tabela 21), corroborando, em parte, com estudos prévios realizados por GROSSMAN *et al.* (2004) que identificaram as células T CD8⁺ como a população citolítica intermediária seguidas pelas T CD4⁺, no sangue periférico de doadores saudáveis. De modo similar, VALENTE (2012) demonstraram que células T CD8⁺ são mais citotóxicas que T CD4⁺, tanto em indivíduos chagásicos na fase aguda quanto em indivíduos não infectados.

Referente à perforina foi possível notar dentro do mesmo grupo de estudo que o estímulo com *P. gingivalis* promoveu, de um modo geral, uma redução total nos níveis de expressão dessa molécula, bem como uma redução na frequência de células T CD4⁺, T CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, quando comparado ao estímulo com *E. coli* (tabela 22). É razoável admitir que alterações estruturais nos LPS estejam envolvidas diferentemente no processo de citotoxicidade.

Interessantemente, ao serem procedidas comparações dos efeitos de cada tratamento entre os diferentes grupos, estímulo com *P. gingivalis* acarretou uma maior produção total de perforina nos indivíduos com PC em relação aos que apresentavam PA (tabela 23). É possível admitir que essa diferença na resposta seja condizente com o uso do LPS mais associado com a PC. Adicionalmente, a frequência de CD4⁻CD8⁻ expressando a perforina aumentou nos indivíduos com PC em relação aos do grupo C, indicando, provavelmente, que o aumento na expressão dessa molécula citolítica efetora pelas CD4⁻CD8⁻ desempenhe um papel na patogênese da PC. Além disso, dados relevantes mostraram o aumento na expressão de perforina pelas CD4⁻CD8⁻ no grupo PC quando comparado ao grupo PA, em todas as condições de cultura, sugerindo, eventualmente, um relacionamento com o comportamento clínico da doença. Essa hipótese foi verificada por LAGE *et al.* (2011) em lesões de líquen plano bucal, caracterizadas por períodos alternados de exacerbação e quiescência, nas quais houve um aumento na frequência de T CD8⁺ expressando granzima B e perforina quando comparadas às de líquen plano cutâneo. Todavia, para explorar se estas moléculas levariam a diferenças no comportamento clínico entre PC e PA, torna-se necessária avaliar sua expressão diretamente nas lesões periodontais.

Devido à propriedade de formar poros em membranas, a perforina é admitida ter um papel central na citólise mediada por linfócitos T e células NK (KUMMER *et al.*,

1995). No presente estudo, a análise descritiva dos dados sugere que células $CD4^-CD8^-$ são mais citotóxicas que células $T CD8^+$ e $T CD4^+$, respectivamente, como demonstrado pelo maior comprometimento das primeiras com a produção de perforina (tabela 24). Nesse caso, é razoável considerar o maior envolvimento de NK T duplo- negativas e, como essas células compartilham características funcionais com células NK e não expressam os co-receptores CD4 e CD8, pode ser sugerido que elas são mais semelhantes às células NK da imunidade inata. Entretanto, mais estudos são necessários para fundamentar essa hipótese.

Com relação aos dados obtidos sobre suas principais fontes produtoras, diferenças significativas interessantes foram identificadas por meio de comparações entre os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo de indivíduos (tabela 24). Com relação à subpopulação celular $T CD4^+$ no grupo PA, o estímulo com *P. gingivalis* levou a um menor comprometimento dessa subpopulação com a produção de perforina, quando comparado ao estímulo com *E. coli*. Essa mesma constatação pôde ser notada para a subpopulação $T CD8^+$ em todos os grupos de indivíduos analisados. Entretanto, células $CD4^-CD8^-$ após o estímulo derivado de *P. gingivalis* apresentaram-se mais comprometidas com a produção de perforina, quando comparadas ao estímulo por *E. coli*, em todos os grupos de estudo. Tomados em conjunto, esses dados reforçam a presença de respostas variadas frente aos diferentes estímulos de LPS. Além do mais, pode-se especular que enquanto *P. gingivalis* induza as células $CD4^-CD8^-$ a produzirem mais perforina, em todos os grupos (C, PA e PC); esse mesmo estímulo desencadearia um efeito diferente na subpopulação $T CD8^+$, com uma menor produção de perforina, ou até mesmo, pode ser sugerido que outra via de degranulação seja usada por essas células levando a uma maior liberação de outra proteína perturbadora de membrana, a granulisina. Investigações prévias em linfócitos $T CD8$ levedura-específicos sugeriram

que essas células apresentavam um perfil molecular efetor não clássico, sendo programadas preferencialmente para a granulicina e não para a perforina (BREINIG *et al.*, 2012). Nesse sentido, é possível apontar que outras moléculas citolíticas estariam em evidência na patogênese da doença periodontal, embora estudos adicionais devam ser realizados para confirmar essa teoria.

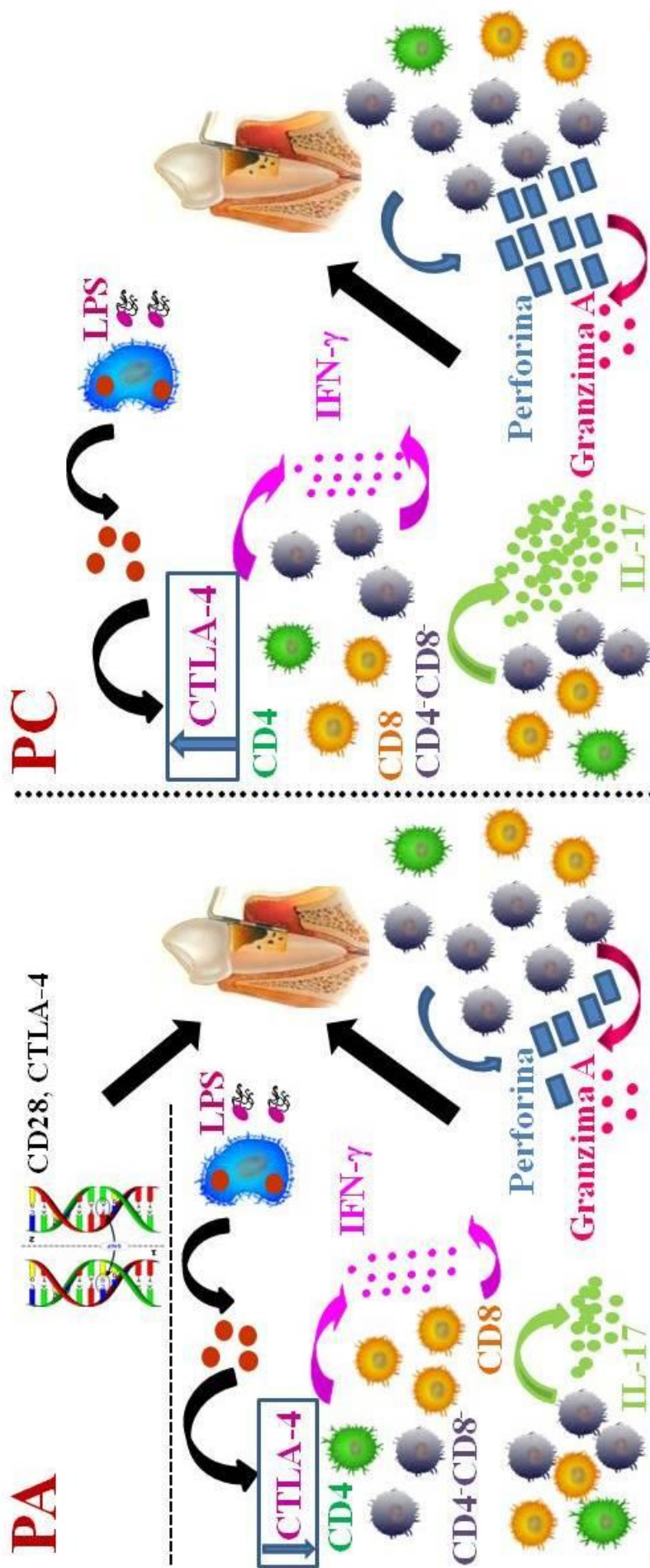
Finalmente, apesar do atual estudo prover novos conhecimentos acerca da imunopatologia da doença periodontal, é válido mencionar que estes resultados não devem ser interpretados individualmente, considerando-se a etiologia multifatorial da periodontite. Destaca-se a relevância de que outros polimorfismos genéticos e a expressão fenotípica de moléculas codificadas por estes genes sejam analisados, com o intuito de se identificar possíveis biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da periodontite. Ademais, os dados obtidos apontam para novas perspectivas a serem elucidadas quanto à heterogeneidade funcional de subpopulações linfocíticas, principalmente no campo da citotoxicidade, o que pode influenciar no desenvolvimento de intervenções terapêuticas para os indivíduos com as principais formas clínicas da periodontite. Portanto, acreditamos que a realização desta tese, acrescida de informações atuais, contribui para uma melhor compreensão da patogênese dessa importante doença inflamatória.

7 - CONCLUSÕES

- Associação do polimorfismo T/C, no *locus* +17, do gene *CD28* com a PA, em indivíduos não fumantes.
- Associação do polimorfismo A/G, no *locus* +49, do gene *CTLA-4* com uma maior perda de inserção clínica em indivíduos não fumantes com PA.
- Ausência de associação dos polimorfismos C/A, *locus* -592; C/T, *locus* -819 e G/A, *locus* -1082, do gene *IL-10* com as diferentes formas clínicas, e com a perda de inserção, em indivíduos não fumantes.
- Análise multivariada dos polimorfismos do gene *IL-10* revelou uma associação entre o genótipo A⁺, no *locus* -592, do gene *IL-10* com um maior risco dos indivíduos desenvolverem as diferentes formas clínicas da doença periodontal, considerando o fator de risco fumo.
- Maior percentual de células T CD4⁺CTLA-4⁺ no grupo PC em relação ao grupo PA, estando as células submetidas ao estímulo de *P. gingivalis*, indicando, possivelmente, uma resposta mais controlada dos linfócitos nos indivíduos do grupo PC.
- Maior frequência de células T CD8⁺ expressando IFN- γ , em indivíduos com PA, quando cultivadas com *P. gingivalis* em relação às células na ausência de estímulo.
- Aumento na produção total de IL-17 por linfócitos de indivíduos com PC; quando estimulados com *P. gingivalis* em relação ao estímulo com *E. coli*, provavelmente relacionado ao uso do LPS da bactéria periodontopatogênica mais associada com a PC.

- Maior frequência de células CD4⁻CD8⁻IL17⁺ nos indivíduos com PA e PC, quando estimuladas com *P. gingivalis* em relação ao estímulo com *E. coli*, indicando uma hiper-reatividade potencial dessas células.
- Menor contribuição de células T CD4⁺ para a produção de IL-17, quando submetidas ao estímulo com *P. gingivalis* se comparadas ao de *E. coli*.
- Maior frequência de células CD4⁻CD8⁻Granzima A⁺ no grupo PC em relação ao grupo C, em todas as condições de cultura, sugerindo uma possível atuação na patogênese da PC.
- Aumento na frequência de células CD4⁻CD8⁻perforina⁺ no grupo PC, em relação aos grupos C e PA, em todas as condições de cultura, sugerindo atuação na patogênese da PC.
- Células CD4⁻CD8⁻ são as principais produtoras de perforina, nos grupos C, PA e PC, quando cultivadas com *P. gingivalis* se comparadas às cultivadas com *E. coli*, reforçando a presença de respostas variadas frente aos diferentes estímulos de LPS.

A partir dos dados mostrados nessa tese foi possível construir um modelo teórico, contendo nossa interpretação dos resultados obtidos. Este modelo está mostrado no esquema 2 e indica a possível participação de cada um dos fatores estudados na resposta imune na doença periodontal e sua possível influência nos processos de patogênese ou proteção.



Esquema 2: Resumo e interpretação dos resultados obtidos para as formas clínicas PA e PC. Associação dos polimorfismos nos genes *CD28* (T/C) e *CTLA-4* (A/G) foi observada apenas em indivíduos não fumantes com a forma clínica PA. Análises referentes às características fenotípicas e funcionais de leucócitos de indivíduos com PC revelaram um maior percentual de células T CD4⁺CTLA-4⁺ em relação às de indivíduos com PA, frente ao estímulo de LPS de *P. gingivalis*, indicando, possivelmente, uma resposta mais controlada dos linfócitos nos indivíduos do grupo PC. Referente ao perfil imunológico de citocinas inflamatórias, maior frequência de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ foi observada em indivíduos com PA, frente ao estímulo com LPS de *P. gingivalis*, em relação às células na ausência de estímulo. Tal observação não foi notada no grupo PC. Outra citocina inflamatória, IL-17, apresentou um aumento em sua produção pela população de linfócitos totais de indivíduos com PC, quando estimulados por LPS de *P. gingivalis*. Adicionalmente, notou-se maior frequência de CD4⁺CD8⁺IL-17⁺ nos grupos PA e PC, indicando uma hiper-reatividade potencial dessas células. Essa mesma população celular, apresentou-se como a principal fonte produtora de IL-17, seguida pelas T CD8⁺ e T CD4⁺. Concerne ao potencial citotóxico em células do sangue periférico, o estímulo derivado de *P. gingivalis* promoveu uma diminuição na produção total de granzima A, bem como uma menor frequência de células CD4⁺CD8⁺Granzima A⁺, nos grupos PA e PC. As análises de outra molécula citolítica efetora, perforina, revelaram que linfócitos de indivíduos com PC produziram uma maior quantidade dessa molécula, quando comparados aos do grupo PA, estando submetidos ao LPS de *P. gingivalis*. Interessantemente, o aumento considerável na frequência de células CD4⁺CD8⁺perforina⁺ no grupo PC, em relação ao PA, sugeriu uma atuação na patogênese da PC. Além disso, células CD4⁺CD8⁺ ocuparam uma posição de destaque na produção de perforina, sendo seguidas pelas T CD8⁺ e T CD4⁺. PA=periodontite agressiva; PC=periodontite crônica.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCARDO-PALUMBO, A.; FERRANTE, A.; CADELO, M.; CICCIA, F.; PARRINELLO, G.; LIPARI, L.; GIARDINA, A.R.; RIILLI, M.; GIARDINA, E.; DIELI, F.; TRIOLO, G. The level of soluble Granzyme A is elevated in the plasma and in the Vgamma9/Vdelta2 T cell culture supernatants of patients with active Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.*, 22, S45-9, 2004.
- ACHYUT, B.R.; TRIPATHI, P.; GHOSHAL, U.C.; MOORCHUNG, N.; MITTAL, B. Interleukin-10 (-819 C/T) and tumor necrosis factor-alpha (-308 G/A) gene variants influence gastritis and lymphoid follicle development. *Dig Dis Sci.*, 53, 622-9, 2008.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*, 8, 942-949, 2007.
- ADIBRAD, M.; DEYHIMI, P.; GANJALIKHANI HAKEMI, M.; BEHFARNIA, P.; SHAHABUEI, M.; RAFIEE, L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res.*, 47, 525-31, 2012.
- AHMED, S.; IHARA, K.; KANEMITSU, S.; NAKASHIMA, H.; OTSUKA, T.; TSUZAKA, K.; TAKEUCHI, T.; HARA, T. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford)*, 40, 662-667, 2001.
- ALBANDAR, J. M. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000*, 29, 31-69, 2002.
- ALBANDAR, J.M.; RAMS, T.E. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000*, 29, 207-222, 2002.
- ALBANDAR, J. M; TINOCO, E. M. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000*, 29, 153-176, 2002.
- ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*, 1, 220-228, 2001
- ALUNNO, A.; BISTONI, O.; BARTOLONI, E.; CATERBI, S.; BIGERNA, B.; TABARRINI, A.; MANNUCCI, R.; FALINI, B.; GERLI, R. IL-17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.*, 0, 1-7, 2012.
- ANDRUKHOV, O.; ULM, C.; REISCHL, H.; NGUYEN, P.Q.; MATEJKA, M.; RAUSCH-FAN, X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol.*, 82, 885-92, 2011.
- AOYAGI, T.; YAMAZAKI, K.; KABASAWA-KATOH, Y.; NAKAJIMA, T.; YAMASHITA, N.; YOSHIE, H.; HARA, K. Elevated CTLA-4 expression on CD4

T cells from periodontitis patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen. *Clin Exp Immunol.*, 119, 280-286, 2000.

APATZIDOU, D.A.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*, 9, 973–983, 2005.

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

ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 34, 9-21, 2004.

ARMITAGE, G.C.; CULLINAN, M.P. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 53, 12-27. Review, 2010.

ARTESE, L.; SIMON, M.J.; PIATTELLI, A.; FERRARI, D.S.; CARDOSO, L.A.; FAVERI, M.; ONUMA, T.; PICCIRILLI, M.; PERROTTI, V.; SHIBLI, J.A. Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in aggressive and chronic periodontitis: a comparative study. *Clin Oral Investig*, 15, 2, 233-40, 2011.

ATANASOVSKA-STOJANOVSKA, A.; TRAJKOV, D.; POPOVSKA, M.; SPIROSKI, M. IL10 -1082, IL10 -819 and IL10 -592 polymorphisms are associated with chronic periodontitis in a Macedonian population. *Hum Immunol.*, 73, 753-758, 2012.

AZUMA, M.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol.*, 150, 1147-1159, 1993.

BAKER, P. J.; DIXON, M.; EVANS, R. T.; DUFOUR, L.; JOHNSON, E; ROOPENIAN, D. C. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*, 67, 2804-2809, 1999.

BAKER, P. J.; EVANS, R. T.; ROOPENIAN, D. C. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol*, 39, 1035-1040, 1994.

BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.*, 263-5, 2005.

BEKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GÜRGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y.T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.*, 86, 347-351, 2007.

BENIHOUD, K.; BONARDELLE, D.; BOBÉ, P.; KIGER, N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol.*, 27, 415-420, 1997.

BERGLUNDH, T.; DONATI, M.; HAHN-ZORIC, M.; HANSON, L.A.; PADYUKOV, L. Association of the -1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol.*, 30, 249-254, 2003.

BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol.*, 143, 50-57, 2006.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28, 495-503, 1990.

BORCH, T.S.; LØBNER, M.; BENDTZEN, K.; HOLMSTRUP, P.; NIELSEN, C.H. Decreased interleukin-2 responses to Fusobacterium nucleatum and Porphyromonas gingivalis in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.*, 80, 800-807, 2009.

BOSSHARDT, D. D; LANG, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*, 84, 9-20, 2005.

BREINIG, T.; SCHELLER, N.; GLOMBITZA, B.; BREINIG, F.; MEYERHANS, A. Human yeast-specific CD8 T lymphocytes show a nonclassical effector molecule profile. *Med Microbiol Immunol.*, 201, 127-136, 2012.

BROTHWELL, D.; GHIABI, E. Periodontal health status of the Sandy Bay First Nation in Manitoba, Canada. *Int J Circumpolar Health*, 68, 23-33, 2009.

BROWN, L. J.; LOE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2, 57-71, 1993.

BURMEISTER, J.A.; BEST, A.M.; PALCANIS, K.G.; CAINE, F.A.; RANNEY, R.R. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *J Clin Periodontol*, 11, 181-192, 1984.

CARDOSO, C.R.; GARLET, G.P.; CRIPPA, G.E.; ROSA, A.L.; JÚNIOR WM, ROSSI MA, SILVA JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.*, 24, 1-6, 2009.

CARRENO, B. M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 20, 29-53, 2002.

CHOI, Y.; WOO, K. M.; KO, S. H.; LEE, Y. J.; PARK, S. J.; KIM, H. M.; KWON, B. S. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol*, 31, 2179-2188, 2001.

CLAUDINO, M.; TROMBONE, A.P.; CARDOSO, C.R.; FERREIRA, S.B. J.R.; MARTINS, W.J.R.; ASSIS, G.F.; SANTOS, C.F.; TREVILATTO, P.C.; CAMPANELLI, A.P.; SILVA, J.S.; GARLET, G.P. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG

expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol.*, 84, 1565-1573, 2008.

CLAUDINO, M.; GARLET, T.P.; CARDOSO, C.R.; DE ASSIS, G.F.; TAGA, R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S.; GARLET, G.P. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci.*, 118,19-28, 2010.

COREY, L. A.; NANCE, W. E.; HOFSTEDE, P.; SCHENKEIN, H. A. Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *J Periodontol*, 64, 1205-1208, 1993.

COSTA, G.C.; DA COSTA ROCHA, M.O.; MOREIRA, P.R.; MENEZES, C.A.; SILVA, M.R.; GOLLOB, K.J., DUTRA, W.O. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*, 199, 451-4, 2009.

CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*,42, 1101-1108, 1999.

CULLINAN, M.P.; WESTERMAN, B.; HAMLET, S.M.; PALMER, J.E.; FADDY, M.J.; SEYMOUR, G.J.; MIDDLETON, P.G.; TAYLOR, J.J. Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. *J Periodontal Res*, 43, 328-33, 2008.

DASHASH, M.; DRUCKER, D.B.; BLINKHORN, A.S. Interleukin-10 haplotype frequencies in children with gingivitis. *J Periodontol.*, 77, 1503-9, 2006.

DONNER, H.; RAU, H.; WALFISH, P. G.; BRAUN, J.; SIEGMUND, T.; FINKE, R.; HERWIG, J.; USADEL, K. H.; BADENHOOP, K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 143-146, 1997.

DUARTE, P.M.; DA ROCHA, M.; SAMPAIO, E.; MESTNIK, M.J.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L.C.; BASTOS, M.F.; FAVERI, M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol.*, 81, 1056-1063, 2010.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JÚNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; PARRA, J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol.*, 6, 499-506, 1994.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G.; CARVALHO, J.F.; COLLEY, D.G. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol.*,43, 88-93, 1996.

DUTRA, W. O.; COLLEY, D. G.; PINTO-DIAS, J. C.; GAZZINELLI, G.; BRENER, Z.; PEREIRA, M. E.; COFFMAN, R. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PARRA, J. F. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol*, 51, 91-97, 2000.

DUTZAN, N.; GAMONAL, J.; SILVA, A.; SANZ, M.; VERNAL, R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.*,36, 396-403, 2009.

ERDEMIR, E.O.; DURAN, I.; HALILOGLU, S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31, 99-104, 2004.

E SILVA, M.; MOREIRA, P.; DA COSTA, G.; SARAIVA, A.; DE SOUZA, P.; AMORMINO, S.; DA COSTA, J.; GOLLOB, K.; DUTRA, W. Association of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms with aggressive periodontitis in Brazilians. *Oral Dis*. 2012.

FAN, W.H.; LIU, D.L.; XIAO, L.M.; XIE, C.J.; SUN, S.Y.; ZHANG, J.C. Coronary heart disease and chronic periodontitis: is polymorphism of interleukin-6 gene the common risk factor in a Chinese population? *Oral Dis*, 17: 270-276, 2011.

FARIA, D. R.; GOLLOB, K. J.; BARBOSA, J.R.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P. R.; LESSA, H.; CARVALHO, L. P.; ROMANO-SILVA, M. A.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; DUTRA, W. O. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*, 73, 7853-7859, 2005.

GALBRAITH, G.M.; HENDLEY, T.M.; SANDERS, J.J.; PALESCH Y, PANDEY, J.P. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 26, 705-709, 1999.

GAO, J.F.; MCINTYRE, M.S.; JUVET, S.C.; DIAO, J.; LI, X.; VANAMA, R.B.; MAK, T.W.; CATTRAL, M.S.; ZHANG, L. Regulation of Antigen-expressing Dendritic Cells by Double Negative Regulatory T Cells. *Eur J Immunol*, 2011.

GARLET, G.P.; CARDOSO, C.R.; CAMPANELLI, A.P.; GARLET, T.P.; AVILA-CAMPOS, M.J.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.*, 10, 489-496, 2008.

GARLET, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res.*, 89, 1349-1363, 2010.

- GAUTAM, D.K.; JINDAL, V.; GUPTA, S.C.; TULI, A.; KOTWAL, B.; THAKUR, R. Effect of cigarette smoking on the periodontal health status: a comparative, cross sectional study. *J Indian Soc Periodontol*, 15, 383–387, 2011.
- GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; GRIECO, D. A.; SUGERMAN, P. B.; SEYMOUR, G. J. *P. gingivalis*-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. *J Dent Res*, 81, 303-307, 2002.
- GEMMELL, E.; CARTER, C. L.; SEYMOUR, G. J. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*, 125, 134-141, 2001.
- GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol*, 28-38, 1994.
- GONZALES, J.R.; MICHEL, J.; DIETE, A.; HERRMANN, J.M.; BÖDEKER, R.H.; MEYLE, J. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 29,816-822. 2002.
- GÓRSKA, R.; LASKUS-PERENDYK, A.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J. The influence of surgical treatment of periodontal disease on selected lymphocyte subpopulations important for cellular and humoral immune responses. *J Periodontol.*, 76,1304-1310, 2005.
- GROSSMAN, W.J.; VERBSKY, J.W.; TOLLEFSEN, B.L.; KEMPER, C.; ATKINSON, J.P.; LEY, T.J. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.*, 104, 2840-2848, 2004.
- HAJEER, A.H.; LAZARUS, M.; TURNER, D.; MAGEED, R.A.; VENCOVSKY, J.; SINNOTT, P.; HUTCHINSON, I.V.; OLLIER, W.E. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.*, 27, 142-145, 1998.
- HAZIOT, A.; HIJIYA, N.; GOYERT, S. M. Role of CD14 in infection: studies in CD14-deficient mice. *Prog Clin Biol Res*, 397, 255-260. 1998.
- HEINZMANN, A.; PLESNAR, C.; KUEHR, J.; FORSTER, J.; DEICHMANN, K. A. Common polymorphisms in the CTLA-4 and CD28 genes at 2q33 are not associated with asthma or atopy. *Eur J Immunogenet*, 27, 57-61, 2000.
- HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*, 54, Suppl 1:S11-26. Review, 2009.
- HODGE, G.; HODGE, S.; LI-LIEW, C.; REYNOLDS, P.N.; HOLMES, M. Increased natural killer T-like cells are a major source of pro-inflammatory cytokines and granzymes in lung transplant recipients. *Respirology.*, 17,155-163, 2012.
- HONDA, T.; DOMON, H.; OKUI, T.; KAJITA, K.; AMANUMA, R.; YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol.*, 144, 35-40, 2006.

HOSMER, D.W.; TABER, S.; LEMESHOW S. The importance of assessing the fit of logistic regression models: a case study. *Am J Public Health*, 81:1630-1635, 1991.

HU, K.F.; HUANG, K.C.; HO, Y.P.; LIN, Y.C.; HO, K.Y.; WU, Y.M.; YANG, Y.H.; TSAI, C.C. Interleukin-10 (-592 C/A) and interleukin-12B (+16974 A/C) gene polymorphisms and the interleukin-10 ATA haplotype are associated with periodontitis in a Taiwanese population. *J Periodontal Res.*, 44, 378-385, 2009.

IHARA, K.; AHMED, S.; NAKAO, F.; KINUKAWA, N.; KUROMARU, R.; MATSUURA, N.; IWATA, I.; NAGAFUCHI, S.; KOHNO, H.; MIYAKO, K.; HARA, T. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. *Immunogenetics*, 53, 447-454, 2001.

IRMLER, M.; HERTIG, S.; MACDONALD, H. R.; SADOUL, R.; BECHERER, J. D.; PROUDFOOT, A.; SOLARI, R.; TSCHOPP, J. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med*, 181, 1917-1922, 1995.

JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; LINSLEY, P.S.; THOMPSON, C.B. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today.*, 11, 211-6, 1990.

KADOWAKI, T.; YAMAMOTO, K. Suppression of virulence of Porphyromonas gingivalis by potent inhibitors specific for gingipains. *Curr Protein Pept Sci*, 4, 451-458, 2003.

KAMADA, N.; HISAMATSU, T.; OKAMOTO, S.; SATO, T.; MATSUOKA, K.; ARAI, K.; NAKAI, T.; HASEGAWA, A.; INOUE, N.; WATANABE, N.; AKAGAWA, K. S.; HIBI, T. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol*, 175, 6900-6908, 2005.

KATZ, J.; GOULTSCHIN, J.; BENOLIEL, R.; SCHLESINGER, M. Peripheral T lymphocyte subsets in rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 15, 266-268, 1998.

KAWAI, T.; EISEN, L. R.; SEKI, M.; EASTCOTT, W.J.; WILSON, E.M.; TAUBMAN, A.M. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *The Journal of Immunology*, 164, 2102-2109, 2000.

KEESEN, T.S. Estudo do repertório V β em linfócitos T CD4⁺ e da função imunológica de células T duplo negativas CD4⁻CD8⁻ e NK T em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*. 2010. 125 f. Tese (Doutorado em Imunologia) Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KHADER, S. A.; BELL, G. K.; PEARL, J. E.; FOUNTAIN, J. J.; RANGEL-MORENO, J.; CILLEY, G. E.; SHEN, F.; EATON, S. M.; GAFFEN, S. L.; SWAIN, S. L.; LOCKSLEY, R. M.; HAYNES, L.; RANDALL, T. D.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*, 8, 369-377, 2007.

KIM, J.M.; BRANNAN, C.I.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; KHAN, T.A.; MOORE, K.W. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol.*, 148, 3618-3623, 1992.

KIM, Y.C.; KO, Y.; HONG, S.D.; KIM, K.Y.; LEE, Y.H.; CHAE, C.; CHOI, Y. Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis*, 16, 4, 375-81, 2010.

KINANE, D.F.; SHIBA, H.; HART, T.C. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000.*, 39, 91-117, 2005.

KINANE, D. F.; PETERSON, M.; STATHOPOULOU, P. G. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 40, 107-119, 2006.

KOBAYASHI, H.; NAGASAWA, T.; ARAMAKI, M.; MAHANONDA, R.; ISHIKAWA, I. Individual diversities in interferon gamma production by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.*, 35, 319-28, 2000.

KOCH, W.; KASTRATI, A.; BÖTTIGER, C.; MEHILLI, J.; VON BECKERATH, N.; SCHÖMIG, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 137-44, 2001.

KOGA, T.; NISHIHARA, T.; FUJIWARA, T.; NISIZAWA, T.; OKAHASHI, N.; NOGUCHI, T.; HAMADA, S. Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from Bacteroides gingivalis and comparison with LPS from Escherichia coli. *Infect Immun.*, 47, 638-647, 1985.

KORNMAN, K.S.; CRANE, A.; WANG, H.Y.; DI GIOVINE, F.S.; NEWMAN, M.G.; PIRK, F.W.; WILSON, T.G.J.R.; HIGGINBOTTOM, F.L.; DUFF, G.W. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.*, 24, 72-77, 1997.

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*, 183, 2533-2540, 1996.

KUMADA, H.; HAISHIMA, Y.; UMEMOTO, T.; TANAMOTO, K. Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis. *J Bacteriol.*, 177, 2098-2106, 1995.

KUMMER, J.A.; KAMP, A.M.; TADEMA, T.M.; VOS, W.; MEIJER, C.J.; HACK, C.E. Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol.*, 100, 164-172, 1995.

LAGE, D.; PIMENTEL, V.N.; SOARES, T.C.; SOUZA, E.M.; METZE, K.; CINTRA, M.L. Perforin and granzyme B expression in oral and cutaneous lichen planus - a comparative study. *J Cutan Pathol.*, 38, 973-978, 2011.

LAINE, M.L.; LOOS, B.G.; CRIELAARD, W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent*, 1-22, 2010.

LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J. D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-240. 2005.

LEE, H. J.; KANG, I. K.; CHUNG, C. P.; CHOI, S. M. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, 22, 885-890, 1995.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-258, 1996.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*., 3, 361-370, 2003.

LIEBERMAN, J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev.*, 235, 1, 93-104, 2010.

LIMA, P.M.A. Avaliação da expressão de moléculas de superfície e de citocinas intracelulares por leucócitos circulantes de pacientes com doença periodontal. 2003. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIMA, P.M.; SOUZA, P.E.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol.*, 82, 86-95, 2011.

LINSLEY, P.S.; GREENE, J.L.; TAN, P.; BRADSHAW, J.; LEDBETTER, J.A.; ANASETTI, C.; DAMLE, N.K. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med.*, 176,1595-1604, 1992.

LIU, C. C.; WALSH, C. M.; ETO, N.; CLARK, W. R.; YOUNG, J. D. Morphologic and functional characterization of perforin-deficient lymphokine-activated killer cells. *J Immunol*, 155, 602-608, 1995.

MADIANOS, P.N.; BOBETIS, Y.A.; KINANE, D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.*, 32, 57-71, 2005.

MAGALHÃES, L. M. D. ; VILLANI, F. N. A. ; DA COSTA ROCHA, M. O. ; NUNES, M. D. C. P. ; GOLLOB, K. J. ; DUTRA, W. O. IL-17 is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. *J Infect Dis*, 207, 661-665, 2013.

MARTIN, M.; KATZ, J.; VOGEL, S.N.; MICHALEK, S.M. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol.*, 167, 5278-5285, 2001.

MATHUR, A.; MICHALOWICZ, B. S. Cell-mediated immune system regulation in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8, 76-89, 1997.

McCOY, K. D.; LE GROS, G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*, 77, 1-10, 1999.

MELLATI, E.; ARAB, H.R.; TAVAKKOL-AFSHARI, J.; EBADIAN, A.R.; RADVAR, M. Analysis of -1082 IL-10 gene polymorphism in Iranian patients with generalized aggressive periodontitis. *Med Sci Monit.*, 13, CR510-514, 2007.

MICHALOWICZ, B. S.; DIEHL, S. R.; GUNSOLLEY, J. C.; SPARKS, B. S.; BROOKS, C. N.; KOERTGE, T. E.; CALIFANO, J. V.; BURMEISTER, J. A.; SCHENKEIN, H. A. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*, 71, 1699-1707, 2000.

MILLER, M.C. 3rd; MOHRENWEISER, H.W.; BELL, D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*, 120, 269-80, 2001.

MOON, Y.M.; YOON, B.Y.; HER, Y.M.; OH, H.J.; LEE, J.S.; KIM, K.W.; LEE, S.Y.; WOO, Y.J.; PARK, K.S.; PARK, S.H.; KIM, H.Y.; CHO, M.L. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 14, R246, 2012.

MORAES, M.O.; SANTOS, A.R.; SCHONKEREN, J.J.; VANDERBORGHT, P.R.; OTTENHOFF, T.H.; MORAES, M.E. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics*, 54, 896-9, 2003.

MOREIRA, P. R.; DE SA, A. R.; XAVIER, G. M.; COSTA, J. E.; GOMEZ, R. S.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, 40, 306-311, 2005.

MOREIRA, P. R.; LIMA, P. M.; SATHLER, K. O.; IMANISHI, S. A.; COSTA, J. E.; GOMES, R. S.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*, 148, 119-126, 2007.

MOREIRA, P.R.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, 42, 1, 23-30, 2007.

MOREIRA, P.R.; COSTA, J.E.; GOMEZ, R.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. TNFA and IL10 Gene Polymorphisms are not Associated with Periodontitis in Brazilians. *Open Dent J*. 7,3:184-90, 2009.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.*, 7, 145-173, 1989.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 40, 11-28, 2006.

NAPOLI, A.M.; FAST, L.D.; GARDINER, F.; NEVOLA, M.; MACHAN, J.T. Increased granzyme levels in cytotoxic T lymphocytes are associated with disease severity in emergency department patients with severe sepsis. *Shock.*, 37, 257-262, 2012.

NATH, S.G.; RAVEENDRAN, R. "What is there in a name?": A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 15, 318-322, 2011.

NIBALI, L.; MADDEN, I.; FRANCH CHILLIDA, F.; HEITZ-MAY_ELD, L.; BRETT, P.; DONOS, N. IL6-174 genotype associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Indians. *Oral Dis*, 17, 232-237, 2011.

NIELSEN, R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum Genomics*, 1, 218-224, 2004.

NISTICÒ, L.; BUZZETTI, R.; PRITCHARD, L.E.; VAN DER AUWERA, B.; GIOVANNINI, C.; BOSI, E.; LARRAD, M.T.; RIOS, M.S.; CHOW, C.C.; COCKRAM, C.S.; JACOBS, K.; MIJOVIC, C.; BAIN, S.C.; BARNETT, A.H.; VANDEWALLE, C.L.; SCHUIT, F.; GORUS, F.K.; TOSI, R.; POZZILLI, P.; TODD, J.A. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet.*, 5, 1075-1080, 1996.

OKADA, H.; KIDA, T.; YAMAGAMI, H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect Immun*, 41, 365-374, 1983.

OKAHASHI, N.; INABA, H.; NAKAGAWA, I.; YAMAMURA, T.; KUBONIWA, M.; NAKAYAMA, K.; HAMADA, S.; AMANO, A. Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun*, 72, 1706-1714, 2004.

OLIVER, R.C.; BROWN, L.J.; LÖE, H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*, 69, 269-278, 1998.

ORIMA, K.; YAMAZAKI, K.; AOYAGI, T.; HARA, K. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol.*, 115, 153-160, 1999.

OZÇAKA, O.; NALBANTSOY, A.; BUDUNELI, N. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.*, 46, 592-598, 2011.

- PAGE, R.C. Gingivitis. *J Clin Periodontol*, 13, 345–359, 1986.
- PALMER, R.M.; WILSON, R.F.; HASAN, A.S.; SCOTT, D.A. Mechanisms of action of environmental factors–tobacco smoking. *J Clin Periodontol*, 32, 180–195, 2005.
- PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*, 1, 1-36, 1996.
- PARKHILL, J.M.; HENNIG, B.J.; CHAPPLE, I.L.; HEASMAN, P.A.; TAYLOR, J.J. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 27, 682-689, 2000.
- PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 177–182, 2003.
- PETERS, P.J.; BORST, J.; OORSCHOT, V.; FUKUDA, M.; KRÄHENBÜHL, O.; TSCHOPP, J.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.*, 173, 1099-1109, 1991.
- PETIT, M.D.; HOVENKAMP, E.; HAMANN, D.; ROOS, M.T.; VAN DER VELDEN, U.; MIEDEMA, F.; LOOS, B.G. Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Periodontal Res.*, 36, 214-220, 2001.
- PICOLOS, D. K.; LERCHE-SEHM, J.; ABRON, A.; FINE, J. B.; PAPAPANOU, P. N. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32, 1055-1061, 2005.
- PIETRUSKA, M. D.; ZIMNOCH, L.; WASZKIEL, D.; STOKOWSKA, W.; DURAJ, E. Evaluation of lymphocyte populations and subpopulations extracted from inflamed periodontal tissues. *Rocz Akad Med Bialymst*, 47, 218-225, 2002.
- PIHLSTROM, B.L. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000.*, 25, 37-58, 2001.
- RAZA, S.; NAIK, S.; KANCHARLA, V.P.; TAFERA, F.; KALAVAR, M.R. Dual-Positive (CD4+/CD8+) Acute Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Associated with Complex Karyotype and refractory Hypercalcemia: Case Report and Literature Review. *Case Rep Oncol*, 3,3,489-94, 2010.
- REICHERT, S.; MACHULLA, H.K.; KLAPPROTH, J.; ZIMMERMANN, U.; REICHERT, Y.; GLÄSER, C.H.; SCHALLER, H.G.; STEIN, J.; SCHULZ, S. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.*, 43, 40-47, 2008.
- ROSE, A.B. Intron-mediated regulation of gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 326:277-90. Review, 2008.

ROSENBERG, N.A.; PRITCHARD, J.K.; WEBER, J.L.; CANN, H.M.; KIDD, K.K.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; FELDMAN, M.W. Genetic structure of human populations. *Science.*, 298, 2381-2385, 2002.

SAHNOUN, Z.; JAMOUSSE, K.; ZEGHAL, K. M. Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II). *Therapie*, 53, 315-339, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491, 1988.

SAITO, T.; YAMASAKI, S. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev.*, 192,143-160, 2003.

SALVI, G. E.; BROWN, C. E.; FUJIHASHI, K.; KIYONO, H.; SMITH, F. W.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res*, 33, 212-225, 1998.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.*, 10, 170-181, 2010.

SAXÉN, L.; MURTOMAA, H. Age-related expression of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*,12: 21–26, 1985.

SCAREL-CAMINAGA, R.M.; TREVILATTO, P.C.; SOUZA, A.P.; BRITO, R.B.; LINE, S.R. Frequencies of the -330 (T > G) IL-2 and -590 (T > C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil. *Eur J Immunogenet.*, 29, 293-296, 2002.

SCAREL-CAMINAGA, R.M.; TREVILATTO, P.C., SOUZA, A.P.; BRITO, R.B.; CAMARGO, L.E.; LINE, S.R. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31,443-8, 2004.

SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*, 40, 77-93, 2006.

SCHENKEIN, H.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; SABATINI, R.; PURKALL, D.E.; TEW, J.G. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.*, 89, 943-947, 2010.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.*, 75,163-189, 2004.

SEYMOUR, G.J.; GEMMELL, E.; REINHARDT, R.A.; EASTCOTT, J.; TAUBMAN, M.A. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res.*, 28, 478-486, 1993.

SHADDOX, L.M.; WIEDEY, J.; CALDERON, N.L.; MAGNUSSON, I.; BIMSTEIN, E.; BIDWELL, J.A.; ZAPERT, E.F.; AUKHIL, I.; WALLET, S.M. Local Inflammatory Markers and Systemic Endotoxin in Aggressive Periodontitis, *J Dent Res*, 2011 .

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2, 116-126, 2002.

SHIH, C.M.; LEE, Y.L.; CHIOU, H.L.; HSU, W.F.; CHEN, W.E.; CHOU, M.C.; LIN, L.Y. The involvement of genetic polymorphism of IL-10 promoter in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 50,291-7, 2005.

SHRESTA, S.; GRAUBERT, T. A.; THOMAS, D. A.; RAPTIS, S. Z.; LEY, T. J. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity*, 10, 595-605, 1999.

SIGUSCH, B.W.; WUTZLER, A.; NIETZSCH, T.; GLOCKMANN, E. Evidence for a specific crevicular lymphocyte profile in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*, 41, 5, 391-6, 2006.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; GOODSON, J. M.; LINDHE, J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 11, 21-32, 1984.

SOGA, Y.; NISHIMURA, F.; OHYAMA, H.; MAEDA, H.; TAKASHIBA, S.; MURAYAMA, Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol.*, 30, 524-531, 2003.

STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, W.A.; SHAPIRA, L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.*, 53:138-153, 2010.

STANILOVA, S.A.; MITEVA, L.D.; KARAKOLEV, Z.T.; STEFANOV, C.S. Interleukin 10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med*, 32,260-266, 2006.

STATHOPOULOU, P.G.; BENAKANAKERE, M.R.; GALICIA, J.C.; KINANE, D.F. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Clin Periodontol*, 37, 24-29, 2010.

SUÁREZ, L.J.; OCAMPO, A.M.; DUEÑAS, R.E.; RODRÍGUEZ, A. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol.*, 75, 1209-1215, 2004.

SUGAWARA, S.; UEHARA, A.; TAMAI, R.; TAKADA, H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res*, 8, 465-468, 2002.

SUMER, A.P.; KARA, N.; KELES, G.C.; GUNES, S.; KOPRULU, H.; BAGCI, H. Association of interleukin-10 gene polymorphisms with severe generalized chronic periodontitis. *J Periodontol.*, 78, 493-497, 2007.

SUPPIAH, V.; ALLOZA, I.; HEGGARTY, S.; GORIS, A.; DUBOIS, B.; CARTON, H.; VANDENBROECK, K. The CTLA4 +49 A/G*G-CT60*G haplotype is associated with susceptibility to multiple sclerosis in Flanders. *J Neuroimmunol.*, 164, 148-153, 2005.

TAKADA, H.; MIHARA, J.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 59, 295-301, 1991.

TAKAHASHI, K.; NAGAI, A.; SATOH, N.; KURIHARA, H.; MURAYAMA, Y. Studies on the phenotypic and functional characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 66, 391-396, 1995.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*, 21:335-376, 2003.

TAKEICHI, O.; HABER, J.; KAWAI, T.; SMITH, D. J.; MORO, I.; TAUBMAN, M. A. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res*, 79, 1548-1555, 2000.

TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12, 125-135, 2001.

TAYLOR, J.J.; PRESHAW, P.M.; DONALDSON, P.T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 35, 158-82, 2004.

TENG, Y. T. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 237-252, 2003.

TREMBLAY, G.M.; WOLBINK, A.M.; CORMIER, Y.; HACK, C.E. Granzyme activity in the inflamed lung is not controlled by endogenous serine proteinase inhibitors. *J Immunol.*, 165, 3966-3969, 2000.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.*, 24, 1-8, 1997.

VALENTE, D.A. Aspectos imunorregulatórios nas fases aguda e crônica recente da doença de Chagas: expressão de citocinas e análise de potencial citotóxico. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VERNAL, R.; DUTZAN, N.; CHAPARRO, A.; PUENTE, J.; ANTONIETA VALENZUELA, M.; GAMONAL, J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32, 383-389, 2005.

VILLANI, F.N.; ROCHA, M.O.; NUNES, M.D.O.C.; ANTONELLI, L.R.; MAGALHÃES, L.M.; DOS SANTOS, J.S.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect Immun*, 78,10, 4421-30, 2010.

WANG, P. L.; SATO, K.; OIDO, M.; FUJII, T.; KOWASHI, Y.; SHINOHARA, M.; OHURA, K.; TANI, H.; KUBOKI, Y. Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. *Arch Oral Biol*, 43, 687-694, 1998.

WANG, S.; CHEN, L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.*, 6, 759-766, 2004.

WOHLFAHRT, J.C.; WU, T.; HODGES, J.S.; HINRICHS, J.E.; MICHALOWICZ, B.S. No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis. *J Periodontol.*, 77, 426-436, 2006.

WOOD, J. P.; PANI, M. A.; BIEDA, K.; MEYER, G.; USADEL, K. H.; BADENHOOP, K. A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet*, 29, 347-349, 2002.

WRIGHT, S. D., RAMOS, R. A., TOBIAS, P. S., ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433, 1990.

YAMAZAKI, K.; OHSAWA, Y.; YOSHIE, H. Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: a common feature of chronic inflammatory diseases. *Am J Pathol.*, 158, 1391-1398, 2001.

YAMAZAKI, K.; TABETA, K.; NAKAJIMA, T.; OHSAWA, Y.; UEKI, K.; ITOH, H.; YOSHIE, H. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 28, 828-832, 2001.

YING, B.; SHI, Y.; PAN, X.; SONG, X.; HUANG, Z.; NIU, Q.; CAI, B.; WANG, L. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*, 38, 379-85, 2011.

YU, J. J.; RUDDY, M. J.; WONG, G. C.; SFINTESCU, C.; BAKER, P. J.; SMITH, J. B.; EVANS, R. T.; GAFFEN, S. L. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*, 109, 3794-3802, 2007.

YUN, L. W.; DECARLO, A. A.; COLLYER, C.; HUNTER, N. Enhancement of Th2 pathways and direct activation of B cells by the gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Immunol*, 134, 295-302, 2003.

ZHANG, K.; HEI, P.; DENG, L.; LIN, J. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein production in peritoneal fluid in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 13,135-140, 2007.

ZHU, Y.; WANG, J., H.E. Q.; ZHANG, J.Q. The association between interleukin -10 can-592 polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Med Oncol*, 28, 1, 133-6, 2011.

ANEXO I

Artigo científico referente aos resultados dos polimorfismos T/C (+17)

CD28 e A/G (+49) CTLA-4

ORIGINAL ARTICLE

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

MRMA e Silva¹, PR Moreira¹, GC da Costa², AM Saraiva¹, PEA de Souza³, SAA Maciel⁴, JE da Costa⁴, KJ Gollob^{5,6,7}, WO Dutra^{1,6,7}

¹Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Universidade Federal de Viçosa, Belo Horizonte, Brazil; ³Department of Pathology, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁴Department of Clinical, Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁵Institute for Education and Research, Santa Casa Hospital, Belo Horizonte, Brazil; ⁶National Institutes of Science and Technology, Tropical Diseases, INCT-DT; ⁷Tropical Diseases Research Program, Center for Infections Disease Research, Biosciences Division, SRI International, Melo Park, CA, USA

OBJECTIVE: Susceptibility to and severity of periodontal disease is influenced by gene polymorphisms related to the immune response. Co-stimulatory molecules, such as CD28 and CTLA-4, are critical in the development of such responses. Our hypothesis is that polymorphisms in genes that code for these molecules may be associated with periodontitis. The aim of the study was to investigate the association between +17 (T/C) CD28 and +49 (A/G) CTLA-4 gene polymorphisms and periodontitis in Brazilians.

MATERIALS AND METHODS: Genomic DNA was obtained from oral swabs of 424 individuals categorized into three groups (control group, aggressive, and chronic periodontitis) considering clinical parameters such as probing depth and clinical attachment loss. The genotyping was performed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism.

RESULTS: There was an association between the T⁻ genotype of the CD28 polymorphism and aggressive periodontitis (P = 0.04). Moreover, the A⁺ genotype for CTLA-4 was associated with greater clinical attachment loss in non-smokers with aggressive periodontitis (P = 0.006, OR = 16.25, CI = 2.25–117.11).

CONCLUSIONS: These findings show that T⁻ in CD28 + 17 (T/C) and the A⁺ in CTLA-4 +49 (A/G) genotypes are associated with susceptibility to aggressive periodontal disease. Thus, our study highlights these polymorphisms as potential genetic susceptibility markers of periodontitis in Brazilians.

Oral Diseases (2012) doi:10.1111/odi.12036



Keywords: CD28; CTLA-4; polymorphisms; periodontitis; Brazilians; severity

Introduction

Periodontal disease is triggered by oral Gram-negative bacteria and results in the inflammatory response mounted by a susceptible host (Schenkein, 2006). Individual variations in the host's response account for predisposition, initiation and progression of periodontitis, and this differential response is influenced by environmental as well as genetic characteristics (Bartold, 2006). It is clear that environmental factors such as hormones, diabetes and drugs modify preexisting periodontal condition (Kinane *et al*, 2006). Among these factors, the tobacco is considered one of the main risk factors for periodontitis, as it affects the oral environment, gingival vasculature, inflammatory and immunological responses, as well as the healing potential of periodontal connective tissues (Erdemir *et al*, 2004; Palmer *et al*, 2005; Gautam *et al*, 2011). Furthermore, increasing evidence suggests that genetic factors are important risk factors of susceptibility to chronic and aggressive periodontitis (Dutra *et al*, 2009).

T cells are important components of the inflammatory response associated with periodontal disease. It has been well recognized that T-cell activation requires two signals: a first signal transduced through the engagement of the T-cell receptor and peptide–MHC complexes and a second signal, referred to as costimulatory signal, which involves interaction between T cells and antigen-presenting cells via the their pairs of co-stimulatory molecules and ligands (Saito and Yamasaki, 2003). CD28 has been described as an important costimulatory molecule that exerts its activity by interacting with its ligands, CD80 and CD86, expressed by the antigen-presenting cells. Engagement of CD28 leads to T-cell proliferation and cytokine

Correspondence: Walderez Ornelas Dutra, Department of Morphology, Universidade Federal de Minas Gerais-ICB, Av. Antonio Carlos, 6627 Belo Horizonte, MG 31920-000, Brazil. Tel: +55 31 3499 2809, Fax: +55 31 3499 2655, E-mail: waldutra@gmail.com
Received 14 May 2012; revised 8 July 2012; accepted 28 September 2012

	O	D	I	1	2	0	3	6		Dispatch: 3.11.12	Journal: ODI	CE: Chandran K.
	Journal Name			Manuscript No.						Author Received:	No. of pages: 9	PE: Bhargyalakshmi

2
1 production, as well as establishment of effector functions
2 (Acuto and Michel, 2003). Opposed to CD28 function,
3 other co-stimulatory molecules provide mechanisms of
4 control, rather than activation of T cells. A key regulatory
5 element in T cell/antigen-presenting cell interaction is the
6 cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4),
7 also known as CD152, which is a major negative regulator
8 of T-cell responses (Teft *et al*, 2006). CD28 and CTLA-4
9 have a single extracellular IgV domain followed by a
10 short cytoplasmic tail, and the genes encoding for these
11 molecules reside on the human 2q33 chromosome (Riley
12 and June, 2005).

13 Co-stimulatory molecules are important in the establish-
14 ment of periodontal disease lesions by regulating T- and
15 B-cell activation (Aoyagi *et al*, 2000). Orima *et al* (1999)
16 demonstrated that most T and B cells expressed high lev-
17 els of CD28, while expression of CTLA-4 was lower in
18 the gingival tissues of periodontitis patients. In contrast,
19 Aoyagi *et al* (2000) showed higher per cent of CTLA-
20 4⁺CD4⁺ T cells in the peripheral blood of periodontitis
21 patients as compared to healthy control subjects, with no
22 significant differences in the per cent CD28⁺ cells.

23 The human genes encoding CTLA-4 and CD28 are
24 located about 100 kb apart on chromosome 2q33, and
25 polymorphisms of these genes can have an impact on sev-
26 eral diseases. *CD28* gene polymorphism (T>C at position
27 17) was shown to confer susceptibility to Behcet's disease
28 (Gunesacar *et al*, 2007), and while its functional role may
29 be implicated in *CD28* mRNA splicing (Ahmed *et al*,
30 2001), it is not yet clearly established. The +49 A/G poly-
31 morphism in the *CTLA-4* gene has been associated with
32 increased risk for autoimmune diseases, such Graves' dis-
33 ease, type I diabetes mellitus (Donner *et al*, 1997) and
34 systemic lupus erythematosus (Ahmed *et al*, 2001). In
35 addition to autoimmune diseases, studies have suggested
36 the association of polymorphism in CTLA-4 exon 1 with
37 susceptibility to and progression of breast cancer (Ghaderi
38 *et al*, 2004), kidney transplant rejection (Gorgi *et al*,
39 2006) and nasopharyngeal carcinoma (Xiao *et al*, 2010).
40 This polymorphism results in an amino acid exchange
41 (threonine to alanine) in the leader peptide sequence of
42 the expressed protein and affects the inhibitory function of
43 CTLA-4, being the GG genotype associated with lower
44 CTLA-4 surface expression after stimulation, and
45 increased T cell proliferation (Nistico *et al*, 1996; Dalla-
46 Costa *et al*, 2010).

47 While most studies have reported the association of
48 gene polymorphism and chronic periodontitis, influence of
49 genetic factors in the development of aggressive periodon-
50 titis has also been described (Michel *et al*, 2001; reviewed
51 by Dutra *et al*, 2009). Several studies have examined the
52 role of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms in inflam-
53 matory diseases (Djilali-Saiah *et al*, 1998; Kuszal *et al*,
54 2007), but few studies have approached co-stimulatory
55 molecule gene polymorphisms in periodontitis. Housh-
56 mand *et al* (2012) found a direct correlation between
57 CTLA-4 gene polymorphism at position + 49 in exon and
58 chronic periodontitis in Iranians, while studies performed
59 in Americans revealed no association with the same clinical
60 form (Wohlfahrt *et al*, 2006). However, studies of the
61 impact of CTLA-4 gene polymorphism, as well as CD28

gene polymorphism, in the development of the two main
clinical forms are still scarce.

Taking into account that the interaction between period-
ontopathic bacteria and host immune responses is essential
in the pathogenesis of periodontitis, especially in patients
with aggressive periodontitis, where the exposure to local
irritants usually cannot account for the intense alveolar
destruction (Burmeister *et al*, 1984), and based on the
importance of co-stimulatory molecules in the regulation
of T-cell response and their influence in inflammatory dis-
eases, the purpose of this study was to investigate the
association of *CD28* + 17 (T/C) and *CTLA-4* + 49 (A/G)
functional gene polymorphisms with periodontal disease
in Brazilian individuals. These studies provide information
as for the use of these polymorphisms as markers of sus-
ceptibility or severity of periodontal disease.

Materials and methods

Selection of subjects

The study group was composed of a total of 424 individu-
als, ranging from 15–67 years of age. The subjects were
from the State of Minas Gerais in the south-eastern region
of Brazil and were under clinical treatment at the
Dentistry School, Federal University of Minas Gerais
– UFMG. All patients came from the same geographical
area and had a similar socio-economic level. This informa-
tion is important as studies reported a strong association
between low socio-economic status and a higher risk of
periodontal disease (Albandar and Rams, 2002). The study
was approved by the local ethics committee, and all indi-
viduals enrolled in the project answered a questionnaire
to obtain information regarding dental history, family history
of periodontal disease, cigarette smoking habits, as well as
general health. All subjects were systemically healthy, that
is, with good general health, except for the presence of
periodontitis. Patients under usage of orthodontic appli-
ances, chronic usage of anti-inflammatory drugs or immu-
nosuppressive chemotherapy, antibiotics taken in the
previous 3 months, chronic inflammatory diseases, history
of diabetes mellitus, hepatitis, HIV infection, nephritis,
bleeding or autoimmune disorders, diseases with severe
commitment of the immune function and current preg-
nancy or breastfeeding were excluded from the study.
These exclusion criteria were described previously by sev-
eral authors (Scarel-Caminaga *et al*, 2004; Moreira *et al*,
2005; Fan *et al*, 2011; Nibali *et al*, 2011). Considering
that the tobacco is associated with increased clinical
attachment loss (CAL) and loss of supporting alveolar
bone and represents an important risk factor for the devel-
opment of periodontal disease (Apatzidou *et al*, 2005;
Kinane *et al*, 2006), the individuals were stratified into
'smokers' – current smokers/former smokers (more than
10 cigarettes day⁻¹) – and 'non-smokers' – subjects who
had never smoked.

The diagnosis and classification of periodontal disease
was made considering physical examination, medical and
dental histories, radiographic findings and observations of
clinical signs and parameters including probing depth,
CAL, tooth mobility, observation of bleeding on probing
and presence of plaque/calculus, agreeing with criteria

described previously by Moreira *et al* (2005). Measurements of probing depth and attachment level were assessed at six locations around each tooth, including all the affected teeth of each subject. Clinical diagnosis and determination of disease severity were based on criteria established in 1999 at the International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, according to American Academy of Periodontology (Armitage, 1999).

It is well recognized that the classification of individuals into two main clinical forms (aggressive and chronic periodontitis) involves combinations of clinical differences mentioned previously (Armitage, 1999; Albandar and Rams, 2002; Nath and Raveendran, 2011). The individuals were categorized into three groups, as follows:

- 1 C group – healthy volunteers (control group) who did not have signs of periodontal disease, at the time of sample collection, and without a history of previous periodontal disease as determined by the absence of CAL and no sites with probing depth >3 mm.
- 2 AP group – patients with aggressive periodontitis. These subjects often presented inconsistent amounts of microbial deposits with the severity of periodontal tissue destruction, rapid attachment loss and bone destruction (Burmeister *et al*, 1984; Saxén and Murtomaa, 1985). This clinical form is most prevalent in younger subjects, but it also occurs in older individuals (Highfield, 2009). The subjects with aggressive periodontitis can be further classified according to additional clinical criteria that included interproximal attachment loss as depicted in vertical or arc-shaped bone defects at first molars and incisors, characterizing individuals with localized aggressive periodontitis, while individuals with interproximal bone loss affecting at least three permanent teeth than first molars and incisors characterized subjects with generalized aggressive periodontitis. In this group, the patients affected by periodontitis had the generalized form, and they had, on average, 88% of teeth still present in the oral cavity and, of that, 64% were affected by the disease.
- 3 CP group – patients with chronic periodontitis. These subjects often presented an amount of destruction consistent with the amount of microbial deposits, presence of subgingival calculus, probable association with local predisposing factors and slow to moderate rate of progression. It is recognized that this clinical form is most prevalent in adults, but its occurrence may be present in younger individuals (Highfield, 2009). The subjects did not present vertical or arc-shaped bone defects that are typical features of aggressive periodontitis. This group included subjects with more than three sites with a probing depth of >5 mm and lesions distributed on more than two teeth in each quadrant (Moreira *et al*, 2005, 2007, 2009). These patients had, on average, 84% of teeth still present in the oral cavity and, of that, 56% were affected by the disease.

In addition to the clinical classification in aggressive and chronic clinical forms, the patients were also stratified

into two groups, according to the clinical attachment loss (CAL), that is, group of patients exhibiting clinical attachment loss greater than or equal to 5 mm ($CAL \geq 5$ mm) and other group of patients exhibiting clinical attachment loss greater than 3 mm and less than 5 mm ($3\text{ mm} > CAL < 5\text{ mm}$), within each clinical form. This classification aims to investigate whether the polymorphisms are associated with the occurrence of greater clinical attachment loss (CAL), a measure of disease severity, within each of the forms.

This procedure 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. Data were obtained as mean CAL, in all six sites of the affected teeth, following the criteria previously established in 1999 at the International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (Armitage, 2000) and also used by other authors (Moreira *et al*, 2005, 2007, 2009).

This study was carried out in accordance with the ethical guidelines of the 'Declaration of Helsinki' (version 2002) and was approved by Universidade Federal de Minas Gerais's Ethics Committee (n° 003/030), and a signed informed consent was obtained from all participants. Data related to the patients and classification into clinical forms are described in Table 1.

DNA extraction and genotyping

Epithelial cells were obtained through an oral swab performed with a sterile plastic spatula. After gentle scraping of oral mucosa, the tip of the spatula was immediately immersed in 2-ml sterile microtubes containing 1500 μ l of Krebs buffer (NaCl 20%, KCl 2%, $CaCl_2$ 2%, H_2O 2%, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , $C_6H_{12}O_6$). DNA extraction was performed as described by Boom *et al* (1990). A pellet of epithelial cells was obtained by centrifugation at 200 g for 5 min. The supernatant was removed, and 20 μ l of silica (SiO_2 , Sigma, St Louis, MO, USA) and 450 μ l of lysis buffer L6 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4, 25 mM EDTA and 1.5% Triton X-100) were added to the microtubes. Samples were homogenized by using a vortex and incubated for 30 min at 56°C. After that, samples were submitted to another centrifugation, and the supernatant was discharged. The pellet obtained (with DNA adsorbed on the silica) was washed twice with 450 μ l of washing buffer L2 (6.0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6.4), twice with 450 μ l of 70% ethanol, once with 450 μ l acetone, being submitted to centrifugation between the washes, and, afterwards, dried at 56°C for 30 min. Finally, 100 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA) was added, and samples were incubated at 56°C for 12 h to release the DNA. After incubation, the solution was homogenized, centrifuged and the supernatant containing DNA transferred to a new tube.

The CD28 and CTLA-4 polymorphisms were evaluated by PCR-RFLP. +17 (T/C) CD28 gene polymorphism (rs3116496) was examined using the following primers: forward 5'-CCT GTA TCA TTT AAT CCA CT-3' and reverse 5'-TGG AAA AGT TAC TAC ATA AAA CC-3' with expected PCR product size of 198 bp, as described

Table 1 General characteristics of the study population

Clinical forms	Control (C)	Aggressive periodontitis (AP)	Chronic periodontitis (CP)
Number of individuals	137	105	182
Gender			
Male (%)	51 (37)	37 (35)	56 (31)
Female (%)	86 (63)	68 (65)	126 (69)
Age (mean ± s.d.)	20-58 (29 ± 9.93)	15-49 (31 ± 9.24)	24-67 (46 ± 9.94)
Clinical attachment loss – mean (mm)	–	5.98 ± 1.31	5.82 ± 1.18
Smoking status			
Non-smokers (%)	125 (91)	79 (75)	119 (65)
Smokers (%)	12 (9)	26 (25)	63 (35)

previously by Heinzmann *et al* (2000). PCR was performed in a total volume of 25 µl, containing 9 µl of solution DNA, premix buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 0.1% Triton X-100, 1.5 taq DNA polymerase) and primers (20 pmol per reaction). PCR was carried out under the following conditions: 94°C for 3 min, 40 cycles of 94°C for 30 s, 51°C for 35 s and 72°C for 30 s, and final extension of 72°C for 5 min. 198-bp PCR product was then treated with 5 units of *MspI* enzyme at 37°C for 4 h and then electrophoresed in a 12% polyacrylamide gel. The sizes of the products obtained were 110 + 68 + 20 bp for the C allele and 130 + 68 bp for the T allele.

The +49 (A/G) of *CTLA-4* (rs231775) was genotyped using the following primers: forward 5'-GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT-3' and reverse 5'-AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3' with expected PCR product size of 162 bp, as described previously by Donner *et al* (1997). The PCR mix had the same composition described previously, and PCR was performed under the following conditions: 94°C for 3 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 35 s and 72°C for 30 s, and final extension of 72°C for 5 min. 162-bp PCR product was then treated with 5 units of *BbvI* restriction enzyme at 37° for 4 h and then electrophoresed in a 10% polyacrylamide gel electrophoresis. The sizes of the products obtained were 88 + 74 bp for the G allele and 162 bp for the A allele (no digestion).

All the reactions were performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf).

For both polymorphisms, the determination of the genotypes was performed blindly, prior to revealing the clinical diagnosis. Experiments that led to doubtful analysis were repeated, and the genotype, if clear, was determined. Cases that remained doubtful were excluded from the analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using the JMP statistical software (SHS, Cary, NC, USA). The chi-square likelihood ratio test was used to compare genotypes and allele distribution between groups (aggressive and chronic periodontitis and control; severe and moderate disease). In

the case that any cell value was lower than 5, Fisher's exact test (2×2 analysis) was applied. Differences were considered as statistically significant if the *P* value was <0.05. Sample size calculations were performed considering a power of 80%, a significance level of 5%, an allelic frequency in the general population of approximately 17% and a hypothetical association with disease of approximately 34% (OR = 2). Based on this, the sample size was estimated as 102 per group. The study groups were tested for Hardy-Weinberg equilibrium comparing the expected with the observed genotype frequencies.

The association between *CD28* and *CTLA-4* polymorphisms and risk of periodontal disease was estimated by odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CI), which were calculated with BioSTAT 4.0 (Belém, Brasil) statistical software. HAPLOVIEW 4.1 software was used to obtain the haplotypic frequencies. This programme was also used to verify the occurrence of linkage disequilibrium, expressed as Lewontin's *D'* coefficient, that quantifies the degree of linkage disequilibrium in a population, providing information on the frequency of recombination (Barrett *et al*, 2005). Statistical significance of the *P* value was defined at the 5% level.

Results

Hardy-Weinberg equilibrium was tested for both polymorphisms, for cases and controls, and results showed that they were in equilibrium. The distribution of genotypes' frequencies in control, aggressive periodontitis and chronic periodontitis for the *CD28* polymorphism is shown in Table 2, while these same analyses for *CTLA-4* polymorphism are reported in Table 3. The comparison was performed between patients with different clinical forms of periodontal disease and individuals without periodontitis, considering or not the habit of smoking, which is, non-smokers plus smokers and only non-smokers. No significant differences in genotypes frequencies were observed among the groups, with regard to *CD28* and *CTLA-4* polymorphisms.

The allelic frequencies of both the *CD28* + 17 (T/C) and *CTLA-4* + 49 (A/G) polymorphisms did not differ significantly between the periodontitis groups and the healthy controls in this population, considering or not the habit of smoking (Tables 2 and 3, respectively). Data summarized in Table 2 indicate that the presence of the T⁺ genotype (TT + TC) or the presence of the T⁻ genotype (CC) in *CD28* gene was significantly different between aggressive and chronic periodontitis groups, considering non-smoker individuals (*P* = 0.04). On the other hand, there were no associations between control vs aggressive periodontitis groups (*P* = 0.41) and control vs chronic periodontitis groups (*P* = 0.52) in non-smokers. Additionally, no significant differences were observed when smokers were included in these analyses.

To determine the influence of these polymorphisms on disease severity, the groups were stratified according to CAL, as described in Methods (Table 4). With regard to genotype and allele distribution, no significant differences were observed among groups for *CD28* + 17 (T/C). However, a statistical difference was observed between groups

Table 2 Distribution of the CD28 (+17 T/C) genotypes and alleles in the different clinical forms

	Control (C)	Aggressive periodontitis (AP)	Chronic periodontitis (CP)
Non-smokers + smokers			
TT (%) ^a	75 (70.75)	72 (72.73)	88 (68.22)
TC (%)	28 (26.42)	23 (23.23)	39 (30.23)
CC (%)	3 (2.83)	4 (4.04)	2 (1.55)
T (%) ^a	178 (83.96)	167 (84.34)	215 (83.33)
C (%)	34 (16.04)	31 (15.66)	43 (16.67)
T ⁺ (%) ^b	103 (97.17)	95 (95.96)	127 (98.45)
T ⁻ (%)	3 (2.83)	4 (4.04)	2 (1.55)
Non-smokers			
TT (%) ^c	69 (71.13)	52 (68.42)	60 (68.18)
TC (%)	26 (26.80)	20 (26.32)	28 (31.82)
CC (%)	2 (2.06)	4 (5.26)	0 (0.0)
T (%) ^c	164 (84.54)	124 (81.58)	148 (84.09)
C (%)	30 (15.46)	28 (18.42)	28 (15.91)
T ⁺ (%) ^d	95 (97.94)	72 (94.74)	88 (100.00)
T ⁻ (%)	2 (2.06)	4 (5.26)	0 (0.00)

Non-smokers + smokers – ^aNo statistical difference was observed for genotypes (3 × 2 contingency table) and T/C alleles (2 × 2 contingency table) – χ^2 , chi-squared.

^bNo statistical difference was observed for T⁺/T⁻ genotypes (2 × 2 contingency table) – Fisher's exact test.

Non-smokers – ^cNo statistical difference was observed for genotypes (3 × 2 contingency table) and T/C alleles (2 × 2 contingency table) – χ^2 , chi-squared.

^dStatistical difference (2 × 2 contingency table) – T⁺/T⁻ CD28 genotypes (aggressive periodontitis vs. chronic periodontitis) – $P = 0.04$ – Fisher's exact test.

Table 3 Distribution of the CTLA-4 (+49A/G) genotypes and alleles in the different clinical forms

	Control (C)	Aggressive periodontitis (AP)	Chronic periodontitis (CP)
Non-smokers + smokers			
AA (%)	70 (56.45)	63 (63.64)	95 (57.23)
AG (%)	41 (33.06)	30 (30.30)	60 (36.14)
GG (%)	13 (10.48)	6 (6.06)	11 (6.63)
A (%)	181 (72.98)	156 (78.79)	250 (75.30)
G (%)	67 (27.02)	42 (21.21)	82 (24.70)
Non-smokers			
AA (%)	62 (54.87)	46 (60.53)	57 (52.29)
AG (%)	40 (35.40)	25 (32.89)	46 (42.20)
GG (%)	11 (9.73)	5 (6.58)	6 (5.50)
A (%)	164 (72.57)	117 (76.97)	160 (73.39)
G (%)	62 (27.43)	35 (23.03)	58 (26.61)

Non-smokers + smokers and non-smokers: no statistical difference was observed for genotypes (3 × 2 contingency table) and A/G alleles (2 × 2 contingency table) – χ^2 , chi-squared.

with CAL ≥ 5 mm and 3 mm > CAL < 5 mm for CTLA-4 (+49) genotypes, considering only non-smokers ($\chi^2 = 7.44$; $P = 0.02$), as well as when smokers were included in the analysis ($\chi^2 = 6.32$; $P = 0.04$). With regard to allele distribution, there was a significant difference for CTLA-4 A allele in non-smokers ($\chi^2 = 5.28$; $P = 0.02$; OR=3.17; CI = 1.14–8.80) and also when smokers were included ($\chi^2=5.75$; $P = 0.02$; OR = 3.00; CI = 1.18–7.61). These data show that after removing the risk factor smoking in our analysis, the association with the severity in the aggressive clinical form remains,

Table 4 Distribution of the CD28 (+17T/C) and CTLA-4 (+49A/G) genotypes and alleles, considering CAL measurement in aggressive periodontitis

	Aggressive periodontitis		
	CD28	CAL ≥ 5 mm	3 mm > CAL < 5 mm
Non-smokers + smokers			
TT (%) ^a	62 (71.26)	10 (83.33)	10 (83.33)
TC (%)	21 (24.14)	2 (16.67)	2 (16.67)
CC (%)	4 (4.60)	0 (0.00)	0 (0.00)
T (%)	145 (83.33)	22 (91.67)	22 (91.67)
C (%)	29 (16.67)	2 (8.33)	2 (8.33)
Non-smokers			
TT (%) ^b	45 (67.16)	7 (77.78)	7 (77.78)
TC (%)	18 (26.87)	2 (22.22)	2 (22.22)
CC (%)	4 (5.97)	0 (0.00)	0 (0.00)
T (%)	108 (80.60)	16 (88.89)	16 (88.89)
C (%)	26 (19.40)	2 (11.11)	2 (11.11)
CTLA-4 CAL ≥ 5 mm			
Non-smokers + smokers			
AA (%) ^b	58 (65.91)	5 (45.45)	5 (45.45)
AG (%)	27 (30.68)	3 (27.27)	3 (27.27)
GG (%)	3 (3.41)	3 (27.27)	3 (27.27)
A (%)	143 (81.25)	13 (59.09)	13 (59.09)
G (%)	33 (18.75)	9 (40.91)	9 (40.91)
A ⁺ (%) ^c	85 (96.59)	8 (72.73)	8 (72.73)
A ⁻ (%)	3 (3.41)	3 (27.27)	3 (27.27)
Non-smokers			
AA (%) ^b	42 (62.69)	4 (44.44)	4 (44.44)
AG (%)	23 (34.33)	2 (22.22)	2 (22.22)
GG (%)	2 (2.99)	3 (33.33)	3 (33.33)
A (%)	107 (79.85)	10 (55.56)	10 (55.56)
G (%)	27 (20.15)	8 (44.44)	8 (44.44)
A ⁺ (%) ^c	65 (97.01)	6 (66.67)	6 (66.67)
A ⁻ (%)	2 (2.99)	3 (33.33)	3 (33.33)

^aCD28- Non-smokers + smokers and non-smokers – No statistical difference was observed for genotypes (3 × 2 contingency table) and T/C alleles (2 × 2 contingency table) – Fisher's exact test.

^bCTLA-4 genotypes- Statistical difference (3 × 2 contingency table) – non-smokers + smokers: $\chi^2 = 6.32$, $P = 0.04$. Non-smokers: $\chi^2 = 7.44$, $P = 0.02$ – χ^2 , chi-squared. CTLA-4 alleles – Statistical difference (2 × 2 contingency table) – non-smokers + smokers: $\chi^2 = 5.75$, $P = 0.02$, OR = 3.00 CI = 1.18–7.61. Non-smokers: $\chi^2 = 5.28$, $P = 0.02$, OR = 3.17, CI = 1.14–8.80 – χ^2 , chi-squared; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^cA⁺/A⁻ CTLA-4 genotypes – Statistical difference (2 × 2 contingency table) – non-smokers + smokers: $P = 0.01$, OR = 10.63, CI = 1.83–61.56; non-smokers: $P = 0.006$, OR = 16.25, CI = 2.25–117.11 – Fisher's exact test; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

indicating the influence of the polymorphism. No differences were observed within the chronic group (data not shown).

Additional analysis of distribution of A⁺/A⁻ CTLA-4 (+49) genotypes, considering severity of disease in aggressive periodontitis revealed that individuals with A⁺ genotype (AA + AG genotypes) are eleven times more susceptible to periodontitis outcome with CAL ≥ 5 mm ($P = 0.01$, OR = 10.63, CI = 1.83–61.56). These results were observed when smokers were included. Strikingly, when the same analysis was made considering only non-smokers, the OR increased to sixteen ($P = 0.006$, OR = 16.25, CI = 2.25–117.11) (Table 4), emphasizing the influence of the polymorphism.

Considering that CD28 and CTLA-4 are located in the same chromosome, we performed linkage disequilibrium

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

analysis between the two polymorphisms. Our analysis demonstrated that these genes are not in linkage disequilibrium (data not shown).

Discussion

Connective tissue destruction and bone resorption characterize periodontitis, an inflammatory disorder resulting from the interaction of many components, such as environmental, host, microbial and genetic factors (Saito and Yamasaki, 2003). Takashiba and Naruishi (2006) emphasized the importance of considering the influence of the genetic polymorphisms on teeth supporting tissue structure and function, also recognizing that various stages in the progression of this disorder may be under genetic control.

Little is known about the influence of the polymorphisms in co-stimulatory molecules in periodontal disease (Wohlfahrt *et al*, 2006; Houshmand *et al*, 2012). This study is the first to assess the association between *CD28* + 17 (T/C) and *CTLA-4* + 49 (A/G) polymorphisms and periodontal disease in Brazilian individuals.

Data obtained for *CD28* + 17 (T/C) polymorphism did not show significant association between individuals with and without periodontitis. On the other hand, it was possible to observe a higher frequency of T⁻ genotype in aggressive than chronic periodontitis patients, suggesting a role in susceptibility to aggressive disease for the C allele. Studies of the *CD28* 17 + 3 T/C polymorphism showed that TC genotype frequency was significantly higher in Turkish patients with Behçet's disease (43.1%) than in healthy controls (31.3%) (Gunesacar *et al*, 2007). On the other hand, Wood *et al* (2002) did not find significant difference in the genotypes' and alleles' frequencies between German controls and patients with type 1 diabetes, as well as Uzer *et al* (2010), in studies performed with Turkish population, in subjects with diabetes mellitus type 2. These observations were in accordance with the results of this study that did not identify significant difference on the distribution of the *CD28* (+17) genotypes and alleles in the different clinical forms of the periodontal disease. These differences in genotype/allele frequencies highlight the importance of gene polymorphism studies in distinct populations. It is important to mention that the stratification of the sample Brazilian population into ethnic groups was not performed, in this research, due to a large miscegenation of European Caucasians, Native Amerindians and African individuals to compose the Brazilian population, as discussed by several authors (Parra *et al*, 2003; Scarel-Caminaga *et al*, 2004; Moreira *et al*, 2005).

In addition to CD28, other essential molecule in the regulation of the specific antigen immune response is CTLA-4, and several studies have revealed the association between *CTLA-4* + 49 A/G SNP with infectious diseases (Thio *et al*, 2004), autoimmune diseases (Suppiah *et al*, 2005; Heggarty *et al*, 2007; Dalla-Costa *et al*, 2010) and some malignancies (Ghaderi *et al*, 2004; Wong *et al*, 2006; Xiao *et al*, 2010). With regard to periodontitis in Brazilians individuals, the data present in this study did not show any association between the genotypes for *CTLA-4* polymorphism and different clinical forms of periodontal disease. However, considering the CAL, there was

significant association between the genotypes and allele distribution and the aggressive form. A higher frequency of the A allele in individuals with aggressive periodontitis that showed CAL ≥ 5 , taking smoking and non-smoking into consideration, was observed. The higher frequency of the A allele observed in these patients may be related to increased CTLA-4 surface expression, which could lead to a lower T-cell proliferative response and decreased cytokine production. This could, in turn, predispose the subject to higher bacteria count/antigenic stimulation, which is suitable with the severe bone loss observed in individuals with aggressive form and a higher clinical attachment loss. Wohlfahrt *et al* (2006) did not show association between *CTLA-4* + 49 gene polymorphism and severe chronic periodontitis in Caucasian North American individuals. Moreover, Houshmand *et al* (2012) demonstrated the direct association between +49 A/G SNP in Iranians with chronic periodontitis, although this association was not observed for subjects with aggressive periodontitis. A plausible interpretation for this discrepancy, in relation to results presented in this study, can be explained by different ethnicities, which may produce changes in allele frequencies.

Another fact worth noting in this work refers to the distribution of A allele at position +49 of *CTLA-4* in non-smokers, whose OR showed a value similar to that even when smokers were included in the analysis, which supports an important effect of the genetic polymorphisms in the establishment of distinct immune responses in the periodontitis, in accordance with the literature (Kinane *et al*, 2005; Dutra *et al*, 2009; Stabholz *et al*, 2010).

Detailed analysis of studied polymorphism revealed that subjects carrying the A⁺ genotype for *CTLA-4* had a 11-fold increased risk for aggressive periodontitis with greater CAL when compared with A⁻ genotype, considering non-smokers plus smokers. When smokers were excluded from the analysis, this association was even more pronounced: individuals carrying the A⁺ genotype had a 16-fold increased risk of being diagnosed to aggressive periodontitis with greater CAL. This is a very strong association and might be of value when considering clinical care for susceptible individuals.

The importance of tobacco use as a risk factor for the establishment and severity of the periodontal disease is well recognized, as it can affect neutrophil function, preventing elimination of periodontal pathogens (Gautam *et al*, 2011). That is the reason why, in all of our comparisons, we performed statistical analysis for the genotypes and alleles removing smokers from the groups. As mentioned previously, associations were even stronger after removal of smokers, demonstrating the influence of the polymorphism over the smoking habit. Another interesting point in this study is that, although individuals with aggressive periodontitis presented wide age range (15–49 years of age), the patients with greater attachment clinical loss presented mean age of 30.89, and individuals with lower attachment clinical loss presented mean age of 30.83, while the control group was composed of individuals with mean age of 29, considering non-smokers plus smokers. Moreover, when the analysis was considered for only non-smokers, the subjects with aggressive

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen. *Clin Exp Immunol* 119: 280–286.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF (2005). Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 9: 973–983.

Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4: 1–6.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265.

Bartold PM (2006). Periodontal tissues in health and disease: introduction. *Periodontol* 2000 40: 7–10.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495–503.

Burmeister JA, Best AM, Palcanis KG, Caine FA, Ranney RR (1984). Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *J Clin Periodontol* 11: 181–192.

Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML (2010). Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell co-receptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. *Hum Immunol* 71: 809–817.

Demmer RT, Papapanou PN (2010). Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53: 28–44.

Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S (1998). CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* 43: 187–189.

Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F (2001). CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 62: 1356–1362.

Donner H, Rau H, Walfish PG et al (1997). CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 143–146.

Dutra WO, Moreira PR, Souza PE, Gollob KJ, Gomez RS (2009). Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 223–232.

Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S (2004). Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 31: 99–104.

Fan WH, Liu DL, Xiao LM, Xie CJ, Sun SY, Zhang JC (2011). Coronary heart disease and chronic periodontitis: is polymorphism of interleukin-6 gene the common risk factor in a Chinese population? *Oral Dis* 17: 270–276.

Gautam DK, Jindal V, Gupta SC, Tuli A, Kotwal B, Thakur R (2011). Effect of cigarette smoking on the periodontal health status: a comparative, cross sectional study. *J Indian Soc Periodontol* 15: 383–387.

Ghaderi A, Yeganeh F, Kalantari T et al (2004). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86: 1–7.

Gorgi Y, Sfar I, Abdallah TB et al (2006). Ctl-4 exon 1 (+49) and promoter (-318) gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transpl Proc* 38: 2303–2305.

Gunesacar R, Erken E, Bozkurt B et al (2007). Analysis of CD28 and CTLA-4 gene polymorphisms in Turkish patients with Behcet's disease. *Int J Immunogenet* 34: 45–49.

Heggarty S, Suppiah V, Silversides J et al (2007). CTLA4 gene polymorphisms and multiple sclerosis in Northern Ireland. *J Neuroimmunol* 187: 187–191.

Heinzmann A, Plesnar C, Kuehr J, Forster J, Deichmann KA (2000). Common polymorphisms in the CTLA-4 and CD28 genes at 2q33 are not associated with asthma or atopy. *Euro J Immuno* 27: 57–61.

Highfield J (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J* 54: S11–S26.

Houshmand B, Rafiei A, Hajilooi M (2012). Influence of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms in periodontitis. *Arch Oral Biol* 10: ??????–??????. in press

Kinane DF, Shiba H, Hart TC (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 39: 91–117.

Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG (2006). Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol* 2000 40: 107–119.

Kusztal M, Radwan-Oczko M, Koscielska-Kasprzak K, Boratynska M, Patrzalek D, Klinger M (2007). Possible association of CTLA-4 gene polymorphism with cyclosporine-induced gingival overgrowth in kidney transplant recipients. *Transpl Proc* 39: 2763–2765.

Michel J, Gonzáles JR, Wunderlich D, Diète A, Herrmann JM, Meyle J (2001). Interleukin 4 polymorphism in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 28: 483–488.

Mora B, Bonamico M, Indovina P et al (2003). CTLA-4 + 49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol* 64: 297–301.

Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM et al (2005). A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontol Res* 40: 306–311.

Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO (2007). The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontol Res* 42: 23–30.

Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO (2009). TNFA and IL10 Gene Polymorphisms are not Associated with Periodontitis in Brazilians. *Open Dent J* 7: 184–190.

Nath SG, Raveendran R (2011). "What is there in a name?": A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 15: 318–322.

Nibali L, Madden I, Franch Chilla F, Heitz-Mayfield L, Brett P, Donos N (2011). IL6-174 genotype associated with Aggregatibacter actinomycetemcomitans in Indians. *Oral Dis* 17: 232–237.

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE et al (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Human Mol Gen* 5: 1075–1080.

Orima K, Yamazaki K, Aoyagi T, Hara K (1999). Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol* 115: 153–160.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA (2005). Mechanisms of action of environmental factors–tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 32(Suppl. 6): 180–195.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 177–182.

Piras G, Monne M, Uras A et al (2005). Genetic analysis of the 2q33 region containing CD28-CTLA4-ICOS genes: association with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 129: 784–790.

Riley JL, June CH (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105: 13–21.

Saito T, Yamasaki S (2003). Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev* 192: 143–160.

Saxén L, Murtomaa H (1985). Age-related expression of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 12: 21–26.

Scarel-Caminaga RM, Trevisatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR (2004). Interleukin 10 gene promoter

- 1 polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J*
2 *Clin Periodontol* 31: 443–448.
- 3 Schenkein HA (2006). Host responses in maintaining periodontal
4 health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000*
5 40: 77–93.
- 6 Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L (2010). Genetic and envi-
7 ronmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive
8 periodontitis. *Periodontol 2000* 53: 138–153.
- 9 Suppiah V, Alloza I, Heggarty S et al (2005). The CTLA4 + 49
10 A/G*G-CT60*G haplotype is associated with susceptibility to
11 multiple sclerosis in Flanders. *J Neuroimmunol* 164: 148–153.
- 12 Takashiba S, Naruishi K (2006). Gene polymorphisms in peri-
13 odontal health and disease. *Periodontol 2000* 40: 94–106.
- 14 Teft WA, Kirchoff MG, Madrenas J (2006). A molecular per-
15 spective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 24: 65–97.
- 16 Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA et al (2004). Cytotoxic
17 T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B
18 virus infection. *J Virol* 78: 11258–11262.
- 19 Uzer E, Dilmeç F, Akkafa F, Boduroglu O, van Kuilenburg AB
20 (2010). Investigation of CTLA-4 and CD28 gene
21 polymorphisms in patients with diabetes mellitus type 2 using
22 PCR-RFLP in a Turkish population. *The West Indian medical*
23 *journal* 59: 235–240.
- 24 Wohlfahrt JC, Wu T, Hodges JS, Hinrichs JE, Michalowicz BS
25 (2006). No association between selected candidate gene poly-
26 morphisms and severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 77:
27 426–436.
- 28 Wong YK, Chang KW, Cheng CY, Liu CJ (2006). Association
29 of CTLA-4 gene polymorphism with oral squamous cell carci-
30 noma. *Journal of oral pathology & medicine: official publica-*
31 *tion of the International Association of Oral Pathologists and*
32 *the American Academy of Oral Pathology* 35: 51–54.
- 33 Wood JP, Pani MA, Bieda K, Meyer G, Usadel KH, Badenhoop
34 K (2002). A recently described polymorphism in the CD28
35 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility
36 to type 1 diabetes. *Euro J immunogen* 29: 347–349.
- 37 Xiao M, Qi F, Chen X et al (2010). Functional polymorphism of
38 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and nasopharyngeal carci-
39 noma susceptibility in a Chinese population. *Int J Immunoge-*
40 *net* 37: 27–32.
- 41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61