

**LIDIANE CRISTINA MACHADO COSTA**

**CRESCIMENTO GENGIVAL EM INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS RENAIIS  
SOB OS REGIMES IMUNOSSUPRESSORES DE  
CICLOSPORINA, TACROLIMUS E SIROLIMUS:  
POLIMORFISMO GENÉTICO (+3954 C/T) DO GENE  
DA INTERLEUCINA- 1BETA E AVALIAÇÃO CLÍNICA APÓS 44 MESES**

**Faculdade de Odontologia**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2012**

Lidiane Cristina Machado Costa

**CRESCIMENTO GENGIVAL DE INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS RENAIIS  
SOB OS REGIMES IMUNOSSUPRESSORES DE  
CICLOSPORINA, TACROLIMUS E SIROLIMUS:  
POLIMORFISMO GENÉTICO (+3954 C/T) DO GENE  
DA INTERLEUCINA-1BETA E AVALIAÇÃO CLÍNICA APÓS 44 MESES**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota  
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa

Faculdade de Odontologia – UFMG

Belo Horizonte

2012

Querem que vos ensine o modo  
de chegar à ciência verdadeira?  
Aquilo que se sabe, saber que se sabe;  
aquilo que não se sabe, saber que não se sabe;  
na verdade é este o saber.  
(Confúcio)

**APOIO FINANCEIRO**

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Ensino Superior

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do  
Estado de Minas Gerais.

## DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Luiz e Luzia, meus maiores incentivadores do estudo, todas minhas conquistas são reflexos das orações e do amor incondicional de vocês.

Ao meu irmão Luiz, pela torcida, amizade e por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu marido Carlos Eduardo, pelo amor, companheirismo e apoio, que são essenciais em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luís Otávio de Miranda Cota, pelo apoio e contribuição intensa com este estudo, pela ótima orientação, muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Fernando de Oliveira Costa, exemplo de dinamismo e competência, agradeço o aprendizado.

Ao Prof. José Eustáquio da Costa, exemplo de dedicação ao ensino, agradeço confiança e o privilégio da convivência.

Ao Dr. Fernando das Mercês de Lucas Júnior e toda a equipe de Transplante do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realizar este estudo.

Dr. José Maria Figueiró e toda a equipe da Unidade de Transplante do Hospital Felício Rocho, pela acolhida durante este estudo.

À Prof. Paula Rocha Moreira, Dra. Adriana Machado Saraiva e toda equipe do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração e aprendizado durante a fase laboratorial deste estudo.

À Prof. Sheila Cavalca Cortelli, Prof. Gilson César Nobre Franco e toda equipe do Laboratório de Biologia Celular da Universidade de Taubaté, pela disponibilidade em realizar os experimentos laboratoriais.

À todos os transplantados renais que participaram deste estudo, pela contribuição com a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG, pela oportunidade e apoio durante a realização deste estudo.

À CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro dado através da bolsa de estudo.

À todos os colegas da pós-graduação em Periodontia, Simone, Rafael, Bárbara, Douglas, Renata, Camila e Milena, pelos momentos de convivência e troca de experiências.

Aos familiares e amigos, pela energia boa, pensamento positivo e alegria.

Agradeço todos os dias, a fé em Deus, que ilumina a minha vida.

## RESUMO

### **Crescimento gengival de indivíduos transplantados renais sob os regimes imunossupressores de ciclosporina, tacrolimus e sirolimus: polimorfismo genético (+3954 C/T) do gene da interleucina-1beta e avaliação clínica após 44 meses**

Estudos longitudinais que comparam as mudanças na condição gengival de indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em ciclosporina (CsA) e tacrolimus (Tcr) são escassos e não foram encontrados relatos que incluem comparações com sirolimus (Sir). Além disso, diferentes variáveis de risco farmacológicas, periodontais e genéticas têm sido associadas ao crescimento gengival (CG) neste grupo indivíduos. Assim, o presente estudo teve os seguintes objetivos: 1) avaliar o polimorfismo do gene da interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir; 2) avaliar as mudanças na condição gengival e potenciais variáveis de risco farmacológicas e periodontais associadas ao CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir, após um período de médio de 4 anos. De uma amostra inicial de 135 indivíduos (exame baseline = EB), raspados de mucosa jugal foram coletados e utilizados para análise do polimorfismo IL-1 $\beta$  avaliado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e digestão por endonuclease de restrição. Indivíduos CG+ e CG- foram comparados em relação à frequência dos genótipos CC, CT e TT, bem como dos alelos C e T, pelo teste Qui-quadrado. Após um período de 44,44  $\pm$  9,96 meses (27 – 117), 102 indivíduos da amostra inicial, sem tratamento periodontal, foram re-examinados (exame follow-up = EF). Deste total, 89



indivíduos mantiveram o regime imunossupressor com o mesmo agente principal, sendo CsA = 23, Tcr = 31 e Sir = 35. Dados demográficos e farmacológicos foram obtidos dos prontuários médicos. Dados periodontais incluíram registro do índice de placa e índice de sangramento papilar. O CG foi avaliado através de exame visual. A prevalência e gravidade do CG, bem como variáveis farmacológicas e periodontais de interesse, foram comparadas entre o EB e EF para a amostra total e para os grupos CsA, Tcr e Sir pelos testes de Wilcoxon e MacNemar. Regressão logística multivariada foi utilizada para determinar as variáveis associadas ao CG em EF. O primeiro estudo (n = 135, sendo CsA = 45, Tcr = 45 e Sir = 45) mostrou que não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos CC, CT e TT, bem como dos alelos C e T para o gene da IL-1 $\beta$  entre indivíduos CG+ e CG-, tanto na amostra total como em quaisquer dos grupos de imunossupressores. O segundo estudo (n = 89, sendo CsA = 23, Tcr = 31 e Sir = 35) mostrou, para a amostra total, redução significativa na ocorrência (EB = 28,1%; EF = 13,5%; p < 0,001) e gravidade do CG (escore médio EB = 3,74  $\pm$  8,46; escore médio EF = 1,43  $\pm$  10,61; p < 0,001). Para os grupo CsA e Tcr, embora não significativa, também foi observada redução na ocorrência do CG [CsA (EB = 56,5%; EF = 34,8%; p = 0,063); Tcr (EB = 19,4%; EF = 12,9%; p = 0,500)]. Além disso, a gravidade do CG diminui de maneira significativa no grupo CsA (escore médio EB = 7,70  $\pm$  10,29; escore médio EF = 0,78  $\pm$  1,38; p = 0,003). No grupo Sir, o CG reduziu de 17,1% (EB) para 0,0% (EF) (p = não se aplica). No EF, na amostra total, o CG foi associado ao índice de sangramento papilar (p = 0,001) e ao uso concomitante de bloqueadores de canais de cálcio (p = 0,029); nos grupo CsA e Tcr, o CG foi associado ao índice de sangramento papilar (p = 0,029 e p =

0,033 respectivamente). Este estudo aponta para a importância de variáveis farmacológicas e periodontais associadas ao CG em regimes imunossupressores de manutenção em indivíduos transplantados renais.

**Palavras-chave:** ciclosporina, crescimento gengival, estudos follow-up, fatores de risco, sirolimus, tacrolimus, transplante renal.

**ABSTRACT****Gingival overgrowth in renal transplant recipients under immunosuppressive regimens of cyclosporine, tacrolimus and sirolimus: genetic polymorphism (+3954 C/T) of the interleukin-1beta gene and clinical evaluation after 44 months**

Prospective studies that compare the changes in the gingival status of renal transplant patients under immunosuppressive regimens based on cyclosporine (CsA) and tacrolimus (Tcr) are scarce and there were no reports that include comparisons with sirolimus (Sir). Moreover, different pharmacological, periodontal and genetic variables have been associated with gingival overgrowth (GO) in this group of subjects. Thus, this study aimed to: 1) evaluate the polymorphism (+3954 C/T) of the interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) gene in renal transplant recipients under immunosuppressive regimens based on CsA, Tcr and Sir. 2) evaluate changes in gingival status and potential pharmacological and periodontal risk variables associated with the GO in renal transplant recipients under immunosuppressive regimens based on CsA, Tcr and Sir, after mean interval time of 4 years. From a initial sample of 135 individuals (baseline BE), oral mucosa swabs were collected and used to evaluate the IL-1 $\beta$  polymorphism (+3954 C/T) assessed by PCR (Polymerase Chain Reaction) and restriction endonuclease digestion. GO+ and GO- subjects were compared in relation to the frequency of CC, CT, and TT genotypes, as well as C and T alleles, through Chi-squared test. After a interval time of 44.44  $\pm$  9.96 months (27 – 117), 102 subjects from the initial sample, with no periodontal treatment, were re-examined (follow-up examination = FE). From this total, 89 subjects maintained the immunosuppressive regimen based on the same main agent

(CsA = 23, Tcr = 31, and Sir = 35). Demographic and pharmacological data were collected from medical records. Periodontal data included plaque index and papillary bleeding index records. GO was evaluated by visual examination. Prevalence and severity of GO, as well as pharmacological and periodontal variables of interest, were compared between BE and FE examinations for the total sample and Csa, Tcr, and Sir groups through Wilcoxon and MacNemar tests. Multivariate logistic regression was used to determine variables associated with GO in FE. The first study (n = 135, CsA = 45, Tcr = 45 e Sir = 45) showed no significant difference in the distribution of CC, CT, and TT genotypes, as well as C and T alleles of IL-1 $\beta$  gene among GO+ and GO- subjects for the total sample neither for any immunosuppressive group. The second study (n = 89, CsA = 23, Tcr = 31 e Sir = 35) showed significantly reduced occurrence (BE = 28,1%; FE = 13,5%; p <0,001) and severity of GO (BE mean score = 3,74  $\pm$  8,46; FE mean score = 1,43  $\pm$  10,61; p < 0,001) for the total sample. For CsA and Tcr groups, although not significant, it was also observed a reduction in the occurrence of GO [CsA (BE = 56.5%; FE = 34.8%; p = 0.063); Tcr (BE = 19.4%; FE = 12.9%; p = 0.500)]. In addition, the severity of GO significantly decreased in CsA group (BE mean score = 7.70  $\pm$  10.29; FE mean score = 0.78  $\pm$  1.38; p = 0.003). In Sir group, GO reduced from 17.1% (BE) to 0.0% (FE) (p = not applicable). In FE, considering the total sample, GO was associated with papillary bleeding index (p = 0.001) and concomitant calcium channel blocker use (p = 0.029); in CsA and Tcr groups, GO was associated with papillary bleeding index (p = 0.029 and p = 0.033, respectively). This study points to the importance of pharmacological and periodontal

variables associated with GO in immunosuppressive maintenance regimens among renal transplant recipients.

**Key-words:** cyclosporine, follow-up studies, gingival overgrowth, sirolimus, renal transplantation, risk factors, tacrolimus.

**SUMÁRIO**

	LISTA DE ABREVIATURAS	15
<b>1</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	<b>23</b>
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO Nº. 1	23
	Polimorfismo (+3954 C/T) do gene da interleucina-1 $\beta$ e crescimento gengival em usuários de ciclosporina, tacrolimus ou sirolimus	
4.2	ARTIGO CIENTÍFICO Nº. 2	49
	Crescimento gengival em indivíduos transplantados renais: estudo follow-up de 44 meses	
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BCC	Bloqueadores de canais de cálcio
CG	Crescimento gengival
CsA	Ciclosporina A
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto- 2
IL-1A	Gene Interleucina- 1A
IL-1 $\alpha$	Interleucina- 1alfa
IL-1B	Gene Interleucina- 1B
IL-1 $\beta$	Interleucina- 1beta
IL-1ra	Receptor antagonista da interleucina 1
IL-1RN	Gene receptor antagonista da interleucina 1
IL-6	Interleucina- 6
MMF	Micofenolato mofetil
MMP-1	Metaloproteinase de matriz- 1
OR	Odds ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PB	Pares de bases
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
Sir	Sirolimus
Tcr	Tacrolimus
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento- Beta1

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO E JUSTIFICATIVA

O crescimento gengival (CG) é caracterizado por um aumento de volume gengival, localizado geralmente nas papilas gengivais sem se estender além da junção mucogengival (Bader *et al.*, 1998). As regiões anteriores são mais comumente afetadas. Entretanto, este tipo de alteração de volume pode afetar todas as regiões da boca (Somacarrera *et al.*, 1994).

Este aumento no volume gengival é conhecido como um dos efeitos colaterais em indivíduos transplantados renais sob terapias imunossupressoras baseadas em ciclosporina (CsA), muitas vezes associada a outros agentes imunossupressores como a azatioprina, prednisona, para uma terapia de manutenção (Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Cota *et al.*, 2010a). Adicionalmente, alguns indivíduos fazem uso concomitante de drogas bloqueadoras de canais de cálcio (BCC). Estes agentes auxiliares também apresentam um impacto no CG (AAP, 2004). Estudos têm demonstrado uma ampla variabilidade em relação à prevalência de CG, sugerindo que em torno de 25% a 81% dos indivíduos sob regimes de CsA apresentam CG em algum grau (Seymour *et al.*, 1992; James *et al.*, 2001; McKaig *et al.*, 2002; AAP, 2004; Thomason *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2008; Greenberg *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2010a).

Outra droga usada como agente imunossupressor principal em terapias de manutenção pós-transplante é o tacrolimus (Tcr). Estudos sobre o CG em regimes imunossupressores de Tcr, um agente alternativo a CsA, têm mostrado resultados diversos. Alguns estudos não relataram alterações de volume nos tecidos gengivais, enquanto outros sugeriram que a ocorrência do



CG observada em indivíduos medicados com Tcr é menor que aquele associado à CsA. Além disso, quando ocorre, o CG tende a ser menos grave (James *et al.*, 2000; James *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Greenberg *et al.*, 2008; Cezário *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2010a). Os relatos da literatura mostram taxas de prevalência de CG induzida por Tcr entre 0% a 30%, e a utilização concomitante de BCC também induz a um aumento na gravidade desta condição (James *et al.*, 2001; McKaig *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Greenberg *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2010a).

O uso recente do sirolimus (Sir), uma droga antiproliferativa, ofereceu a oportunidade do desenvolvimento de novas estratégias imunossupressoras de manutenção, na tentativa de minimizar os efeitos adversos em longo prazo. Diferentes combinações de CsA, Tcr, Sir, bem como de micofenolato mofetil (MMF) e outros, têm sido testadas e resultados acerca da sobrevida e função do órgão transplantado, da nefrotoxicidade e de outros efeitos colaterais foram relatados (Khauli *et al.*, 2005; Parada *et al.*, 2005; Ciancio *et al.*, 2006). A prevalência de CG em indivíduos sob regimes baseados em Sir foi relatada entre 15 a 20% (Cota *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2010a). As taxas de prevalência e gravidade do CG são maiores em indivíduos sob uso de CsA (60%), quando comparados aos regimes baseados em Tcr (28,9%) e Sir (15,6%) (Cota *et al.*, 2010a).

Nos diferentes regimes imunossupressores, o CG tem sido associado a diferentes variáveis de risco farmacológicas como a concentração sérica das drogas, o uso concomitante de BCC, o uso de agentes farmacológicos

coadjuvantes, que incluem prednisona e azatioprina (Wilson *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Cota *et al.*, 2010a), e variáveis de risco periodontais como a inflamação gengival (McGaw *et al.*, 1987; Seymour & Smith, 1991; Seymour & Jacobs, 1992; Seymour *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Greenberg *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2010a) e também com alguma suscetibilidade genética (Linden *et al.*, 2001; Drozdik *et al.*, 2005; Kurzawski *et al.*, 2006; Bonstanci *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2010b; Kozak *et al.*, 2011). Entretanto, a influência de potenciais variáveis de risco na ocorrência do CG dentro dos diferentes regimes imunossupressores ainda não é bem estabelecida, assim como a exata patogênese deste tipo específico de alteração gengival (AAP, 2004; Pernu *et al.*, 1993; Boltchi *et al.*, 1999).

Existem poucos estudos longitudinais (Somacarrera *et al.*, 1994; James *et al.*, 2000; Margreiter *et al.*, 2005; Párraga-Linares *et al.*, 2009; Sekiguchi *et al.*, 2011) que avaliam a incidência e gravidade do CG sob terapias imunossupressoras baseadas em CsA e Tcr. Somacarrera *et al.* (1994) mostraram um aumento significativo do CG sob o uso de CsA após 6 meses. Outros estudos (James *et al.*, 2000; Margreiter *et al.*, 2005; Párraga-Linares *et al.*, 2009) avaliaram os efeitos da substituição do tratamento com CsA por Tcr em relação ao CG em indivíduos transplantados renais e, em todos estes estudos, os resultados mostraram redução da gravidade e incidência do CG. Sekiguchi *et al.* (2011) avaliaram a incidência e gravidade do CG associados à CsA e Tcr e observaram que o CG no grupo Tcr iniciou mais tarde, além de ser menos grave e menos frequente quando comparado com o grupo CsA, após 180 dias de terapia imunossupressora.

Particularmente, não há estudos follow-up que avaliam a mudança do CG em indivíduos sob o uso de CsA, Tcr e Sir. Desta forma, buscamos dentro de uma linha de pesquisa já estabelecida sobre o crescimento gengival em indivíduos transplantados renais da área de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizar um estudo follow-up de 44 meses para avaliar a incidência, gravidade e potenciais variáveis de risco associadas ao CG, além de investigar o polimorfismo (+3954 C/T) do gene da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir.

Esta dissertação de mestrado será apresentada em forma de 2 artigos científicos, contendo capítulos distintos para apresentação dos objetivos, hipóteses do estudo e considerações finais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Conforme explanado anteriormente, 2 propostas específicas na linha de pesquisa de crescimento gengival foram delineadas, e constaram como objetivo de desenvolvimento nesta dissertação de mestrado:

1) avaliar o polimorfismo (+3954 C/T) do gene da interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir;

2) avaliar o CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir após um período 44 meses e sua associação com potenciais variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) avaliar a associação entre a frequência dos genótipos +3954CC, +3954CT, +3954TT no polimorfismo genético da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) com o CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr, Sir.

2) avaliar a associação entre a frequência dos alelos C e T no polimorfismo genético da interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) com o CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr, Sir.

3) avaliar, após um período de 44 meses, as mudanças na condição gengival dos pacientes transplantados renais sob o efeito das terapias CsA, Tcr, Sir, em relação a incidência e gravidade do CG.

4) avaliar a associação do CG com variáveis farmacológicas, como dose e nível do imunossupressor, uso concomitante de BCC, uso de prednisona, uso de azatioprina, uso de micofenolato mofetil, nível de creatinina.

5) avaliar a associação do CG com variáveis demográficas, como idade e peso corporal.

6) avaliar a associação do CG com variáveis periodontais, como índice de sangramento papilar, percentual de papilas com sangramento após estimulação e índice de placa.

### 3 HIPÓTESES

1) O polimorfismo (+3954 C/T) do gene da IL-1 $\beta$  está associado à prevalência e gravidade do CG nos regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir.

2) Ocorre aumento na incidência e gravidade do crescimento gengival em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir, sem intervenção, após 44 meses.

3) Variáveis demográficas (gênero, idade), farmacológicas (dose e nível sérico do agente imunossupressor principal, uso concomitante de BCC, uso de agentes farmacológicos coadjuvantes), periodontais (índice de placa, índice de sangramento papilar) apresentam uma associação de risco com o CG em indivíduos sob os regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir.

## 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 4.1 ARTIGO CIENTÍFICO NO. 1

#### POLIMORFISMO (+3954 C/T) DO GENE DA INTERLEUCINA-1 $\beta$ E CRESCIMENTO GENGIVAL EM USUÁRIOS DE CICLOSPORINA, TACROLIMUS OU SIROLIMUS

##### RESUMO

**Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo (+3954 C/T) na região promotora do gene da interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) e o crescimento gengival (CG) observado em transplantados renais sob uso de ciclosporina (CsA), tacrolimus (Tcr) ou sirolimus (Sir).

**Metodologia:** Foram selecionados 135 indivíduos, não relacionados, que formaram três grupos: CsA, Tcr, e Sir, com 45 indivíduos cada. Foram examinados e classificados segundo a presença de CG em casos (CG+) ou controles (CG-) em uma definição *post-hoc*. Raspados de mucosa jugal foram coletados, o DNA foi extraído pelo método da sílica e o polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$  foi avaliado através da reação em cadeia da polimerase e digestão (PCR-RFLP). A frequência dos genótipos e alelos foi comparada entre casos e controles pelo teste Qui-quadrado.

**Resultados:** O número de indivíduos CG+ foi de 27 pacientes medicados com CsA (escore médio CG = 19.20 $\pm$ 13.95%), 13 medicados com Tcr (escore médio CG = 17,08 $\pm$ 15,25%), e 7 medicados com Sir (escore médio CG = 7,57 $\pm$ 2,44%). Não houve diferenças significativas na frequência dos genótipos +3954CC, +3954CT, +3954TT entre casos e controles nos grupos CsA (p=0,347), Tcr (p=0,654), e Sir (p=0,886). Semelhante aos genótipos, não

houve diferenças significativas na frequência dos alelos C e T entre casos e controles nos grupos CsA ( $p=0,336$ ), Tcr ( $p=0,633$ ), e Sir ( $p=0,835$ ).

**Conclusão:** Não houve associação entre o polimorfismo do gene IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) e o CG em transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr, ou Sir na amostra estudada.

**Palavras-chave:** crescimento gengival, interleucina-1beta, polimorfismo genético, transplante renal.

## INTRODUÇÃO

O crescimento gengival (CG) é caracterizado por um aumento de volume gengival, localizado geralmente nas papilas gengivais sem se estender além da junção mucogengival (AAP, 2004). O CG é conhecido como um dos efeitos colaterais em indivíduos transplantados renais sob terapias imunossupressoras baseadas em ciclosporina (CsA) (Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Greenberg et al., 2008; Cota et al., 2010a), tacrolimus (Tcr) (Ellis et al., 2004; Costa et al., 2006; Greenberg et al., 2008; Cezário et al., 2008; Cota et al., 2010a) e recentemente foi sugerido em sirolimus (Sir) (Cota et al., 2008; Cota et al., 2010a).

A prevalência de CG reportada na literatura é altamente variável, com resultados indicando de 15% a 81% em indivíduos sob uso de CsA (Thomason et al., 1993; James et al., 2001; McKaig et al., 2002; AAP, 2004; Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Greenberg et al., 2008; Lima et al., 2008; Cota et al., 2010a). Dados de prevalência de CG induzida por TCR são conflitantes. Apesar de alguns estudos não demonstrarem ocorrência de CG em indivíduos



sob regimes imunossupressores de Tcr (Armitage et al., 1993; Asante-Korang et al., 1996; James et al., 2001), outros estudos demonstraram alterações de volume gengival em indivíduos medicados com Tcr (McKaig et al., 2002; Ellis et al., 2004; Costa et al., 2006; Greenberg et al., 2008; Lima et al., 2008; Cezário et al., 2008; Gong et al., 2008; Cota et al., 2010a). Dessa forma, variações de prevalência de CG associadas ao Tcr entre 0% a 30% são encontradas na literatura (Armitage et al., 1993; Asante-Korang et al., 1996; James et al., 2001; McKaig et al., 2002; Ellis et al., 2004; Costa et al., 2006; Greenberg et al., 2008; Lima et al., 2008; Cezário et al., 2008; Gong et al., 2008; Cota et al., 2010a). A prevalência de CG em indivíduos sob regimes baseados em Sir foi relatada em 20,8% (Cota et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos no CG são ainda pouco conhecidos (AAP, 2004). Achados ultraestruturais são similares entre as diferentes categorias de drogas e demonstram que o aumento de volume gengival causado por drogas é primariamente devido a uma resposta do tecido conjuntivo (Mariani et al., 1993; Kataoka et al., 2005). Tem sido sugerido que esta condição esteja relacionada a uma população de fibroblastos com susceptibilidade específica, apresentando tendência a sofrer alterações que a torne muito ativa na produção de substâncias da matriz extracelular, especialmente colágeno (AAP, 2004; Trackman et al., 2004; Kataoka et al., 2005). Além disso, alguns achados sugerem que a degradação de colágeno também esteja diminuída (Kataoka et al., 2000).

Apesar do mecanismo de ação das diferentes drogas no tecido gengival ser ainda incerto, existem evidências da participação de citocinas e fatores de crescimento na patogênese das alterações (Ruhl et al., 2004; Das et al., 2002;

Kataoka et al., 2005). Desta forma, tem sido sugerido que a ação das drogas parece alterar o balanço normal de citocinas nos tecidos gengivais. O papel de diferentes citocinas tem sido estudado na etiopatogênese do CG, sendo sugerido um envolvimento do fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), da interleucina-6 (IL-6) e da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Trackman et al., 2004).

A presença de polimorfismos genéticos pode influenciar esse balanço anormal de citocinas, através de uma expressão alterada ou mudanças estruturais nas moléculas codificadas, possivelmente tornando os indivíduos mais susceptíveis a uma dada doença, ou resultando num aumento da gravidade da mesma (Lang et al., 2000; Moreira et al., 2005; De Sá et al., 2007). Foi sugerido que o polimorfismo no *locus* +3954 do gene da IL-1B parece influenciar a expressão da IL-1 $\beta$ , com indivíduos homozigotos e heterozigotos apresentando diferentes níveis de citocinas (Moreira et al., 2005; Pociot et al., 1992).

Neste sentido, variações individuais na susceptibilidade e resposta ao CG pela presença de diferentes polimorfismos genéticos têm sido investigadas em alguns estudos e os dados são diversos (Linden et al., 2001; Drozdziak et al., 2005; Bonstanci et al., 2006; Radwan-Oczko et al., 2006; Kurzawski et al., 2006; Cota et al., 2010b; Kozak et al., 2011). O polimorfismo do gene TGF- $\beta$ 1 localizado nos códons 10 (+869 T/C) e 25 (+915 G/C) foram apontados como fatores de risco genéticos associados ao CG em indivíduos transplantados renais medicados com CsA (Linden et al., 2001; Radwan-Oczko et al., 2006). De forma contrária, alguns estudos não demonstraram associações entre diferentes polimorfismos como IL-1A (Bonstanci et al., 2006), IL-6 (Drozdziak et

al., 2005; Cota et al., 2010b), metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) (Kurzawski et al., 2006) e TGF- $\beta$ 1 (Kozak et al., 2011) e o CG em indivíduos transplantados renais sob uso de terapias imunossupressoras.

Particularmente, não existem dados em relação ao polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) e o CG em indivíduos sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr ou Sir. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a possível associação entre o polimorfismo de base única IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) e o CG em pacientes transplantados renais sob regimes imunossupressores de manutenção baseados em CsA, Tcr ou Sir.

## **METODOLOGIA**

### **Desenho de estudo e estratégia amostral**

O presente estudo apresentou um desenho transversal e envolveu um grupo de transplantados renais sob terapias imunossupressoras de manutenção baseados em CsA, Tcr e Sir, na cidade de Belo Horizonte, na região sudeste do Brasil (a mesma amostra avaliada por Cota et al., 2010a, e Cota et al., 2010b). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC #514/05). Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação no estudo. Os direitos dos indivíduos foram respeitados e protegidos em todos os momentos.

Uma amostra elegível foi selecionada e recrutada das unidades de transplante de 2 hospitais públicos, onde os indivíduos eram examinados regularmente para monitorar a terapia medicamentosa e a sobrevida do

enxerto. Os indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo de acordo com o acesso e a disponibilidade dos mesmos na rotina da visita de manutenção pós-transplante.

Com esta estratégia, todo indivíduo elegível que concordou em participar do estudo foi examinado e incluído nos grupos de acordo com o agente imunossupressor principal. Eles foram também classificados como controles (indivíduos CG-) ou casos (indivíduos CG+) em uma definição *post-hoc*. Dessa forma, uma amostra de conveniência de 135 indivíduos foi formada e dividida em: grupo CsA (n = 45), grupo Tcr (n = 45) e grupo Sir (n = 45).

Foram adotados os seguintes de inclusão: 1) apresentar pelo menos 2 meses de transplante e estar sob terapias imunossupressoras baseadas em CsA, Tcr ou Sir como agente imunossupressor principal; 2) ter idade de 18 anos ou mais na data do exame; 3) apresentar pelo menos 6 dos 12 dentes anteriores nos arcos superior ou inferior. Indivíduos sob terapias combinadas de CsA, Tcr, ou Sir, indivíduos medicados com anticonvulsivantes, bem como fumantes e ex-fumantes foram excluídos do estudo. Os indivíduos eram ainda da mesma macro região geográfica de residência, de nível sócio-econômico baixo e grupo étnico variado. Etnia não foi uma variável estabelecida, uma vez que os problemas em classificar os brasileiros por cor ou raça já foram previamente relatados (Parra et al., 2003).

### **Variáveis médicas e farmacológicas**

Dados médicos e farmacológicos foram obtidos dos registros médicos de cada indivíduo. Como parte da rotina de manutenção em longo prazo, os transplantados renais são monitorados regularmente em relação às

concentrações séricas e sanguíneas do imunossupressor principal. Dados do exame médico mais recente (0 – 30 dias), usualmente da última visita médica, foram registrados. Gênero, idade, tempo de transplante, dose e nível sérico do imunossupressor principal, bem como o uso concomitante de BCC foram coletados e usados na análise. Todos os registros médicos dos indivíduos foram extensivamente examinados e os dados confirmados pela equipe médica do transplante de órgãos.

### **Avaliação gengival**

Após o exame dos registros médicos dos indivíduos e a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, estes eram encaminhados para a avaliação gengival. Os exames foram realizados em uma sala separada nas unidades hospitalares, sob condições adequadas de iluminação e controle de infecção. Condição de higiene e inflamação gengival foram avaliadas através do Índice de Placa (Silness & Løe, 1964) e Índice de Sangramento Papilar (Saxer & Mühlemann, 1975). Esta abordagem metodológica é suportada por estudos transversais que demonstram que o sangramento gengival tem sido um bom indicador do papel da inflamação induzida pela placa bacteriana na gravidade do CG (Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Cezário et al., 2008; Cota et al., 2008; Cota et al., 2010a; Cota et al., 2010b).

O nível de higiene bucal foi obtido de acordo com o Índice de Placa (Silness & Løe, 1964). As medidas foram realizadas nas superfícies lingual, vestibular e interproximais dos 6 dentes anteriores nos arcos superior e inferior. Os escores de cada sítio foram somados e os valores médios registrados. O

Índice de Sangramento Papilar foi registrado na papila interproximal dos 6 dentes anteriores em ambos os arcos (Saxer & Mühlemann, 1975).

A avaliação gengival foi realizada por um único periodontista treinado (L.O.M.C.), que estava mascarado para a identidade de cada indivíduo, bem como para a história médica e o regime imunossupressor. Para determinar a concordância intraexaminador, o Índice de Sangramento Papilar e o CG de 10 pacientes foram avaliados no início do estudo e repetidos com um intervalo de aproximadamente 1 mês. Todos os escores do teste *Kappa* não ponderado foram maiores que 0,92 e os coeficientes de correlação intraclassa foram maiores que 0,90.

O presente estudo avaliou o CG nos 12 dentes anteriores como previamente descrito e justificado em diferentes estudos (Costa et al., 2006; Costa et al., 2007; Cezário et al., 2008; Cota et al., 2008; Cota et al., 2010a; Cota et al., 2010b). Os dentes anteriores superiores e inferiores foram avaliados através de inspeção visual. As papilas vestibulares e linguais, associadas aos 6 dentes anteriores de ambos os arcos superior e inferior receberam *score* entre 0 e 2 para crescimento no sentido buco-lingual e de 0 a 3 para crescimento no sentido méso-distal. Os valores obtidos, tanto no sentido buco-lingual quanto no sentido méso-distal, foram somados num total máximo de 5 para cada unidade gengival. Assim, um total de máximo de 20 papilas (unidades gengivais) poderia ser selecionado e examinado, apresentando um possível valor máximo de 100, que poderia ser atribuído e expresso em porcentagem. Indivíduos com *score* de CG  $\geq 30$  foram classificados como tendo um crescimento clinicamente significativo como previamente estabelecido (Thomason et al., 1993).

### **Coleta das amostras e extração do DNA**

Raspados de mucosa bucal foram colhidos de todos os participantes através de espátulas plásticas estéreis. Após raspar gentilmente a mucosa, os materiais coletados foram imediatamente colocados em microtubos estéreis de 2 mL contendo 1500 µL de solução de Krebs (NaCl a 20%, KCl a 2%, CaCl<sub>2</sub> a 2%, H<sub>2</sub>O 2%, 0,29 g/L MgSO<sub>4</sub>, 5,95 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,80 g/L C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). A extração do DNA foi realizada como descrito anteriormente (Moreira 2005). Um *pellet* de células epiteliais foi obtido por centrifugação a 200xg por 5 min. O sobrenadante foi removido e 20 µL de sílica (SiO<sub>2</sub>, Sigma, St. Louis, MO, USA) e 450 µL de tampão de lise (6,0 M GuSCN, 65 mM de Tris-HCl pH 6,4, 25 mM de EDTA, e 1,5% Triton X-100) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas no vortex e incubada durante 30 min a 56°C. Após esta incubação, as amostras foram submetidas à outra centrifugação (200 xg) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido (com o DNA adsorvido na sílica) foi lavado 2 vezes com o tampão de lavagem (6,0 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl, pH 6,4), 2 vezes com 450 µL de etanol a 70%, uma vez com 450 µL de acetona e secado a 56°C durante 20 min. Finalmente, 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA) foi adicionado e incubado a 56°C durante 12 h. Após a incubação, a solução foi homogeneizada, centrifugada para obtenção do sobrenadante contendo o DNA.

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Digestão por endonuclease de restrição**

O polimorfismo IL-1β foi avaliado através da amplificação por PCR e digestão. O primer *sense* 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3' e o

primer *antisense* 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' foram usados, gerando um produto de 194 pares de bases (pb). A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 mL, contendo 10 mL de DNA (aproximadamente 400 ng), tampão pré-mix (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 0.1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, trifosfatos de desoxinucleótideo, *Taq* DNA polymerase) e primers (20 pmol/reação). As condições de amplificação consistiram de 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 35 segundos, e 72°C por 30 segundos. O processo foi completado pelo alongamento final a 72°C por 5 minutos. Os produtos foram digeridos com 5 unidades de *TaqI* a 65°C por 4 horas e os produtos da digestão de 97 + 85 + 12 pb foram obtidos para alelos C e os produtos da digestão 182 + 12 pb foram obtidos para o alelo T. A separação e visualização dos produtos de digestão foi realizada em um gel de poliacrilamida a 10%.

### **Análise estatística**

Os dados coletados de cada paciente foram analisados com o programa estatístico (Statistical Package for Social Sciences, Version 17.0 for Windows – SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A normalidade dos dados foi testada através do teste de Lilliefors.

A amostra total e grupos de imunossupressores foram descritos em relação à variáveis de interesse. Inicialmente, a amostra foi dividida de acordo com a presença (CG+) ou ausência (CG-) do crescimento gengival, independentemente do agente imunossupressor principal (CsA, Tcr, ou Sir). CG+ e CG- foram comparados através do teste t de Student e Mann-Whitney quando apropriado. Posteriormente, a presença/ausência de CG foi avaliada



em cada grupo imunossupressor. Para comparações múltiplas de dados paramétricos, uma análise one-way ANOVA foi utilizada para se determinar a variância geral, seguida por um teste *post-hoc* t Student para a comparação dos pares. Para comparações múltiplas de dados não-paramétricos, um teste Kruskal-Wallis foi utilizado para se determinar a variância geral, seguido por um teste de um *post-hoc* Dunn para a comparação dos pares. A distribuição dos genótipos e as frequências dos alelos entre CG+ e CG- foi comparada através do teste Qui-quadrado. A correção de Yates foi usada quando apropriado. Os grupos do estudo foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, através da comparação das frequências esperadas e observadas dos genótipos (Zintzaras et al., 2008). Todas as estimativas foram consideradas significativas para o valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Características da amostra em relação ao CG são apresentadas na Tabela 1. Na amostra total, quando consideramos todos os indivíduos independentemente do agente imunossupressor principal utilizado, o número casos [(CG +) indivíduos apresentando qualquer escore de CG] foi 47 (34,8%), com um escore médio de  $16,88 \pm 13,71$ . Dos 47 indivíduos com CG, 10 indivíduos (7,4%) foram classificados como CG clinicamente significativo (escores  $\geq 30\%$ ). Quando CG foi avaliado em cada grupo de imunossupressor, o número de CG+ foi de 27 (60,0%), 13 (28,9%), e 7 (15,6%) nos grupos CsA, Tcr, e Sir, respectivamente. O grupo CsA apresentou um escore médio de  $19,20 \pm 13,95$ , sendo que 6 indivíduos (13,3%) foram classificados como apresentando CG clinicamente significativo. O grupo Tcr apresentou um escore

médio de CG  $17,08 \pm 15,25$  sendo que 4 indivíduos (8,9%) foram classificados como apresentando CG clinicamente significativo. O grupo Sir apresentou um escore médio de  $7,57 \pm 2,44$  e nenhum indivíduo foi classificado como apresentando CG clinicamente significativo.

Características da amostra em relação a variáveis de interesse estão apresentadas na Tabela 2. Nenhuma diferença entre indivíduos CG+ e CG- em relação a gênero e idade foram observadas ( $p > 0,05$ ). Na amostra total, indivíduos CG+ apresentaram maior tempo de transplante ( $p < 0,001$ ) e maior frequência de uso concomitante de BCC ( $p < 0,001$ ). Além disso, nos grupos CsA ( $p = 0,011$ ), Tcr ( $p < 0,001$ ), e Sir ( $p = 0,016$ ) os indivíduos CG+ apresentaram maior frequência de uso concomitante de BCC.

A distribuição dos genótipos bem como as frequências dos alelos, está apresentada na Tabela 3. CG+ e CG- foram caracterizados por uma distribuição semelhante para os genótipos IL-1 $\beta$ . Considerando os grupos CsA, Tcr, e Sir de maneira isolada, não houve diferença na frequência dos genótipos +3954CC, +3954CT, +3954TT entre indivíduos CG+ e CG-. Também não houve diferença, quando os indivíduos foram considerados no total independente do imunossupressor principal utilizado. De maneira similar aos genótipos, a frequência dos alelos C e T não mostrou diferença significativa entre CG+ e CG- em todos os grupos.

Quando a frequência dos genótipos e alelos foi comparada entre indivíduos com CG clinicamente significativo e indivíduos CG- na amostra total, nenhuma diferença significativa foi também observada (dados não mostrados).

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo não observou nenhuma associação entre a ocorrência do polimorfismo IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) e o CG em transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir. Em nosso conhecimento, não existem estudos prévios explorando a associação entre o polimorfismo IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) e o CG em transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir.

A IL-1 é a citocina mais encontrada nos processos inflamatórios e desempenha um papel fundamental em várias doenças crônicas. Suas funções compreendem o ingresso de células inflamatórias em sítios de infecção, proliferação de fibroblastos, síntese de PGE<sub>2</sub> por macrófagos e fibroblastos, ativação primária citocinas quimiotáticas iniciais, bem como expressão de moléculas de adesão. Esta citocina atua ainda sobre fibroblastos, estimulando sua proliferação e a transcrição de colágeno tipo I, III e IV. Dessa forma, o desenvolvimento de fibrose parece ser em parte mediado pela IL-1 (Dinarello et al., 1991). A IL-1 predominante nos tecidos periodontais é a IL-1 $\beta$ , produzida primeiramente pelos macrófagos (Matsuki et al., 1992).

Em relação ao CG, um efeito sinérgico no aumento da síntese de colágeno por fibroblastos gengivais relacionado à interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e à exposição por bloqueadores de canais de cálcio (BCC) foi previamente descrito (Johnson et al., 2000). Além disso, a IL-1 $\beta$  parece ser um importante mediador responsável pela elevada expressão do receptor de interleucina-6 em células de tecidos gengivais apresentando crescimento (Lu et al., 2007).

Existem três genes que regulam a produção de IL-1: IL1A, IL1B e IL1RN (Nicklinet et al., 1994). Estes genes estão localizados no cromossoma 2q13. Genes IL1A e IL1B controlam a produção das proteínas pró-inflamatórias, IL-1 $\alpha$

e IL-1 $\beta$ , respectivamente. IL1RN controla a síntese da proteína antagonista (IL-1ra) (Greenstein et al., 2002). Polimorfismo no *locus* +3954 do gene IL1B tem sido associado com um aumento da produção desta citocina. Indivíduos homozigóticos para o alelo T produziram uma quantidade quatro vezes maior de IL-1 $\beta$  em comparação com indivíduos que apresentem o genótipo CC (Pociot et al., 1992). Foi sugerido que este polimorfismo pode explicar porque algumas pessoas têm uma resposta mais acentuada do que outros para o mesmo estímulo (Lang et al., 2000).

O papel do polimorfismo da IL-1 $\beta$  nas doenças periodontais já foi amplamente documentado e alguns estudos mostraram que este polimorfismo pode ser um fator de risco para periodontite, tendo associação com a gravidade, a extensão e a resposta ao tratamento (Kornman et al., 1997; Gore et al., 1998; Parkhill et al., 2000; Moreira et al., 2005). Por esta razão, uma transcrição alterada e, portanto, níveis de IL-1 $\beta$  alterados devido a variações no genótipo da IL-1 $\beta$  poderiam influenciar a resposta inflamatória local e apresentar algum impacto no CG. Baseado nesta suposição, o presente estudo avaliou indivíduos transplantados renais sob uso de CsA, Tcr e Sir, no entanto, não mostrou associação entre polimorfismo +3954 C/T do gene da IL-1 $\beta$  e o CG.

Diferentes estudos (Drozdizik et al., 2005; Bonstanci et al., 2006; Kurzawski et al., 2006; Cota et al., 2010b; Kozak et al., 2011) avaliaram a relação de outros polimorfismos genéticos com o CG, mas também não encontraram associações. Bonstanci et al. (2006) não demonstraram associação significativa entre o polimorfismo da IL-1A e a ocorrência de CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores de CsA. O

estudo de Cota et al. (2010b) não mostrou associação entre o polimorfismo -174 G/C do gene da IL-6 e o CG nesta mesma amostra de indivíduos. Os autores reportaram que a distribuição dos genótipos e alelos G/C entre indivíduos CG+ e CG- não se diferiu marcadamente. Seguindo esta ausência de associação, os resultados do estudo de Kozak et al. (2011) não mostraram associação entre o polimorfismo do gene TGF- $\beta$ 1 e CG em indivíduos transplantados renais medicados com CsA. No entanto, o estudo de Linden et al. (2001) sugeriu que o polimorfismo do gene da TGF- $\beta$ 1 influencia a expressão de CG e os resultados do estudo de Radwan-Oczko et al. (2006) demonstraram associação entre o CG em indivíduos tratados com CsA e o polimorfismo genético de TGF- $\beta$ 1.

Estudos que avaliaram as taxas de prevalência global do CG em indivíduos transplantados renais, independente do regime imunossupressor, apresentam valores de 34,0% (Greenberg et al. 2008) e 47,0% (Lima et al. 2008). Os resultados do presente estudo mostraram uma taxa de 34,8%. É importante ressaltar ainda que, conforme previamente relatado e discutido por Cota et al. (2010a) a prevalência (número de indivíduos CG+,  $p < 0,001$ ), gravidade (score médio e score médio por papila,  $p < 0,001$ ) e extensão (percentual de papilas afetadas por CG,  $p < 0,001$ ) do CG foram maiores nos regimes imunossupressores baseados em CsA quando comparados aos regimes baseados em Tcr e Sir. Além disso, as variáveis significativamente associadas ao CG foram: 1) na amostra total – uso concomitante de BCC (OR ajustado = 7,99;  $p < 0,001$ ) e percentual de papilas com sangramento após estímulo (OR ajustado = 1,05;  $p < 0,001$ ); 2) grupo CsA – índice de sangramento papilar (OR ajustado = 359,8;  $p = 0,001$ ); 3) grupo Tcr – uso

prévio de CsA (OR ajustado = 18,27;  $p = 0,013$ ) e uso concomitante de BCC (OR ajustado = 29,70;  $p = 0,003$ ); 4) grupo Sir – uso concomitante de BCC (OR ajustado = 12,51;  $p = 0,020$ ) e percentual de papilas com sangramento após estímulo (OR ajustado = 1,06;  $p = 0,018$ ).

A variável tempo de transplante associou-se ao CG na amostra total, independente do imunossupressor usado. Relatos acerca desta variável são controversos na literatura. Alguns autores falharam em demonstrar essa associação (Costa et al., 2006, Ellis et al., 2004), enquanto outros demonstraram que quanto maior o tempo da terapia de imunossupressão, maior a ocorrência e gravidade do CG (Costa et al., 2007, Cota et al., 2008). Além disso, a variável uso concomitante de BCC associou-se ao CG em todos os grupos de imunossupressores. O uso de BCC apresenta grande influência na ocorrência e gravidade do CG, de acordo com alguns autores (Costa et al., 2006, Cota et al., 2008, Ellis et al., 2004).

Estudos futuros, envolvendo populações maiores e diferentes, bem como explorando polimorfismos diversos e potenciais variáveis de risco farmacológicas e periodontais, se mostram necessários para confirmar estes achados. A determinação de variáveis genéticas associadas ao CG em terapias imunossupressoras pode ajudar na determinação de indivíduos susceptíveis e na escolha dos regimes terapêuticos de manutenção em transplantes renais, melhorando a qualidade de vida destes indivíduos.

## **CONCLUSÕES**

Com base nos resultados deste estudo, o polimorfismo de base única do gene da IL-1 $\beta$  (+3954 C/T) não estava associado com crescimento gengival em

indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores de manutenção baseados em ciclosporina, tacrolimus ou sirolimus.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores desejam expressar seus agradecimentos às Unidades de Transplante do Hospital Felício Rocho e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento. Este estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os autores declaram que nenhum conflito de interesse relacionado ao presente estudo.

## **REFERÊNCIAS**

- 01- American Academy of Periodontology (AAP). Drug-associated gingival enlargement. *J Periodontol* 2004; 75:10:1424-1431.
- 02- Armitage JM, Fricker, FJ, del Nido P, Starzl TE, Hadersty RL, Griffith BP. A decade (1982 to 1992) of pediatric cardiac transplantation and the impact of FK 506 immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Sur* 1993;105:464-472.
- 03- Asante-Korang A, Boyle GJ, Webber SA, Miller SA, Fricker FJ. Experience of FK506 immune suppression in pediatric heart transplantation: a study of long-term adverse effects. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:415-422.

- 04- Bader G, Lejeune S, Messner M. Reduction of cyclosporine induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. *J Periodontol* 1998;69:729-732.
- 05- Bostanci N, Ilgenli T, Pirhan DC, Clarke FM, Marcenes W, Atilla G, Hughes FJ, McKay IJ. Relationship between IL-1A polymorphisms and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving Cyclosporin A. *J Clin Periodontol* 2006;33:771-778.
- 06- Cezário ES, Cota LOM, Ferreira SD, Siqueira FM, Soares RV, Zenóbio EG, Costa FO. Gingival overgrowth in renal transplant subjects medicated with tacrolimus in the absence of calcium channel blockers. *Transplantation* 2008;85:232-236.
- 07- Costa FO, Ferreira SD, Cota LOM, Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity, and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporine regimens. *J Periodontol* 2006;77:969–975.
- 08- Costa FO, Ferreira SD, Lages EJP, Costa JE, Oliveira AMSD, Cota LOM. Demographic, pharmacologic, and periodontal variables for gingival overgrowth in subjects medicated with cyclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Periodontol* 2007;78: 254–261.
- 09- Cota LOM, Oliveira APL, Costa JE, Cortelli SC, Costa FO. Gingival status of Brazilian renal transplant recipients under sirolimus-based regimens. *J Periodontol* 2008;79:2060-2068.
- 10- Cota LOM, Aquino DR, Franco GCN, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens



- based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *J Clin Periodontol* 2010a; 37:894-902.
- 11- Cota LOM, Viana MB, Moreira PR, Gomez RS, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus-based immunosuppressive regimens and the single nucleotide IL-6 (S174 G/C) gene polymorphism. *Arch Oral Biol* 2010b;55:494-501.
  - 12- Das SJ, Newman HN, Olsen I. Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. *J Dent Res* 2002;81:683-687.
  - 13- De Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J* 2007;40:563-572.
  - 14- Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 1991;3:941-948.
  - 15- Drozdik M, Kurzawski M, Drozdik A, Kotrych K, Banach J, Pawlik A. Interleukin-6 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2005;32:955-958.
  - 16- Ellis JS, Seymour RA, Taylor JJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. *J Clin Periodontol* 2004;31:126-131.
  - 17- Gong YM, Cao LF, Yang Y, Gu ZY. Relationship of putative periodontopathogenic bacteria and drug induced gingival overgrowth. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2008;43:347-351.

- 18- Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;25:781-785.
- 19- Greenberg KV, Armitage GC, Shiboski CH. Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new-generation immunosuppressants. *J Periodontol* 2008;79:453-460.
- 20- Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:231-247.
- 21- James JA, Jamal S, Hull PS, Macfarlane TV, Campbell BA, Johnson RWG, Short CD. Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients. **J Clin Periodontol** 2001;28:848-852.
- 22- Johnson RB, Zebrowski EJ, Dai X. Synergistic enhancement of collagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts exposed to nifedipine and interleukin-1-beta in vitro. *J Oral Pathol Med* 2000;29:8-12.
- 23- Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, Morisaki I, Ohsaki Y, Kido JI, Nagata T. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 2000;182:351-358.
- 24- Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T. Drug-induced gingival overgrowth – a review. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1817-1821.
- 25- Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72-77.

- 26- Kozak M, Kurzawski M, Wajda A, Lapczuk J, Lipski M, Dziwanowski K, Drozdziak M. TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. *Oral Dis* 2011;17:1-16.
- 27- Kurzawski M, Drozdziak A, Dembowska E, Pawlik A, Banach J, Drozdziak M. Matrix metalloproteinase-1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival enlargement. *J Periodontol* 2006;77:1498-1502.
- 28- Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontol Res* 2000;35:102–107.
- 29- Lima RB, Benini V, Sens YA. Gingival overgrowth in renal transplant recipients: a study concerning prevalence, severity, periodontal, and predisposing factors. *Transplant Proc* 2008;40:1425-1428.
- 30- Linden GJ, Simone EH, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D, Irwin CR, Marley JJ, McNamee P, Short CD, Hull PS, James JA. The influence of transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. **J Periodontol** 2001;72:808-814.
- 31- Lu HK, Chou HP, Li CL, Wang MY, Wang LF. Stimulation of cells derived from nifedipine-induced gingival overgrowth with *Porphyromonas gingivalis*, lipopolysaccharide, and interleukin-1 $\beta$ . *J Dent Res* 2007;86:1100-1104.

- 32- Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Marzola R, Calura G. Ultrastructural features of CsA-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1993;64: 1092-1097.
- 33- Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingival by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* 1992;76:42-47.
- 34- McKaig SJ, Kell D, Shaw L. Investigation of the effect of FK506 (tacrolimus) and cyclosporine on gingival overgrowth following pediatric liver transplantation. *Int J Paediatr Dent* 2002 12, 398-403.
- 35- Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollub KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res* 2005;40:306-311.
- 36- Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin 1 alpha, beta and the interleukin 1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1994;19:382-384.
- 37- Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:682-689
- 38- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-182.

- 39- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism in the human interleukin 1 beta gene correlates with secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22:396-402.
- 40- Radwan-Oczko M, Boratyńska M, Zietek M, Zołędziewska M, Jonkisz A. The relationship of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism, its plasma level, and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. *J Periodontol* 2006;77:865-873.
- 41- Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA, Thomason JM. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res* 2004;83:322-326.
- 42- Saxer UP, Mühlemann HR. Motivation and education (in German). *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1975;85:905-919.
- 43- Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy: correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:131-135.
- 44- Thomason JM, Seymour RA, Rice N. The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1993;20:37-40.
- 45- Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival and overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:165-175.
- 46- Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol* 2008;61:634-645.

Tabela 1. Características da amostra em relação ao crescimento gengival.

Variáveis	Indivíduos CG+				p*
	Amostra Total	Grupo CsA	Grupo Tcr	Grupo Sir	
<b>Número de indivíduos</b>	47 (34,8%)	27 (60,0%)	13 (28,9%)	7 (15,6%)	<b>&lt;0,001†</b>
<b>Número de indivíduos com escores de CG</b>					
de 1 a 10%	24 (17,8%)	13(28,8%)	7 (15,5%)	6 (13,3%)	<b>0,048†</b>
de 11 a 20%	5 (3,7%)	2 (4,4%)	2 (4,4%)	1 (2,2%)	
de 21 a 29%	8 (5,9%)	8 (17,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
≥ 30% (cl clinicamente significativo)	10 (7,4%)	6 (13,3%)	4 (8,9%)	0 (0,0%)	
<b>Escore médio de CG</b>	16,88±13,71 (2,00-52,00)	19,20±13,95 (3,00-52,00)	17,08±15,25 (2,00-44,00)	7,57±2,44 (4,00-22,00)	<b>&lt;0,001‡</b>
<b>Escore médio de CG por papila</b>	0,84±0,69 (0,10-2,60)	0,96±0,70 (0,15-2,60)	0,85±0,76 (0,10-2,20)	0,38±0,12 (0,20-0,60)	<b>&lt;0,001‡</b>
<b>% de papilas afetadas por CG</b>	34,31±23,15 (5,00-95,00)	41,20±24,25 (10,00-95,00)	30,77±20,40 (5,00-80,00)	14,29±4,50 (10,00-20,00)	<b>&lt;0,001‡</b>

CsA = ciclosporina; Tcr = tacrolimus, Sir = sirolimus, CG = crescimento gengival; média±desvio padrão (intervalo) a não ser quando especificado; percentuais em relação ao total de indivíduos na amostra;

\*comparações entre os grupos CsA, Tcr e Sir;

†teste Qui-quadrado;

‡teste Kruskal–Wallis [grupos se diferem pelo teste de Dunn, após ajuste do valor de p através da Correção de Bonferroni para comparações múltiplas ( $\alpha < 0.05$ )  $p < 0.017$ ].

Tabela 2. Caracterização da amostra em relação a variáveis de interesse presença/ausência do crescimento gengival.

Variáveis	Indivíduos CG+	Indivíduos CG-	P
<b>Amostra total (n = 135)</b>			
Homens (n)	30 (63,8%)	49 (55,7%)	
Mulheres (n)	17 (36,2%)	39 (44,3%)	0,360*
Idade (anos)	42,64 ± 9,94	43,02 ± 11,21	0,844 <sup>†</sup>
Tempo de transplante (meses)	85,72 ± 51,62	50,03 ± 46,52	<0,001 <sup>†</sup>
Uso concomitante de BCC	31 (66,0%)	16 (18,2%)	<0,001*
<b>Grupo CsA (n = 45)</b>			
Homens (n)	17 (63,0%)	9 (50,0%)	
Mulheres (n)	10 (37,0%)	9 (50,0%)	0,388*
Idade (anos)	42,29 ± 10,27	43,72 ± 9,99	0,891 <sup>†</sup>
Dose diária de CsA (mg)	182,78 ± 49,87	169,44 ± 55,94	0,407 <sup>‡</sup>
Tempo de transplante (meses)	111,85 ± 47,67	107,67 ± 52,16	0,782 <sup>†</sup>
Uso concomitante de BCC	18 (66,7%)	5 (27,8%)	0,011*
<b>Grupo Tcr (n = 45)</b>			
Homens (n)	9 (69,2%)	17 (53,1%)	
Mulheres (n)	4 (30,8%)	15 (46,9%)	0,321*
Idade (anos)	41,23 ± 9,47	43,72 ± 11,20	0,485 <sup>†</sup>
Dose diária de Tcr (mg)	6,69 ± 4,21	5,00 ± 2,88	0,202 <sup>‡</sup>
Tempo de transplante (meses)	53,31 ± 34,66	34,56 ± 31,44	0,085 <sup>†</sup>
Uso concomitante de BCC	9 (69,2%)	5 (15,6%)	<0,001*
<b>Grupo Sir (n = 45)</b>			
Homens (n)	4 (57,1%)	23 (60,5%)	
Mulheres (n)	3 (42,9%)	15 (39,5%)	0,867*
Idade (anos)	42,71 ± 10,67	42,11 ± 11,95	0,975 <sup>†</sup>
Dose diária de Sir (mg)	2,57 ± 1,13	2,60 ± 1,03	0,938 <sup>‡</sup>
Tempo de transplante (meses)	45,14 ± 30,15	35,76 ± 31,29	0,468 <sup>†</sup>
Uso concomitante de BCC	4 (57,1%)	6 (15,8%)	0,016*

CG = crescimento gengival; CsA = ciclosporina; Tcr = tacrolimus; Sir = sirolimus; BCC = bloqueadores de canais de cálcio.

média±desvio padrão (intervalo) a não ser quando especificado; percentuais em relação ao total de indivíduos nos grupos CG+ e CG-;

\*teste Qui-quadrado; <sup>†</sup>teste t; <sup>‡</sup>teste Mann-Whitney.

Tabela 3. Distribuição dos genótipos +3954C/T IL-1 $\beta$  e frequência de alelos de acordo com a presença/ausência do crescimento gengival.

IL-1 $\beta$	Indivíduos CG+	Indivíduos CG-	Total	p*
<b>Amostra total</b>				
<b>Genótipos</b>				
+3954CC	15 (37,5%)	27 (39,7%)	42 (38,9%)	0,673
+3954CT	24 (60,0%)	37 (54,4%)	61 (56,5%)	
+3954TT	1 (2,5%)	4 (5,9%)	5 (4,6%)	
<b>Alelos</b>				
+3954C	54 (67,5%)	91 (66,9%)	145 (67,1%)	0,929
+3954T	26 (32,5%)	45 (33,1%)	71 (32,9%)	
<b>Grupo CsA</b>				
<b>Genótipos</b>				
+3954CC	9 (37,5%)	10 (58,8%)	19 (46,3%)	0,347
+3954CT	14 (58,3%)	6 (35,3%)	20 (48,8%)	
+3954TT	1 (4,2%)	1 (5,9%)	2 (4,9%)	
<b>Alelos</b>				
+3954C	32 (66,7%)	26 (76,5%)	58 (70,7%)	0,336
+3954T	16 (33,3%)	8 (23,5%)	24 (29,3%)	
<b>Grupo Tcr</b>				
<b>Genótipos</b>				
+3954CC	4 (40,0%)	9 (36,0%)	13 (37,1%)	0,654
+3954CT	6 (60,0%)	14 (56,0%)	20 (57,1%)	
+3954TT	0 (0,0%)	2 (8,0%)	2 (5,7%)	
<b>Alelos</b>				
+3954C	14 (70,0%)	32 (64,0%)	46 (65,7%)	0,633
+3954T	6 (30,0%)	18 (36,0%)	24 (34,3%)	
<b>Grupo Sir</b>				
<b>Genótipos</b>				
+3954CC	2 (33,3%)	8 (30,8%)	10 (31,3%)	0,886
+3954CT	4 (66,7%)	17 (65,4%)	21 (65,6%)	
+3954TT	0 (0,0%)	1 (3,8%)	1 (3,1%)	
<b>Alelos</b>				
+3954C	8 (66,7%)	33 (63,5%)	41 (64,1%)	0,835
+3954T	4 (33,3%)	19 (36,5%)	23 (35,9%)	

CG = crescimento gengival; \*comparações entre CG- e CG+; teste Qui-quadrado.



## 4.2 ARTIGO CIENTÍFICO NO. 2

### CRESCIMENTO GENGIVAL EM INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS RENAIIS: ESTUDO FOLLOW-UP DE 44 MESES

#### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a incidência, gravidade e potenciais variáveis de risco associadas ao CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em ciclosporina (CsA), tacrolimus (Tcr) e sirolimus (Sir), após um período de 44 meses.

**Materiais e Métodos:** De uma amostra de 135 indivíduos (exame baseline, EB), 89 indivíduos sem tratamento periodontal, que mantiveram seu regime imunossupressor baseado no mesmo agente principal (CsA=23, Tcr=31, Sir=35), foram re-examinados após um período de 44 meses (EF). Dados demográficos, farmacológicos e periodontais foram colhidos e o crescimento gengival (CG) foi avaliado através de exame visual.

**Resultados:** Para os grupo CsA e Tcr, embora não significativa, foi observada redução na ocorrência do CG [CsA (EB = 56,5%; EF = 34,8%;  $p = 0,063$ ); Tcr (EB = 19,4%; EF = 12,9%;  $p = 0,500$ )]. Além disso, a gravidade do CG diminuiu de maneira significativa no grupo CsA (score médio EB =  $7,70 \pm 10,29$ ; score médio EF =  $0,78 \pm 1,38$ ;  $p = 0,003$ ). No grupo Sir, o CG reduziu de 17,1% (EB) para 0,0% (EF) ( $p =$  não se aplica). Na amostra total, CG foi associado ao índice de sangramento papilar ( $p=0,001$ ) e uso concomitante de bloqueadores de canais de cálcio ( $p=0,029$ ); nos grupos CsA e Tcr, CG foi associado ao índice de sangramento papilar ( $p=0,029$  e  $p=0,033$ , respectivamente).

**Conclusão:** Não houve incidência de CG e a redução na ocorrência e gravidade do CG foi significativa na amostra total. A redução na gravidade do CG foi significativa nos grupos CsA e Sir. O CG foi associado ao uso concomitante de BCC e índice de sangramento papilar.

**Palavras-chave:**

Crescimento gengival, fatores de risco, imunossupressores, transplante renal.

**Relevância Clínica**

**Justificativa científica para o estudo:** Não há estudos follow-up que comparam a mudança do CG e variáveis de risco associadas em indivíduos transplantados renais sob uso de CsA, Tcr e Sir.

**Principais resultados:** Houve redução significativa na prevalência geral e gravidade do CG ( $p < 0,001$ ). O CG foi associado ao uso de bloqueadores de canais de cálcio e ao índice de sangramento papilar.

**Implicações clínicas:** O presente estudo aponta para a importância de variáveis farmacológicas e periodontais associadas ao CG em regimes imunossupressores de manutenção em indivíduos transplantados renais.

## INTRODUÇÃO

O crescimento gengival (CG) é conhecido como um dos efeitos colaterais em indivíduos transplantados renais sob terapias imunossupressoras baseadas em ciclosporina (CsA) (Costa et al. 2006, 2007, Cota et al. 2010), tacrolimus (Tcr) (Ellis et al. 2004, Costa et al. 2006, Greenberg et al. 2008, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2010) e recentemente foi sugerido em sirolimus (Sir) (Cota et al. 2008, Cota et al. 2010).

A prevalência de CG reportada na literatura varia de 15% a 81% em regimes baseados em CsA (Thomason et al. 1993, James et al. 2001, McKaig et al. 2002, AAP 2004, Costa et al. 2006, 2007, Greenberg et al. 2008, Lima et al. 2008, Cota et al. 2010). A prevalência de CG induzida por Tcr varia de 0% a 30% (James et al. 2001, McKaig et al. 2002, Ellis et al. 2004, Costa et al. 2006, Greenberg et al. 2008, Lima et al. 2008, Cezário et al. 2008, Gong et al. 2008, Cota et al. 2010). Recentemente, a prevalência de CG em indivíduos sob regimes baseados em Sir foi relatada em 20,8% (Cota et al. 2008). A prevalência e gravidade do CG são maiores nos regimes imunossupressores baseados em CsA (60%) quando comparados aos regimes baseados em Tcr (28,9%) e Sir (15,6%) (Cota et al. 2010).

O CG tem sido associado a diferentes variáveis de risco demográficas, farmacológicas e periodontais (Seymour et al. 2000, Costa et al. 2006, 2007, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2008, 2010). A terapia de drogas múltiplas influencia o CG em pacientes transplantados renais, independente dos fatores clínicos locais (Wilson et al. 1998). O uso de agentes farmacológicos coadjuvantes, como prednisona, azatioprina e bloqueadores de canais de cálcio (BCC), bem como a inflamação gengival parecem atuar na ocorrência e

gravidade do CG (Costa et al. 2006, 2007, Greenberg et al. 2008, Lima et al. 2008, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2010)

Existem poucos estudos longitudinais (Somacarrera et al. 1994, James et al. 2000, Margreiter et al. 2005, Párraga-Linares et al. 2009, Sekiguchi et al. 2011) que avaliaram a incidência e gravidade do CG em terapias imunossupressoras baseadas em CsA e Tcr, bem como as mudanças ao longo do tempo. Particularmente, não há estudos follow-up que comparam a mudança da condição gengival em indivíduos sob uso de CsA, Tcr e Sir. Desta forma, a proposta do presente estudo foi avaliar a incidência, gravidade e potenciais variáveis de risco associadas ao CG em indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir, após um período de 44 meses.

## **METODOLOGIA**

### **Desenho de estudo e estratégia amostral**

O presente estudo apresentou um desenho follow-up e a amostra foi obtida a partir do estudo transversal de Cota et al. 2010 (exame baseline = T0), conduzido para avaliar a prevalência e variáveis de risco demográficas, farmacológicas e periodontais associadas ao CG em indivíduos transplantados renais medicados com CsA, Tcr e Sir em 2 hospitais de Belo Horizonte, Brasil. Foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE – 0179.0.203.000-11). Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram um consentimento livre esclarecido antes da participação no estudo. Os direitos dos indivíduos foram respeitados e protegidos em todos os momentos.

Após um intervalo de  $44,44 \pm 9,96$  meses, os 135 indivíduos da amostra de referência foram selecionados para uma segunda avaliação periodontal. Depois de muitas tentativas para recuperar todos os indivíduos, 102 retornaram para o segundo exame (T4), sendo 27 do grupo baseline CsA, 36 do grupo baseline Tcr, e 39 do grupo baseline Sir. Deste total, 89 mantiveram o mesmo regime imunossupressor baseado no agente principal, sendo grupo CsA (n = 23), grupo Tcr (n = 31) e grupo Sir (n= 35). O fluxograma da estratégia amostral é mostrado na Figura 1.

### **Variáveis médicas e farmacológicas**

Dados médicos e farmacológicos foram obtidos dos registros médicos de cada indivíduo. Dados do exame médico mais recente (0 – 30 dias), usualmente da última visita médica, foram registrados. Gênero, idade, peso, tempo de transplante, dose de prednisona, dose de azatioprina, dose de micofenolato mofetil (MMF), nível de creatinina, dose e nível sérico do imunossupressor principal, bem como o uso concomitante de bloqueadores de canais de cálcio (BCC) foram coletados e usados na análise. Todos os registros médicos dos indivíduos foram extensivamente examinados e os dados confirmados pela equipe médica das unidades de transplante de órgãos.

### **Avaliação gengival**

Após a avaliação dos registros médicos dos indivíduos, estes eram encaminhados para a avaliação gengival. Os exames foram realizados em uma sala separada nas unidades hospitalares, sob condições adequadas de iluminação e biossegurança. A avaliação da condição gengival foi realizada por

um único periodontista treinado (L.C.M.C.). Para determinar a concordância intra-examinador (em T4) e inter-examinador [entre o examinador de T0 (L.O.M.C.) e o examinador de T4], o CG de 10 pacientes foi avaliado no início do estudo e repetidos com um intervalo de aproximadamente 1 mês. Todos os escores do teste *Kappa* não ponderado foram maiores que 0,92 e os coeficientes de correlação intraclasse foram maiores que 0,90.

Foram realizados exames gengivais através do Índice de Sangramento Papilar (Saxer & Mühlemann 1975), Índice de Placa (Silness & Loe 1964) e inspeção visual do CG (Costa et al. 2006, Cota et al. 2010). O Índice de Placa foi realizado através de medidas nas superfícies lingual, vestibular, e interproximais dos 6 dentes anteriores nos arcos superior e inferior. Os escores de cada sítio foram somados e os valores médios registrados. O Índice de Sangramento Papilar foi registrado na papila interproximal dos 6 dentes anteriores em ambos os arcos.

O CG foi avaliado nos 12 dentes anteriores como previamente descrito e justificado em diferentes estudos (Costa et al. 2006, 2007, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2008, 2010). Resumidamente, dentes anteriores superiores e inferiores foram avaliados através de inspeção visual. Escores entre 0 e 5, dependendo da quantidade do crescimento tanto horizontal quanto vertical, era registrado para cada papila lingual e vestibular dos 6 dentes anteriores superiores e inferiores. Assim, de acordo com o número de dentes anteriores disponíveis em cada arco dentário, um total de 20 papilas poderia ser selecionado e examinado. Deste modo, um possível valor máximo de 100 para o escore de CG poderia ser atribuído e expresso em percentual. Foram considerados indivíduos CG+ aqueles que apresentavam qualquer escore de

CG. Indivíduos com escores de CG  $\geq$  30% foram classificados como tendo um crescimento clinicamente significativo como previamente sugerido (Thomason et al. 1993).

### **Análise estatística**

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Sminov com correção de Lilliefors. Análises estatísticas foram realizadas para comparações de variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse no exame baseline (EB) e no exame follow-up (EF) através dos testes de Wilcoxon e Mac Nemar. Inicialmente, a amostra total (considerando-se todos os indivíduos independente do agente imunossupressor usado), e posteriormente os grupos de imunossupressores separadamente (CsA, Tcr e Sir), foram comparados entre EB e EF em relação a variáveis de interesse.

Análises multivariadas foram realizadas através de regressão logística para determinar as variáveis associadas ao CG no EF, para a amostra total bem como para os grupos de imunossupressores. Todas as variáveis correspondentes para cada modelo foram selecionadas para a entrada na regressão e foram retidas nos modelos se valores de p significativos ( $p < 0,05$ ) eram obtidos. Interações de primeira ordem entre tempo de transplante e uso de BCC foram testadas e mantidas nos modelos se significativas.

Todas as comparações e análises mostradas no presente estudo foram realizadas para os 89 indivíduos que mantiveram o mesmo regime imunossupressor baseado no agente principal. Análises para os 102 indivíduos recuperados do EB, abrangendo os 13 indivíduos que mudaram o imunossupressor principal, foram também realizadas considerando a “mudança

de agente principal” como uma variável de interesse. Entretanto, não foram encontrados resultados significativos (dados não mostrados).

Todos os dados coletados foram analisados com o programa estatístico (Statistical Package for Social Sciences, Version 17.0 for Windows – SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e as estimativas foram consideradas significativas para o valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Características da amostra total em relação a variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais dos indivíduos, divididos de acordo com EB e EF, estão apresentadas na Tabela 1. Na amostra total, quando consideramos todos os indivíduos independentes do agente imunossupressor principal utilizado, o número de indivíduos CG+ reduziu de 25 (28,1%) em EB para 12 (13,5%) em EF ( $p = 0,001$ ). Foi também observada uma redução na gravidade do CG, com um escore médio de  $3,74 \pm 8,4\%$  em EB para  $1,43 \pm 10,61$  em EF ( $p < 0,001$ ). Além disso, o número de indivíduos apresentando CG clinicamente significativo (escores  $\geq 30\%$ ) reduziu de 3 indivíduos (3,4%) em EB para 1 em EF. Em EF, indivíduos apresentaram menor índice de sangramento papilar ( $p < 0,003$ ), menor percentual de papilas com sangramento após estímulo ( $p = 0,001$ ), menores doses de prednisona ( $p = 0,037$ ), azatioprina ( $p = 0,017$ ) e micofenolato mofetil ( $p = 0,020$ ), bem como menor frequência de uso concomitante de BCC ( $p = 0,031$ ), quando comparados ao EB.

Assim como na análise para as características da amostra em relação às variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse,



realizada para a amostra total, foram também realizadas para os grupos CsA, Tcr e Sir (Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente).

No grupo CsA, embora não significativo, o número de indivíduos CG+ reduziu de 13 (56,5%) em EB para 8 (34,8%) em EF ( $p = 0,063$ ). Entretanto, houve redução da gravidade do CG, com um escore médio de  $7,70 \pm 10,29$  em EB para  $0,78 \pm 1,38$  em EF ( $p = 0,003$ ). O número de indivíduos apresentando CG clinicamente significativo reduziu de 1 (4,3%) em EB para 0 em EF ( $p = 0,004$ ). Em EF, indivíduos apresentaram menor índice de sangramento papilar ( $p = 0,007$ ), menor percentual de papilas com sangramento após estímulo ( $p = 0,006$ ) e menores doses de CsA ( $p = 0,008$ ) e prednisona ( $p = 0,041$ ) quando comparados ao EB (Tabela 2).

No grupo Tcr, também de maneira não significativa, o número de indivíduos CG+ reduziu de 6 (19,4%) em EB para 4 (12,9%) em EF ( $p = 0,500$ ). Não foi observada redução na gravidade do CG (escore médio  $3,58 \pm 10,14$  em EB para  $3,52 \pm 17,94$  em EF,  $p = 0,344$ ). O número de indivíduos apresentando CG clinicamente significativo reduziu de 2 (6,5%) em EB para 1 (3,2%) em EF, marginalmente significante ( $p = 0,059$ ). Em EF, indivíduos apresentaram menor percentual de papilas com sangramento após estímulo ( $p = 0,046$ ), menor dose ( $p = 0,001$ ) e nível sérico de Tcr ( $p = 0,013$ ), menores doses de prednisona ( $p = 0,016$ ) e micofenolato ( $p = 0,039$ ), quando comparados ao EB (Tabela 3).

No grupo Sir, o número de indivíduos CG+ reduziu de 6 (17,1%) em EB para 0 em EF ( $p =$  não se aplica). O escore médio de CG passou de  $1,29 \pm 3,04$  em EB para  $0,0$  em EF ( $p = 0,027$ ). Em EF, indivíduos apresentaram menor índice de placa ( $p = 0,038$ ) e menor dose de Sir ( $p = 0,007$ ), quando comparados ao EB (Tabela 4).

A tabela 5 apresenta os modelos finais de regressão logística para a ocorrência do CG em EF. A ocorrência do CG na amostra total, independente do agente imunossupressor usado, estava associada ao índice de sangramento papilar (OR = 6,37;  $p = 0,001$ ) e ao uso concomitante de BCC (OR = 2037,73;  $p = 0,029$ ). Para indivíduos usuários de CsA e Tcr, a ocorrência do CG estava associada ao índice de sangramento papilar (OR = 33765,24;  $p = 0,029$  e OR = 7028,18;  $p = 0,033$ , respectivamente).

## **DISCUSSÃO**

Este é o primeiro estudo follow-up que avalia a incidência e gravidade do CG em indivíduos transplantados renais sob uso de CsA, Tcr e Sir. Comparações para CG em regimes de CsA e Tcr foram documentadas por Paixão et al. (2011). Todavia, estudos de acompanhamento do CG que incluem o uso de Sir não foram previamente descritos na literatura.

As taxas de prevalência global do CG em indivíduos transplantados renais, independente do regime imunossupressor, apresentam valores de 34,0% (Greenberg et al. 2008), 47,0% (Lima et al. 2008) e 34,8% (Cota et al. 2010). O presente estudo mostrou redução de aproximadamente 50% na taxa de prevalência global do CG (T0 = 28,1% e T4 = 13,5%), além de redução expressiva no percentual de CG clinicamente significativo (T0 = 3,4% e T4 = 1,1%).

As taxas de prevalência em regimes específicos de imunossupressores apresentam uma elevada variação de valores e uma tendência da prevalência de CG ser maior nos regimes baseados em CsA quando comparados a Tcr (Costa et al. 2006, Greenberg et al. 2008, Lima et al. 2008, Gong et al. 2008,

Cota et al. 2010) e, por sua vez maior quando comparado à Sir (Cota et al. 2010). Esta tendência foi observada no estudo longitudinal de Paixão et al. (2011), em que o CG no grupo Tcr foi menos grave e menos frequente quando comparado com o grupo CsA após 180 dias de terapia imunossupressora. Estes achados foram similares aos resultados do presente estudo, que mostrou 34,8% de indivíduos CG+ no grupo CsA, 12,9% no grupo Tcr e 0% no grupo Sir em T4.

Os resultados deste estudo mostraram redução na ocorrência e gravidade do CG na amostra total. É interessante observar que algumas importantes variáveis de risco associadas ao CG sofreram alterações ao longo do período deste estudo. Em relação às variáveis farmacológicas, foi observada redução significativa nas doses dos agentes imunossupressores auxiliares prednisona, azatioprina e MMF, além de redução no percentual de indivíduos medicados concomitantemente com BCC. Em relação às variáveis periodontais, foi observado menor grau de inflamação gengival, representados pelos índices de sangramento papilar e percentual de papilas com sangramento após estímulo.

Apesar de não significativa, a ocorrência do CG também reduziu nos grupos CsA e Tcr. Além disso, a gravidade do CG diminuiu de maneira significativa no grupo CsA. Estes resultados se assemelham aos obtidos em outros estudos longitudinais (James et al. 2000, Margreiter et al. 2005, Párraga-Linares et al. 2009), que avaliaram os efeitos da substituição do tratamento com CsA por Tcr em relação ao CG em indivíduos transplantados renais e, todos apontaram redução da gravidade e ocorrência do CG. No entanto, o estudo de Somacarrera et al. 1994 mostrou um aumento significativo do CG

sob o uso de CsA após 6 meses. Quando se avalia o grupo Sir, os resultados apontam redução significativa na ocorrência do número de indivíduos CG+, com ausência total de CG após o intervalo do estudo. A partir destes dados, pode-se presumir que a redução significativa da ocorrência do CG na amostra total ( $p < 0,001$ ) se deve, sobretudo, à redução da ocorrência do CG no grupo Sir, uma vez que a redução do número de indivíduos CG+ nos grupos CsA e Tcr não foi significativa.

As variações nas taxas de prevalência do CG podem ser relacionadas à variáveis farmacológicas, que incluem o tipo e dose do regime imunossupressor principal e as combinações de drogas dentro do protocolo de imunossupressão (Seymour et al. 2000, Ellis et al. 2004, Costa et al. 2006, Cezário et al. de 2008, Greenberg et al. 2008, Cota et al. de 2008, 2010). A redução da ocorrência e gravidade do CG na amostra total pode ser influenciada pelos ajustes dos protocolos de terapia de imunossupressão, que incluíram redução das doses de prednisona, azatioprina e MMF do EB para EF. Da mesma forma, nos grupos específicos de imunossupressores, como em CsA, a redução da gravidade de CG pode ser relacionada à redução das doses do imunossupressor principal e prednisona em EF. Em Tcr, a redução da ocorrência e gravidade do CG, embora não significativa, pode ser influenciada pela redução das doses do imunossupressor principal, prednisona e MMF. Ajustes dos protocolos de terapia de imunossupressão, através do uso de agentes coadjuvantes, como prednisona e azatioprina contribuem para o uso de menores doses do agente imunossupressor principal, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias, o que pode favorecer a redução da gravidade e prevalência do CG (Seymour et al. 2000, Thomason et al. 2005, Costa et al.

2006, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2010). Azatioprina pode exercer o seu efeito através da redução na dose em ciclosporina (Wilson et al. 1998). Da mesma maneira, os protocolos imunossupressores com o uso de MMF podem reduzir o uso do agente imunossupressor principal, contribuindo para menores taxas de prevalência e gravidade do CG (Flechner et al. 2003, Bestard et al. 2005, Barbari et al. 2007, Cota et al. 2008).

Nossos resultados apontaram uma associação entre a redução da ocorrência e gravidade do CG e a redução significativa do uso concomitante de BCC para a amostra total ( $p = 0,031$ ) e marginalmente significativa para o grupo CsA ( $p = 0,063$ ). Vários estudos mostraram o efeito sinérgico do uso concomitante de BCC em associação com CsA (Ellis et al. 2004, Thomason et al. 2005, Costa et al. 2006, 2007, Paixão et al. 2011). De acordo com Costa et al. (2006), o uso concomitante de BCC em regimes imunossupressores baseados em CsA e Tcr pode estar associado com a elevada frequência de CG porque o percentual de CG clinicamente significativo foi maior em grupos que apresentavam associação entre BCC e imunossupressores. A importância do uso concomitante de BCC na ocorrência de CG foi reforçada no presente estudo pela presença desta variável no modelo multivariado final para a amostra total em EF ( $p = 0,029$ ).

Os ajustes dos protocolos imunossupressores também podem ser associados à melhora das condições gengivais, que incluem redução do índice de sangramento papilar e redução do percentual de papilas com sangramento. O uso de medicamentos com efeito anti-inflamatório, como prednisona, podem inibir o crescimento bacteriano e condições inflamatórias nos indivíduos. Alguns estudos encontraram menor inflamação gengival em indivíduos tratados com

agentes imunossupressores quando comparados aos indivíduos que não faziam uso destes medicamentos (Paixão et al. 2011, Schuller et al. 1973, Kardachi et al. 1978).

Algumas variáveis periodontais parecem exacerbar a ocorrência do CG independente da droga causadora (Seymour et al. 2000). Alguns autores (Costa et al. 2006, 2007, Cezário et al. 2008, Cota et al. 2008, 2010) observaram forte associação entre inflamação induzida pela placa e ocorrência de CG. No presente estudo, os achados mostraram uma forte associação entre variáveis periodontais, representada pelo índice de sangramento papilar e o CG na amostra total ( $p = 0,001$ ), no grupo CsA ( $p = 0,029$ ) e no grupo Tcr ( $p = 0,033$ ) em EF.

É importante ressaltar que limites de escore para determinar a presença de CG não são claros, resultando em algumas dificuldades e ineficiências na determinação da prevalência (Ellis et al. 2004). O presente estudo considerou indivíduos com escores de CG  $\geq 30\%$  como tendo um crescimento clinicamente significativo (Thomason et al. 1993), embora a determinação de indivíduos CG+ tenha sido estabelecida para qualquer escore de CG. Cezário et al. (2008) sugeriu que a avaliação do CG em pontos de corte abaixo de 30% pode ser considerada uma nova estratégia para se analisar variáveis de risco relacionadas com a sua ocorrência. O reconhecimento do CG desde a menor (1%) até a maior (100%) alteração pode oferecer um grau adequado de sensibilidade para os estudos epidemiológicos (Ellis et al. 2004). Vale a pena destacar que a definição de CG clinicamente significativo determinada por escores  $\geq 30\%$  tem implicações cirúrgicas (Thomason et al. 1993). Entretanto, como previamente sugerido por Cota et al. (2008) implicações bucais do CG

como desconforto, problemas estéticos, e dificuldades de higienização podem ocorrer mesmo quando este limiar cirúrgico previamente estabelecido não esteja presente.

Algumas limitações do presente estudo podem ser apontadas como o número de indivíduos, principalmente nos grupos de imunossupressores separados. Entretanto, a taxa de recuperação da amostra parece ser satisfatória, principalmente para indivíduos medicados com Tcr e Sir. Estudos longitudinais adicionais envolvendo grupos maiores de indivíduos transplantados renais sob terapias imunossupressoras diversas se fazem necessários para avaliar o impacto de variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais na ocorrência do CG ao longo do tempo.

## **CONCLUSÕES**

Incidência de CG não foi observada nos indivíduos transplantados renais sob regimes baseados em CsA, Tcr e Sir após 44 meses. A redução na ocorrência e gravidade do CG foi significativa na amostra total. Embora não significativa, a ocorrência do CG reduziu nos grupos CsA e Tcr. Além disso, a redução na gravidade do CG foi significativa nos grupos CsA e Sir. Esta redução pode ser atribuída às alterações em variáveis farmacológicas representadas pelo uso concomitante de BCC e variáveis periodontais representadas pelo índice de sangramento papilar após este período de tempo. Assim, o presente estudo reforça a importância destas variáveis ao CG em regimes imunossupressores de manutenção em indivíduos transplantados renais.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos às Unidades de Transplante do Hospital Felício Rocho e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Geras e a todos os participantes do estudo pelo seu tempo e envolvimento. Este estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os autores declaram nenhum conflito de interesse relacionado ao presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- 01- American Academy of Periodontology (AAP) (2004) Drug-associated gingival enlargement. *Journal of Periodontology* **75**, 1424-1431.
- 02- Barbari, A. G., Stephan, A. G., & Masri, M. A. (2007) Calcineurim inhibitor-free protocols: risks and benefits. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* **18**, 1-23.
- 03- Bestard, O, Cruzado, J. M., Grinyó, J. M. (2005) Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols. *Transplantation Proceedings* **37**, 3729-3732.
- 04- Cezário, E. S., Cota, L. O. M., Ferreira, S. D., Siqueira, F. M., Soares, R. V., Zenóbio, E. G. & Costa, F. O. (2008) Gingival overgrowth in renal transplant subjects medicated with tacrolimus in the absence of calcium channel blockers. *Transplantation* **85**, 232-236.
- 05- Costa, F. O., Ferreira, S. D., Cota, L. O. M., Costa, J. E. & Aguiar, M. A. (2006) Prevalence, severity, and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporine regimens. *Journal of Periodontology* **77**, 969-975.



- 06- Costa, F. O., Ferreira, S. D., Lages, E. J. P., Costa, J. E., Oliveira, A. M. S. D. & Cota, L. O. M. (2007) Demographic, pharmacologic, and periodontal variables for gingival overgrowth in subjects medicated with cyclosporin in the absence of calcium channel blockers. *Journal of Periodontology* **78**, 254-261.
- 07- Cota, L. O. M., Oliveira, A. P. L., Costa, J. E., Cortelli, S. C. & Costa, F. O. (2008) Gingival status of Brazilian renal transplant recipients under sirolimus-based regimens. *Journal of Periodontology* **79**, 2060-2068.
- 08- Cota, L. O. M., Aquino, D. R., Franco, G. C. N., Cortelli, J. R., Cortelli, S. C. & Costa, F. O. (2010) Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 894-902.
- 09- Ellis, J. S., Seymour, R. A., Taylor, J. J. & Thomason, J. M. (2004) Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 126-131.
- 10- Flechner S. M. (2003) Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation. *Transplantation Proceedings* **35**, 118-121.
- 11- Gong, Y. M., Cao, L. F., Ynag, Y. & Gu, Z. Y. (2008) Relationship of putative periodontopathogenic bacteria and drug-induced gingival overgrowth. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **43**, 347-351.
- 12- Greenberg, K. V., Armitage, G. C. & Shiboski, C. H. (2008) Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new generation immunosuppressants. *Journal of Periodontology* **79**, 453-460.

- 13- James, J. A., Boomer, S., Maxwell, A., Hull, P. S., Short, C. D., Campbell, B. A., Johnson, R. W., Irwin, C. R., Marley, J. J. & Spratt, H. (2000) Reduction of gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 144-148.
- 14- James, J. A., Jamal, S., Hull, P. S., Macfarlane, T. V., Campbell, B. A., Johnson, R. W. & Short, C. D. (2001) Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 848-852.
- 15- Kardachi, B. J. & Newcomb, G. M. (1978) A clinical study of gingival inflammation in renal transplant recipients taking immunosuppressive drugs. *Journal of Periodontology* **49**, 307-309.
- 16- Lima, R. B., Benini, V. & Sens, Y. A. (2008) Gingival overgrowth in renal transplant recipients: a study concerning prevalence, severity, periodontal, and predisposing factors. *Transplantation Proceedings* **40**, 1425-1428.
- 17- Margreiter, R., Pohanka, E., Sparacino, V., Heide Sperschneider, H., Kuzendor, U. & Huber, W. (2005) Open prospective multicenter study of conversion to tacrolimus therapy in renal transplant patients experiencing cyclosporin-related side-effects. *Transplantation International* **18**, 816-823.
- 18- McKaig, S. J., Kell, D. & Shaw, L. (2002) Investigation of the effect of FK506 (tacrolimus) and cyclosporine on gingival overgrowth following pediatric liver transplantation. *International Journal of Paediatric Dentistry* **12**, 398-403.

- 19- Paixão, C. G., Sekiguchi, R. T., Saraiva, L., Pannuti, C. M., Silva Jr, H. T., Medina-Pestana, J. O. & Romito, G. A. (2011) Gingival Overgrowth Among Patients Medicated With Cyclosporin A and Tacrolimus Undergoing Renal Transplantation: A Prospective Study. *Journal of Periodontology* **82**, 251-258.
- 20- Párraga-Linares, L., Almendros-Marqués, N., Berini-Aytés, L. & Gay-Escoda, C. (2009) Effectiveness of substituting cyclosporin A with tacrolimus in reducing gingival overgrowth in renal transplant patients. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **14**, 429-433.
- 21- Saxer, U. P. & Mühlemann, H. R. (1975) Motivation and education. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* **85**, 905-919.
- 22- Schuller, P. D., Freedman, H. L. & Lewis, D. W. (1973) Periodontal status of renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *Journal of Periodontology* **44**, 167-170.
- 23- Seymour, R. A., Ellis, J. S. & Thomason, J. M. (2000) Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 217-223.
- 24- Silness, J. & Løe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy: correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 131-135.
- 25- Somacarrera, M. L., Hernandez, G., Acero, J. & Moscov, B. S. (1994) Factor related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplantat patients. A longitudinal study. *Journal of Periodontology* **65**, 671-675.

- 26- Thomason, J. M., Seymour, R. A. & Ellis, J. S. (2005) Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with ciclosporin in the absence of calcium channel blockers. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 273-279.
- 27- Thomason, J. M., Seymour, R. A. & Rice, N. (1993) The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine induced gingival overgrowth. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 37-40.
- 28- Wilson, R. F., Morel, A., Smith, D., Koffman, C. G., Ogg, C. S., Rigden, S. P. A. & Ashley, F. P. (1998) Contribution of individual drugs to gingival overgrowth in adult and juvenile renal transplant patients treated with multiple therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, **25**, 457-464.

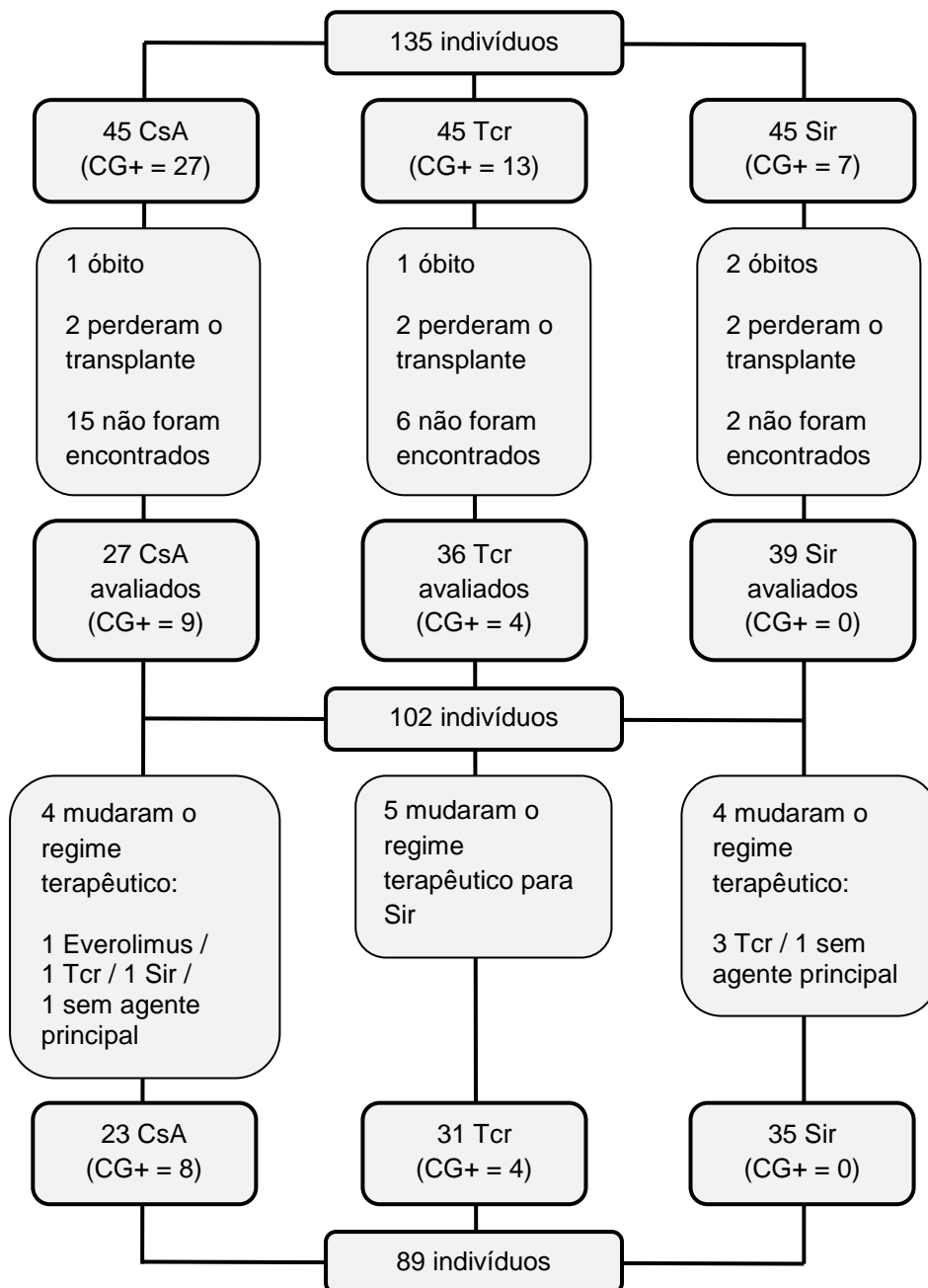


Figura 1. Fluxograma amostral.

Tabela 1. Características da amostra total em relação a variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse no baseline (EB) e exame final (EF).

Variáveis	Amostra total		p*
	EB (n = 89)	EF (n = 89)	
<b>Número de indivíduos CG+</b>	25 (28,1%)	12 (13,5%)	<b>0,001</b>
<b>Número de indivíduos com escores CG</b>			
de 1 a 10%	15 (16,9%)	11 (12,4%)	
de 11 a 20%	3 (3,4%)	0 (0%)	<b>&lt; 0,001</b>
de 21 a 29%	4 (4,5%)	0 (0%)	
≥ 30% (cl clinicamente significativa)	3 (3,4%)	1 (1,1%)	
<b>Escore médio de CG (%)</b>	3,74 ± 8,46 (0-44)	1,43 ± 10,61 (0-100)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Escore médio de CG por papila</b>	0,19 ± 0,42 (0-2)	0,07 ± 0,53 (0-5)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>% de papilas afetadas por CG</b>	7,42 ± 14,12 (0-55)	2,53 ± 11,31 (0-100)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Índice de placa</b>	1,36 ± 0,75 (0,08-3)	1,33 ± 0,74 (0-3)	0,960
<b>Índice de sangramento papilar</b>	0,16 ± 0,24 (0-1,05)	0,11 ± 0,19 (0-1)	<b>0,003</b>
<b>% papila com sangramento após estimulação</b>	21,64 ± 28,45 (0-100)	13,36 ± 20,95 (0-100)	<b>0,001</b>
<b>Idade (anos)</b>	40,03 ± 10,59 (20-64)	43,66 ± 10,59 (24-68)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Peso corporal (kg)</b>	63,37 ± 14,91 (43-120)	65,39 ± 17,28 (41-130)	<b>0,001</b>
<b>Tempo do transplante (meses)</b>	54,18 ± 48,60 (4-237)	98,97 ± 48,62 (42-268)	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Uso concomitante BCC</b>	29 (32,6%)	19 (21,3%)	<b>0,031</b>
<b>Dose diária de Prednisona (mg)</b>	4,52 ± 3,95 (0-20)	3,74 ± 2,20 (0-10)	<b>0,037</b>
<b>Dose diária de Azatioprina (mg)</b>	9,04 ± 35,19 (0-250)	2,33 ± 15,38 (0-125)	<b>0,017</b>
<b>Dose diária de MMF (mg)</b>	837,48 ± 528,54 (0-2000)	768,31 ± 456,34 (0-2000)	<b>0,020</b>
<b>Nível de creatinina (mg/dl)</b>	1,54 ± 0,69 (0,60–5,60)	1,78 ± 1,14 (0,60-7,9)	0,390

CG = crescimento gengival, BCC = bloqueadores de canais de cálcio, MMF = micofenolato mofetil.

\*comparações entre baseline (EB) e exame final (EF) através dos testes McNemar e Wilcoxon quando apropriado.

Valores de p significantes são mostrados em negrito.

Tabela 2. Características do grupo CsA em relação a variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse no baseline (EB) e exame final (EF).

Variáveis	Grupo CsA		p*
	EB (n = 23 )	EF (n = 23 )	
Número de indivíduos CG+	13 (56,5%)	8 (34,8%)	0,063
Número de indivíduos com escores CG			
de 1 a 10%	7 (30,4%)	8 (34,8%)	
de 11 a 20%	1 (4,3%)	0 (0%)	<b>0,004</b>
de 21 a 29%	4 (17,4%)	0 (0%)	
≥ 30% (cl clinicamente significativa)	1 (4,3%)	0 (0%)	
Escore médio de CG (%)	7,70 ± 10,29 (0-31)	0,78 ± 1,38 (0-4)	<b>0,003</b>
Escore médio de CG por papila	0,38 ± 0,51 (0-2)	0,04 ± 0,07 (0-4)	<b>0,003</b>
% de papilas afetadas por CG	16,74 ± 18,44 (0-55)	4,13 ± 7,02 (0-20)	<b>0,003</b>
Índice de placa	1,49 ± 0,69 (0,44-3)	1,29 ± 0,71 (0-3)	0,095
Índice de sangramento papilar	0,22 ± 0,29 (0-1,05)	0,10 ± 0,14 (0-0,45)	<b>0,007</b>
% papila com sangramento após estimulação	26,96 ± 32,53 (0-100)	10,65 ± 13,34 (0-40)	<b>0,006</b>
Idade (anos)	37,13 ± 8,86 (23-60)	40,35 ± 8,63 (27-63)	<b>&lt; 0,001</b>
Peso corporal (kg)	64,99 ± 18,22 (44-120)	65,97 ± 21,65 (43-130)	0,192
Tempo do transplante (meses)	104,91 ± 55,02 (5-237)	149,57 ± 53,79 (50-268)	<b>&lt; 0,001</b>
Dose diária de CsA (mg)	165,22 ± 47,52 (75-250)	129,35 ± 53,79 (50-250)	<b>0,008</b>
Nível sérico de CsA (mg/dl)	491,95 ± 304,53 (58-1081)	376,14 ± 304,74 (37-1050)	0,429
Uso concomitante BCC	12 (52,2%)	7 (30,4%)	0,063
Dose diária de Prednisona (mg)	5,76 ± 2,76 (0-15)	4,67 ± 1,14 (0-5)	<b>0,041</b>
Dose diária de Azatioprina (mg)	30,43 ± 63,94 (0-250)	8,70 ± 29,78 (0-125)	0,066
Dose diária de MMF (mg)	876,52 ± 849,72 (0-2000)	725,22 ± 711,85 (0-2000)	0,283
Nível de creatinina (mg/dl)	1,47 ± 0,32 (0,90-2,41)	1,54 ± 0,60 (0,70-3,5)	0,523

CsA = ciclosporina, CG = crescimento gengival, BCC = bloqueadores de canais de cálcio, MMF = micofenolato mofetil.

\*comparações entre baseline (EB) e exame final (EF) através dos testes McNemar e Wilcoxon quando apropriado.

Valores de p significantes são mostrados em negrito.

Tabela 3. Características do grupo Tcr em relação a variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse no baseline (EB) e exame final (EF).

Variáveis	Grupo Tcr		p*
	EB (n = 31)	EF (n = 31)	
Número de indivíduos CG+	6 (19,4%)	4 (12,9%)	0,500
Número de indivíduos com escores CG			
de 1 a 10%	3 (9,7%)	3 (9,7%)	
de 11 a 20%	1 (3,2%)	0 (0%)	0,059
de 21 a 29%	0 (0%)	0 (0%)	
≥ 30% (cl clinicamente significativa)	2 (6,5%)	1 (3,2%)	
Escore médio de CG (%)	3,58 ± 10,14 (0-44)	3,52 ± 17,94 (0-100)	0,344
Escore médio de CG por papila	0,18 ± 0,51 (0-2)	0,18 ± 0,90 (0-5)	0,344
% de papilas afetadas por CG	5,97 ± 14,11 (0-50)	4,19 ± 18,08 (0-100)	0,344
Índice de placa	1,28 ± 0,79 (0,08-3)	1,29 ± 0,80 (0,145-3)	0,658
Índice de sangramento papilar	0,17 ± 0,26 (0-1)	0,13 ± 0,27 (0-1)	0,178
% papila com sangramento após estimulação	22,03 ± 31,10 (0-100)	15,05 ± 26,15 (0-100)	<b>0,046</b>
Idade (anos)	39,84 ± 10,09 (20-60)	43,77 ± 10,13 (24-63)	<b>&lt;0,001</b>
Peso corporal (kg)	61,38 ± 12,64 (43-95)	61,84 ± 13,23 (41-100)	0,299
Tempo do transplante (meses)	35,90 ± 29,18 (4-94)	79,00 ± 28,83 (42-134)	<b>&lt;0,001</b>
Dose diária de Tcr (mg)	4,9 ± 2,93 (1-11)	3,13 ± 1,50 (1-7)	<b>0,001</b>
Nível sérico de Tcr (mg/dl)	7,70 ± 2,80 (4-14)	6,16 ± 2,91 (2-16)	<b>0,013</b>
Uso concomitante BCC	8 (25,8%)	7 (22,6%)	1,000
Dose diária de Prednisona (mg)	4,60 ± 4,57 (0-20)	2,98 ± 2,37 (0-5)	<b>0,016</b>
Dose diária de Azatioprina (mg)	3,39 ± 12,48 (0-50)	0,23 ± 1,28 (0-7)	0,109
Dose diária de MMF (mg)	796,13 ± 391,18 (0-1440)	692,90 ± 415,97 (0-1080)	<b>0,039</b>
Nível de creatinina (mg/dl)	1,56 ± 0,89 (0,66-5,60)	2,16 ± 1,67 (0,80-7,9)	0,113

Tcr = tacrolimus, CG = crescimento gengival, BCC = bloqueadores de canais de cálcio, MMF = micofenolato mofetil.

\*comparações entre baseline (EB) e exame final (EF) através dos testes McNemar e Wilcoxon quando apropriado.

Valores de p significantes são mostrados em negrito.



Tabela 4. Características do grupo Sir em relação a variáveis demográficas, farmacológicas e periodontais de interesse no baseline (EB) e exame final (EF).

Variáveis	Grupo Sir		p*
	EB (n = 35)	EF (n = 35)	
Número de indivíduos CG+	6 (17,1%)	0 (0%)	NA
Número de indivíduos com escores CG			
de 1 a 10%	5 (14,3%)	0 (0%)	
de 11 a 20%	1 (2,9%)	0 (0%)	<b>0,020</b>
de 21 a 29%	0 (0%)	0 (0%)	
≥ 30% (cl clinicamente significativa)	0 (0%)	0 (0%)	
Escore médio de CG (%)	1,29 ± 3,04 (0-12)	0	<b>0,027</b>
Escore médio de CG por papila	0,06 ± 0,75 (0-1)	0	<b>0,027</b>
% de papila afetada por CG	2,57 ± 5,99 (0-20)	0	<b>0,026</b>
Índice de placa	1,35 ± 0,75 (0,31-3)	1,39 ± 0,71 (0,13-3)	<b>0,038</b>
Índice de sangramento papilar	0,12 ± 0,18 (0-0,93)	0,09 ± 0,14 (0-1)	0,219
% papila com sangramento após estimulação	17,80 ± 22,85 (0-100)	13,63 ± 20,24 (0-100)	0,207
Idade (anos)	42,11 ± 11,82 (25-64)	45,74 ± 11,83 (28-68)	<b>&lt;0,001</b>
Peso corporal (kg)	64,71 ± 14,63 (43-98)	68,15 ± 17,18 (45-114)	<b>&lt;0,001</b>
Tempo do transplante (meses)	37,03 ± 32,49 (6-155)	83,40 ± 34,17 (52-194)	<b>&lt;0,001</b>
Dose diária de Sir (mg)	2,66 ± 1,08 (1-6)	2,20 ± 0,76 (1-4)	<b>0,007</b>
Nível sérico de Sir (mg/dl)	6,63 ± 3,15 (1-15)	7,16 ± 2,99 (1-13)	0,330
Uso concomitante BCC	9 (25,7%)	5 (14,3%)	0,344
Dose diária de Prednisona (mg)	3,64 ± 3,90 (0-20)	3,79 ± 2,38 (0-10)	0,520
Dose diária de Azatioprina (mg)	0	0	NA
Dose diária de MMF (mg)	940,0 ± 332,87 (540-2000)	863,43 ± 206,57 (360-1080)	0,282
Nível de creatinina (mg/dl)	1,58 ± 0,69 (0,60-4,30)	1,62 ± 0,72 (0,60-3,5)	0,875

Sir = sirolimus, CG = crescimento gengival, BCC = bloqueadores de canais de cálcio, MMF = micofenolato mofetil, NA = não aplicável.

\*comparações entre baseline (EB) e exame final (EF) através dos testes McNemar e Wilcoxon quando apropriado.

Valores de p significantes são mostrados em negrito.

Tabela 5. Modelos multivariados finais (regressão logística) para ocorrência de crescimento gengival no total da amostra e CsA, Tcr em EF.

Variáveis	Coefficiente (intervalo confiança 95%)	Odds ratio (OR) ajustada (intervalo confiança 95%)	p*
<b>Modelo 1 = amostra total</b>			
Constante	-3.630 (-5.091 a -2.169)	NA	<0.001
Índice sangramento papilar	7.619 (2.961 a 12.279)	6.376 (1.210 a 33.592)	0.001
Uso concomitante BCC	1.853 (0.191 a 3.514)	2037.73 (19.310 a –)	0.029
<b>Modelo 2 = grupo CsA</b>			
Constante	-1.723 (-3.083 a -0.363)	NA	0.013
Índice sangramento papilar	10.427 (1.088 a 19.767)	33765.24 (2.967 to –)	0.029
<b>Modelo 3 = grupo Tcr</b>			
Constante	-3.986 (-6.628 a -1.344)	NA	0.003
Índice sangramento papilar	8.858 (0.695 a 17.020)	7028.181 (2.004 to –)	0.033

CsA = ciclosporina; Tcr = tacrolimus; BCC = bloqueadores de canais de cálcio; NA = não se aplica.

Modelo 1: pseudo  $R^2 = 0.3099$ , área sob curva ROC = 0.8793, especificidade = 98.70%;

Modelo 2: : pseudo  $R^2 = 0.2579$ , área sob curva ROC = 0.8292, especificidade = 86.67%

Modelo 3: pseudo  $R^2 = 0.5644$ , área sob curva ROC = 0.9537, especificidade = 100.00%.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para as diferentes propostas de investigação desta pesquisa, em relação a incidência e gravidade do CG em indivíduos sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir, bem como a sua relação com variáveis de risco, as seguintes considerações finais foram estabelecidas:

- Em relação aos achados de ocorrência do polimorfismo de base única do gene da IL-1 $\beta$  (+3954C/T), não houve associação entre a frequência dos genótipos +3954CC, +3954CT, +3954TT, nem dos alelos C e T neste polimorfismo com o CG em indivíduos transplantados renais sob os regimes imunossupressores de manutenção baseados em CsA, Tcr e Sir.

- Incidência de CG não foi observada nos indivíduos transplantados renais sob regimes imunossupressores baseados em CsA, Tcr e Sir após 44 meses. Em relação às mudanças na condição gengival dos indivíduos transplantados renais, após 44 meses, houve redução significativa na ocorrência e gravidade do CG na amostra total, redução da ocorrência do CG, embora não significativa, nos grupos CsA e Tcr, e redução significativa da gravidade do CG nos grupos CsA e Sir.

- Na análise das variáveis de risco, variáveis farmacológicas representadas pelo uso concomitante de BCC e variáveis periodontais representadas pelo índice de sangramento papilar, foram associadas ao CG. Especificamente, para a amostra total, o CG foi associado ao uso concomitante de BCC e ao índice de sangramento papilar e para os regimes baseados em CsA e Tcr, o CG foi associado ao índice de sangramento papilar.

- Neste sentido, esta pesquisa ressalta a importância do estabelecimento de variáveis associadas à mudanças na condição gengival de indivíduos transplantados para a melhoria das terapias imunossupressoras e qualidade de vida dos indivíduos.

## REFERÊNCIAS

1. American Academy of Periodontology (AAP). Drug-associated gingival enlargement. **J Periodontol** 2004;75:1424-1431.
2. Armitage JM, Fricker, FJ, del Nido P, Starzl TE, Hadersty RL, Griffith BP. A decade (1982 to 1992) of pediatric cardiac transplantation and the impact of FK 506 immunosuppression. **J Thorac Cardiovasc Surg**1993; 105:464-472.
3. Asante-Korang A, Boyle GJ, Webber SA, Miller SA, Fricker FJ. Experience of FK506 immune suppression in pediatric heart transplantation: a study of long-term adverse effects. **J Heart Lung Transplant** 1996;15:415-422.
4. Bader G, Lejeune S, Messner M. Reduction of cyclosporine induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. **J Periodontol** 1998;69:729-732.
5. Barbari AG, Stephan AG, Masri MA. Calcineurim inhibitor-free protocols: risks and benefits. **Saudi J Kidney Dis Transplant** 2007;18:1-23.
6. Bestard O, Cruzado JM, Grinyó JM. Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols. **Transplant Proc** 2005;37: 3729-3732.
7. Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. **Quintessence Int** 1999;30:775-783.
8. Bostanci N, Ilgenli T, Pirhan DC, Clarke FM, Marcenes W, Atilla G, Hughes FJ, McKay IJ. Relationship between IL-1A polymorphisms and

- gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving Cyclosporin A. **J Clin Periodontol** 2006;33:771-778.
9. Cezário ES, Cota LOM, Ferreira SD, Siqueira FM, Soares RV, Zenóbio EG, Costa FO. Gingival overgrowth in renal transplant subjects medicated with tacrolimus in the absence of calcium channel blockers. **Transplantation** 2008;85:232-236.
  10. Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Ruiz P, Roth D, Kupin W, Rosen A, Miller J. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate versus cyclosporine/sirolimus in renal transplantation: three-year analysis. **Transplantation** 2006;81:845-852.
  11. Costa FO, Ferreira SD, Cota LOM, Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity, and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporine regimens. **J Periodontol** 2006;77:969-975.
  12. Costa FO, Ferreira SD, Lages EJP, Costa JE, Oliveira AMSD, Cota LOM. Demographic, pharmacologic, and periodontal variables for gingival overgrowth in subjects medicated with cyclosporin in the absence of calcium channel blockers. **J Periodontol** 2007;78: 254-261.
  13. Cota LOM, Oliveira APL, Costa JE, Cortelli SC, Costa FO. Gingival status of Brazilian renal transplant recipients under sirolimus-based regimens. **J Periodont** 2008;79:2060-2068.
  14. Cota LOM, Aquino DR, Franco GCN, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. **J Clin Periodontol** 2010a; 37:894-902.

15. Cota LOM, Viana MB, Moreira PR, Gomez RS, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus-based immunosuppressive regimens and the single nucleotide IL-6 (S174 G/C) gene polymorphism. **Arch Oral Biol** 2010b;55:494-501.
16. Das SJ, Newman HN, Olsen I. Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. **J Dent Res** 2001;81:683-687.
17. De Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **Int Endod J** 2007;40:563-572.
18. Dinarello CA. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. **Curr Opin Immunol** 1991;3:941-948.
19. Drozdziak M, Kurzawski M, Drozdziak A, Kotrych K, Banach J, Pawlik A. Interleukin-6 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 2005;32:955-958.
20. Ellis JS, Seymour RA, Taylor JJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. **J Clin Periodontol** 2004;31:126-131.
21. Flechner SM. Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation. **Transplant Proc** 2003;35:118-121.
22. Gong YM, Cao LF, Ynag Y, Gu ZY. Relationship of putative periodontopathogenic bacteria and drug-induced gingival overgrowth. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi** 2008;43:347-351.

23. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. **J Clin Periodontol** 1998;25:781-785.
24. Greenberg KV, Armitage GC, Shiboski CH. Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new-generation immunosuppressants. **J Periodontol** 2008;79:453-460.
25. Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. **J Periodontol** 2002;73:231-247.
26. James JA, Boomer S, Maxwell AP, Hull PS, Short CD, Campbell BA, Johnson RWG, Irwin CR, Marley JJ, Spratt H, Linden GJ. Reduction of gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. **J Clin Periodontol** 2000;27:144-148.
27. James JA, Jamal S, Hull PS, Macfarlane TV, Campbell BA, Johnson RWG, Short CD. Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients. **J Clin Periodontol** 2001;28:848-852.
28. Johnson RB, Zebrowski EJ, Dai X. Synergistic enhancement of collagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts exposed to nifedipine and interleukin-1-beta in vitro. **J Oral Pathol Med** 2000;29:8-12.
29. Kardachi BJ, Newcomb GM. A clinical study of gingival inflammation in renal transplant recipients taking immunosuppressive drugs. **J Periodontol** 1978;49:307-309.
30. Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, Morisaki I, Ohsaki Y, Kido JI, Nagata T. Cyclosporin A decreases the



- degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. **J Cell Physiol** 2000;182:351-358.
31. Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T. Drug-induced gingival overgrowth – a review. **Biol Pharm Bull** 2005;28:1817-1821.
  32. Khauli RB, Houjaij A, Sawah S, El-Hout Y, Medawwar W, Hussein M, Habbal A, Daouk M, Uwaydah M, Maacaron H, Abdelnoor A. Observations on quadruple immunosuppression maintenance therapy using rapamycin, low-dose cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone following ATG induction. **Transplant Proc** 2005;37:3031-3033.
  33. Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72-77.
  34. Kozak M, Kurzawski M, Wajda A, Lapczuk J, Lipski M, Dziewanowski K, Drozdziak M. TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. **Oral Dis** 2011;17:1-16.
  35. Kurzawski M, Drozdziak A, Dembowska E, Pawlik A, Banach J, Drozdziak M. Matrix metalloproteinase-1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival enlargement. **J Periodontol** 2006;77:1498-1502.
  36. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. **J Periodont Res** 2000;35:102-107.

37. Lima RB, Benini V, Sens YA. Gingival overgrowth in renal transplant recipients: a study concerning prevalence, severity, periodontal, and predisposing factors. **Transplant Proc** 2008;40:1425-1428.
38. Linden GJ, Simone EH, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D, Irwin CR, Marley JJ, McNamee P, Short CD, Hull PS, James JA. The influence of transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. **J Periodontol** 2001;72:808-814.
39. Lu HK, Chou HP, Li CL, Wang MY, Wang LF. Stimulation of cells derived from nifedipine-induced gingival overgrowth with *Porphyromonas gingivalis*, lipopolysaccharide, and interleukin-1 $\beta$ . **J Dent Res** 2007;86:1100-1104.
40. Margreiter R, Pohanka E, Sparacino V, Heide Sperschneider H, Kuzendor U, Huber W. Open prospective multicenter study of conversion to tacrolimus therapy in renal transplant patients experiencing cyclosporin-related side-effects. **Transplant Int** 2005;18: 816-823.
41. Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Marzola R, Calura G. Ultrastructural features of CsA-induced gingival hyperplasia. **J Periodontol** 1993;64: 1092-1097.
42. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingival by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. **Immunology** 1992;76:42-47.

43. McGaw T, Lam S, Coates J. Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporine levels in serum and saliva. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1987;64:293-297.
44. McKaig SJ, Kell D, Shaw L. Investigation of the effect of FK506 (tacrolimus) and cyclosporine on gingival overgrowth following pediatric liver transplantation. **Int J Paediatr Dent** 2002;12:398-403.
45. Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollub KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1beta gene polymorphism associated is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. **J Periodontal Res** 2005;40:306-311.
46. Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin 1 alpha, beta and the interleukin 1 receptor antagonist genes. **Genomics** 1994;19:382-384.
47. Paixão CG, Sekiguchi RT, Saraiva L, Pannuti CM, Silva Jr HT, Medina-Pestana JO, Romito, GA. Gingival Overgrowth Among Patients Medicated With Cyclosporin A and Tacrolimus Undergoing Renal Transplantation: A Prospective Study. **J Periodontol** 2011;82:251-258.
48. Parada B, Mota A, Nunes P, Macario F, Pratas J, Bastos C, Figueiredo A. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in renal transplantation. **Transplan Proc** 2005;37:2759-2761.
49. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early onset periodontitis. **J Clin Periodontol** 2000;27:682-689.

50. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003;100:177-182.
51. Párraga-Linares L, Almendros-Marqués N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Effectiveness of substituting cyclosporin A with tacrolimus in reducing gingival overgrowth in renal transplant patients. **Med Oral, Patol Oral Cir Bucal** 2009;14:429-433.
52. Pernu HE, Pernu LMH, Knuutila MLE, Huttunen KRH. Gingival overgrowth among renal transplant recipients and uraemic patients. **Nephrol Dial Transplant** 1993;8:1254-1258.
53. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq I polymorphism in the human interleukin 1 beta gene correlates with secretion in vitro. **Eur J Clin Invest** 1992;22:396-402.
54. Radwan-Oczko M, Boratyńska M, Zietek M, Zołędziewska M, Jonkisz A. The relationship of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism, its plasma level, and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens. **J Periodontol** 2006;77:865-873.
55. Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA, Thomason JM. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. **J Dent Res** 2004;83:322-326.
56. Saxer UP, Mühlemann HR. Motivation and education. **SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd** 1975;85:905-919.

57. Schuller PD, Freedman HL, Lewis DW. Periodontal status of renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. **J Periodontol** 1973;44:167-170.
58. Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 2000; 27:217-223.
59. Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. **J Clin Periodontol** 1992;19:1-11.
60. Seymour RA, Smith DG. The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. **J Clin Periodontol** 1991;18:107-110.
61. Silness J, L oe H. Periodontal disease in pregnancy: correlation between oral hygiene and periodontal condition. **Acta Odontol Scand** 1964;22:131-135.
62. Somacarrera ML, Hernandez G, Acero J, Moscov BS. Factor related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplanted patients. A longitudinal study. **J Periodontol** 1994;65:671-675.
63. Thomason JM, Seymour RA, Rice N. The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine induced gingival overgrowth. **J Clin Periodontol** 1993;20:37-40.
64. Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS. Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with cyclosporin in absence of calcium channel blockers. **J Clin Periodontol** 2005;32:273-279.
65. Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival and overgrowth. **Crit Rev Oral Biol Med** 2004;15:165-175.

66. Wilson, R. F., Morel, A., Smith, D., Koffman, C. G., Ogg, C. S., Rigden, S. P. A. Ashley, F. P. Contribution of individual drugs to gingival overgrowth in adult and juvenile renal transplant patients treated with multiple therapy. **J Clin Periodontol** 1998;25:457-464.
67. Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. **J Clin Epidemiol** 2008;61:634-645.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 01**

Parecer no. (CAAE - 0179.0.203.000-11) - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais COEP/UFMG.

### **ANEXO 02**

Parecer no. (CAAE – 0360.0.203.240-11) - Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Felício Rocho CEP/HFR.

### **ANEXO 03**

Aprovação do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

### **ANEXO 04**

Consentimento livre e informado.

### **ANEXO 5**

Exames periodontais.

### **ANEXO 6**

Ficha clínica.