

Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

**Análise do Polimorfismo Genético do
Fator de Necrose Tumoral Beta (+252
A/G) em pacientes com Periodontite
Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Buco-Dental, Área de Histologia
e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Pereira Barros
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Enílson Antônio Sallum
Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior
Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

2005

Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

**Análise do Polimorfismo Genético do
Fator de Necrose Tumoral Beta (+252
A/G) em pacientes com Periodontite
Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Buco-Dental, Área de Histologia
e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Pereira Barros
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Enílson Antônio Sallum
Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior
Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

V441a Vasconcelos, Daniel Fernando Pereira.
Análise do polimorfismo genético do fator de necrose tumor
Beta (+252 A/G) em pacientes com periodontite crônica. / Dan
Fernando Pereira Vasconcelos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores: Silvana Pereira Barros, Sérgio
Roberto Peres Line
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

**1. Periodontite. 2. Fator de necrose de tumor. 3.
Polimorfismo. I. Barros, Silvana Pereira. II. Line, Sérgio
Roberto Peres. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.**
(mg/fop)

Título em inglês: Polymorphism in lymphotoxin-alpha gene is associated with
susceptibility to periodontal disease

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Periodontitis; Tumor necrosis factor;
Polymorphism

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental
Banca examinadora: Enilson Antônio Sallum; Rui Barbosa de Brito Júnior; Sérgio
Roberto Peres Line
Data da defesa: 25/02/2005

Dedicatória

Dedico à
minha mãe Ana Lúcia Pereira Vasconcelos
e ao meu pai Osvaldo Almeida Vasconcelos Filho,
que muito me incentivaram
e
sempre
me conduziram
no caminho do amor, respeito e paz ...

Agradecimento

Agradeço a DEUS

Pelos dons que me têm dado...

Pelas conquistas...

Pelas oportunidades...

Por minha vida...

Agradecimento Especial

À Prof. Dra. Silvana Pereira Barros pela amizade,
orientação, confiança e liberdade na condução deste
trabalho.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa de seu
diretor Professor Doutor THALES ROCHA DE MATTOS FILHO;

Ao coordenador dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba Professor Doutor LOURENÇO CORRER SOBRINHO;

Aos *pacientes* que com muita paciência e boa vontade colaboraram com o
desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu Co-Orientador, que durante a ausência de minha orientadora me ajudou a
conduzir os experimentos, Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE exemplo de
dedicação ao ensino e principalmente à pesquisa.

Ao Prof. Dr. ENÍLSON ANTÔNIO SALLUM pelo auxílio prestado na seleção dos
pacientes na Clínica de Especialização de Periodontia.

Ao Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES pelo aceite de participar da banca
examinadora.

A Profa. Dra. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO exemplos de dedicação ao ensino
e à pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho;

A todos os demais professores da FOP, especialmente aos do Programa de Biologia
Buco- Dental.

A minha irmã ANDRÉIA A. P. VASCONCELOS que muito me incentivou durante
o desenvolvimento deste trabalho.

A alguns amigos que mesmo distantes colaboraram de alguma forma para a
realização deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Morfologia: CIDINHA, ELIENE,
ELI, SUZETE e GUSTAVO, pela amizade, pelo apoio, pela atenção e por estarem
dispostos a ajudar sempre;

Ao amigo Marco Antônio Dias da Silva pela amizade e ensinamentos pessoais e
científicos que levarei guardados por toda vida.

Ao amigo Marcelo Marques Rocha pela amizade dentro e fora do laboratório.

Ao amigo Eduardo pelo incentivo e companheirismo.

Às secretárias da pós-graduação Érica e Raquel, que além de muito competentes,
estão sempre prontas a ajudar com boa vontade;

Ao DR. RUI BARBOSA DEB RITO JÚNIOR, pela amizade e auxílio que

prestou e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

Aos amigos ALEXANDRE, CRIS BORGES, CRIS ALMON, MARIA CRISTINA,

MARISI, SÔNIA, ISABEL, ISABELA, FÁBIO e ADRIANA pelo convívio diário no

laboratório.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXOS:	
Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	33
Trabalho enviado para publicação	34

RESUMO

A doença periodontal (DP) é causada por interações entre fatores do hospedeiro, microrganismos específicos patogênicos e o sistema imunológico. TNF- β é um imunoregulador multifuncional que está relacionado com a patogênese de diversas desordens imunológicas, incluindo a DP. Nosso estudo analisou a associação entre DP e polimorfismo no gene TNF- β (+252 A/G). O DNA foi extraído de células da mucosa oral de 126 indivíduos brancos: 44 indivíduos controle e 82 indivíduos com DP. O polimorfismo foi analisado pela técnica de PCR, seguida pela RFLP. Os dados foram estatisticamente analisados pelo teste Exato Fisher ($p < 0,05$) e Odds Ratio (OR). A frequência do polimorfismo mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e com DP, revelando que indivíduos portadores do alelo G apresentavam 2,6 vezes mais chances de desenvolver a DP do que indivíduos saudáveis (G vs. A, $p = 0,0019$, OR = 2.67, 95% CI 1.45 – 4.78), em relação aos genótipos a presença de pelo menos um alelo G predispõe 3,1 vezes à DP (G/G+ G/A vs. A/A, $p = 0,0059$, OR = 3.1, 95% CI 1.45 – 6.65). Conclui-se que o TNF- β está envolvido na patogênese da periodontite crônica e pode ser utilizado como um marcador de risco para a DP na população estudada.

ABSTRACT

Background: Periodontitis is an inflammatory disease that leads to irreversible attachment loss, bone destruction and eventually bone loss, such cascade that culminates in tissue destruction initiates with pathogenic micro-organisms and depends on host response to disease expression.

Tumor necrosis factor (TNF) a potent multifunctional immune modulator has been implicated in the pathogenesis of periodontal disease.

Objective: In this study we investigated the hypothesis of association between chronic periodontitis (CP) and polymorphisms of the TNF- β gene.

Materials and Methods: One hundred twenty six individuals were evaluated by measuring clinical attachment loss and divided in 44 health individuals (control group-CG) and 82 subjects with CP. DNA samples were obtained from the individual's epithelial cells through scraping of the buccal mucosa. Polymorphism in the TNF- β gene was analyzed by PCR, followed by NcoI restriction endonuclease digestion (RFLP).

Results: The TNF- β (+252A/G) polymorphism showed association with chronic periodontitis. Significant differences were found for the TNF- β allele or carriage rate frequencies; odds ratio (OR)=2.67

Conclusions: These findings suggest that genotype composed of TNF- β gene polymorphism may influence the susceptibility to chronic periodontitis.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma destruição inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes incluindo: ligamento periodontal, cemento, osso alveolar, e eventualmente a perda do dente.

Embora o biofilme periodontal seja necessário para o início da DP, a natureza da resposta inflamatória é determinada primariamente por fatores genéticos e ambientais e fatores adquiridos, tal como o fumo (Johnson & Slach, 2001; Linden et al, 1996; Mealey, 2000). A resposta do hospedeiro é essencialmente de proteção, contudo uma resposta inflamatória exacerbada pode levar a uma destruição tecidual mais severa, indicando uma contribuição crítica da resposta do indivíduo no desenvolvimento da DP (Kornman *et al*, 1997; Reinhardt *et al*, 1993).

Nos últimos vinte anos, a apreciação da complexidade da resposta immune e como ela é regulada, têm levado a grandes avanços nos estudos da citocinas e genética molecular, sendo as citocinas consideradas reguladores chave de mecanismos homeostáticos tais como resposta immune, inflamação, e reparo tecidual, e é de se esperar que variações em seus níveis (quantitativas) ou estruturais (qualitativos) possam ser associadas com susceptibilidade a doenças, com o potencial de contribuir em sua etiopatogênese (Ollier WE. 2004), o que justifica o grande número de estudos de polimorfismos genéticos

em citocinas, associando caso/controle, e que descrevem risco aumentado de doenças em certos polimorfismos genéticos.

Dentre as citocinas proinflamatórias, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) ajuda a modular a resposta inflamatória. As linfocinas (LT) α e β compõem dois dos membros da Superfamília TNF sendo que a LT- α também é conhecida como TNF- β (Korner et al, 1996).

Recentemente o fator de necrose tumoral beta (TNF- β) tem sido mais estudado e associado com diversas doenças como: artrite reumatóide (Newton et al, 2004), asma (Albuquerque et al, 1998) e também identificado como fator de risco para infarto do miocárdio em indivíduos japoneses (Ozaki et al, 2002).

Contudo pouco se investigou sobre a relação do TNF- β e inflamação relacionada com infecção periodontal e, os dados disponíveis (Fassmann et al, 2003) apresentam resultados apenas na população Tcheca.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Doença Periodontal (DP):

A doença periodontal é caracterizada por um processo inflamatório que destrói os tecidos de suporte dos dentes: ligamento periodontal, cemento e osso alveolar.

A periodontite está presente na população adulta em diferentes graus, dependendo da população estudada, representando a maior causa de perda de dentes em adultos (Albandar & Rams, 2002; Brown & Loe, 1993; Tinoco *et al*, 1997). É uma doença que tem associação com certas condições sistêmicas, genéticas, o uso de tabaco e álcool, sendo que estes fatores podem determinar e/ou influenciar o modo de progressão e interferir na patogênese da doença. Estas observações têm mudado a idéia sobre a patogênese, prevenção e tratamento da DP (Johnson *et al*, 2001; Page, 1999).

A resposta individual de natureza inflamatória, induzida por bactérias presentes no biofilme, parece exercer uma função fundamental no desenvolvimento da DP (Genco & Slots, 1984), e é uma condição necessária para que a mesma se desenvolva, embora a quantidade e as espécies bacterianas não sejam variáveis suficientes para explicar o complexo processo desta doença (Kornman *et al*, 1997).

Quadros graves de DP podem ocorrer na ausência de um biofilme dental com características periodontopatogênicas, sugerindo uma resposta inflamatória exagerada do indivíduo (Reinhardt *et al*, 1993), o que indica uma contribuição importante da resposta do hospedeiro em relação à patogênese da DP (Page 1999; Kornman & Loe, 2000).

Considera-se que as bactérias, que compõem o biofilme periodontopatogênico, podem levar à iniciação de uma complexa cascata de reações inflamatórias do hospedeiro (Page & Kornman, 1997) que pode culminar com a ativação de células promotoras de reabsorção óssea e também na ativação de enzimas proteolíticas que irão destruir as estruturas de suporte dentário (Lorenzo, 1991; Puzas *et al*, 1994).

Não só a presença, como também a intensidade da inflamação dos tecidos periodontais estão associados com a progressão da doença (Offerbacher *et al*, 1981). Diferenças na expressão de citocinas inflamatórias são de interesse na pesquisa periodontal e, tem sido relatada a presença das mesmas no periodonto inflamado em concentrações capazes de induzir reabsorção óssea (Fujihashi *et al*, 1993; Fujihashi *et al*, 1996; Baker, 2000).

Apesar de ainda não se saber o que leva a diferentes expressões de citocinas inflamatórias frente a um mesmo patógeno em diferentes indivíduos, tem sido demonstrado que alterações na estrutura dos genes que codificam proteínas inflamatórias, podem estar associadas a uma maior susceptibilidade à DP (Galbraith *et al*, 1999). Dentre estas alterações genéticas, os polimorfismos que correspondem a variações genéticas encontradas na população, É a

substituição de um nucleotídeo por outro, na qual ambos alelos são observados na população com uma frequência maior que 1% (Thompson *et al*, 1991), vêm sendo estudados no intuito de relacionar a importância genética na patogênese da DP (Latkovskis *et al*, 2004; Trevilatto *et al*, 2003; Scarel-Caminaga *et al*, 2003; Souza *et al*, 2003; Fassmann *et al*, 2003).

Fator de Necrose Tumoral (TNF)

A super família TNF inclui 29 receptores e 19 ligantes. Estuda-se a função biológica de todas essas moléculas, embora certos membros, recebam maior atenção da comunidade científica, pois desempenham papéis chave nos processos fisiológicos celulares.

TNF- α e o TNF- β (também conhecido como: LTA- α) foram identificados há três décadas em linfócitos e macrófagos de mamíferos (Carswell *et al*, 1975; Granger *et al*, 1969). TNF- α é uma glicoproteína transmembrânica. Atua basicamente de duas formas: como um ligante de membrana ou em sua forma solúvel (Idriss *et al*, 2000). O TNF- α ainda pode ser liberado da membrana através da ação de uma enzima, a TACE (*TNF- α converting enzyme*) (Blobel, 1997; Ware *et al*, 1998).

Alguns membros de sua família estão relacionados com processos inflamatórios e respostas imunológicas, estando envolvido na reabsorção óssea, o que sugere uma participação na patogênese da DP (Page *et al*, 1997).

O TNF- α que é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos T e B (Springs *et al*, 1992),

foi encontrado em altas concentrações no fluido crevicular de indivíduos com periodontite (Rossomando *et al*, 1990; Hirose *et al*, 1997).

Muitos estudos tentam identificar sítios específicos que estejam associados com a alteração na produção de TNF- α (Brinkman *et al*, 1996; Wilson *et al*, 1997), também foi mostrado que polimorfismos no gene desta citocina estão associados a uma maior susceptibilidade à DP (Trevilatto *et al*, 2003).

TNF- β

O TNF- β se apresenta com 4 éxons e 3 íntrons, os quais revelam, respectivamente, um comprimento de 287pb (pares de bases), 86pb e 247pb (Nedwin *et al*. 1985). Após sua tradução, TNF- β se apresenta como uma glicoproteína de 25 Kda, que exerce uma ação moduladora na resposta imunoinflamatória. Os genes TNF- α e TNF- β estão localizados próximos um do outro, no interior do HLA (Antígenos de leucócitos humanos) de classe III braço curto do cromossomo 6 (Schneider *et al*, 2004) e apresentam em sua estrutura 28% da seqüência de aminoácidos idênticas, sendo que o último éxon é a porção na qual há maior semelhança, sugerindo um ancestral comum para ambos os genes durante o processo evolutivo (Nedwin *et al*. 1985).

O TNF- β interage com os mesmos dois receptores celulares com que o TNF- α também interage: TNFR1 (p55) e o TNFR2 (p75) de domínios citoplasmáticos diferentes (Idriss *et al*, 2000; MacEwan, 2002; Herbein & O'brien, 2000), o que estimula dois mecanismos distintos, atribuindo ao TNFR1 muitos

dos efeitos inflamatórios. Estudo realizado em camundongos com deficiência para o gene TNFR2, demonstrou uma inflamação atenuada (Amar *et al*, 1995-96). Esses dois receptores, p55 e p75, são glicoproteínas transmembrânicas com alto grau de semelhança e sugere-se que estejam expressas em todos tipos celulares (Goetz *et al*, 2004). O TNF- β (LT- α) interage também com o receptor da Linfotóxina- β (LT- β) que é essencial para o desenvolvimento dos linfonodos (Gormmerman & Browning, 2003).

Indivíduos com quadro de septicemia severa portadores do TNF- β A (TNF- β 2) apresentaram altos níveis plasmático de TNF- α (Stuber *et al*, 1996; Pociot *et al*, 1993), demonstrando que o TNF- β é capaz de modular os níveis plasmáticos de TNF- α .

Muitos estudos de susceptibilidade genética estão focalizando o TNF- α , mas o polimorfismo no do TNF- β tem demonstrado associação com diversas doenças como: artrite reumatóide (Newton *et al*, 2004), asma (Albuquerque *et al*, 1998), infarto do miocárdio (Ozaki *et al*, 2002) e DP (Fassmann *et al*, 2003)

3. PROPOSIÇÃO

O Objetivo deste trabalho foi investigar a possível associação entre a doença periodontal crônica e o polimorfismo +252 A/G no gene TNF- β .

4. Materiais e Métodos

4.1 Seleção da amostra:

Nesse estudo uma amostra composta de 126 indivíduos brancos foi analisada. Pacientes não fumantes e com idade superior a 25 anos (média de 43,4 anos), foram recrutados na Clínica de Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - Unicamp e também foram incluídos pacientes da Clínica de Especialização de Periodontia - FOP– UNICAMP. As características clínicas da população estão apresentadas na Tabela 1. Todos pacientes apresentavam bom estado geral de saúde e apresentavam ao menos 20 dentes. Os critérios de exclusão na seleção dos pacientes foram: doenças de tecidos moles e duros da boca, com exceção de cárie e doença periodontal; uso de aparelho ortodôntico; necessidade de pré-medicação para tratamento dental; uso crônico de medicamentos antiinflamatórios; história de diabetes, infecção por HIV; quimioterapia imunossupressiva; história de qualquer alteração sistêmica que comprometesse a função imunológica, presença de gengivite ulcero necrosante; gravidez ou lactação. Os pacientes foram submetidos a uma completa anamnese e assinaram o termo de consentimento para a participação em pesquisa (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP protocolo nº 76/2003, anexo 1).

O diagnóstico e a classificação da doença periodontal (DP) foram obtidos com base nas características clínicas dos pacientes por meio de exame dental onde foram observados: profundidade de sulco ou bolsa periodontal,

perda de inserção clínica (CAL), mobilidade dental, retração gengival e sangramento à sondagem. Os pacientes foram classificados de acordo com a presença ou não da doença periodontal:

Grupo Controle: pacientes sem sangramento gengival ao exame de sondagem periodontal, tecido gengival sadio e nenhum dente com profundidade de sondagem superior a 3 mm (n= 44);

Grupo com Periodontite Crônica: pacientes com dentes exibindo CAL ≥ 5 mm (n= 82) em pelo menos 6 sitios, com sangramento a sondagem periodontal, apresentando tecido gengival inflamado.

TABELA 1. **Características Clínicas da População Estudada**

	Grupo Controle (n= 44)	Grupo Com DP (n= 82)
<i>Idade (anos)</i>		
Média (desvio padrão)	39 $\pm$ 14,3	45,9 $\pm$ 10,3
<i>Gênero</i>		
Masculino	27%	39%
Feminino	73%	61%
Nível de Inserção Clínica (mm)	1,9 $\pm$ 1,3	7,9 $\pm$ 1,9
Mobilidade (média de dentes)	0,07 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 4,5

Obtenção da Amostra:

O DNA foi extraído a partir de células epiteliais da mucosa bucal obtidas através de bochecho com glicose a 3%, por cerca de 1 min, e leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada que foi mergulhada e agitada na solução pré-bochechada (Trevilatto & Line, 2000). Esta solução foi centrifugada por 10 min a 2000 rpm, o sobrenadante descartado e as

células ressuspensas em 500 µl de tampão de extração [10mM Tris-HCl (pH 7,8), 5mM EDTA, 0,5% SDS].

4.2 Extração do DNA:

As amostras foram incubadas overnight (ON) com 100ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) a 37°C, sob agitação. O DNA foi então purificado utilizando-se a extração pela seqüência fenol/ clorofórmio / álcool isoamílico e precipitação com sal/ etanol e ressuspensão em 50 µl de tampão de TE [10mM Tris (pH 7,8), 1mM EDTA]. A concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro (GeneQuant RNA/ DNA Calculator – Pharmacia- Biotec) em comprimento de onda de 260 nm.

4.3 Análise de polimorfismo TNF-beta (+252 A/G):

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de primers:

5'- AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C -3' (*forward*)

3'- CCG TGC TTC GTG CTT TGG ACT A - 3' (*reverse*)

(Stuber *et al*, 1996)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 µl, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 µl de cada primer, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de Taq polymerase. As soluções foram incubadas a

95⁰C por 5 min e submetidas a 35 ciclos de 1 min e 30 s a 95⁰C, 1min e 30 s a 53⁰C e 1min e 30 s a 72⁰C e uma extensão final de 72⁰C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 782 pb.

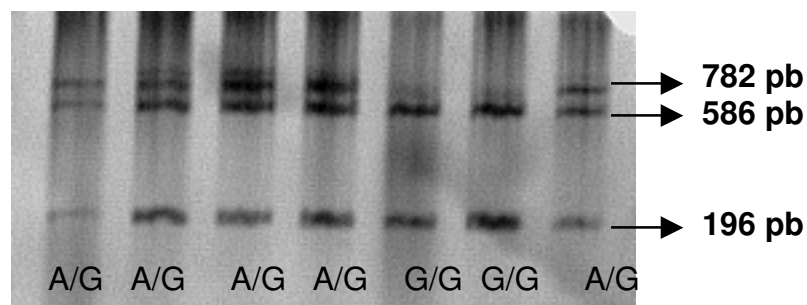
Digestão com enzima de restrição (Técnica de RFLP) (Stuber et al, 1996)

Doze microlitros do produto do PCR foram adicionados a 13 µ l de solução contendo 2,5 µ l 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM dithiotheitol, pH 7,9), 0,2 µ l *Nco* I (10.000U/mL- Invitrogen Life Technologies) e 10,3 µ l de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 37⁰C *Overnight*.

4.4 Eletroforese:

O volume total da digestão foi misturado a 3 µ l de tampão de amostra e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (não- desnaturante) sob corrente elétrica de 20 mA. Para análise, o gel foi corado pela prata.

Figura 1. *Gel de poliacrilamida, corado por prata evidenciando resultado da RFLP do gene TNF-Beta (+252 A/G).*



4.5 Análise estatística:

Para a análise estatística do polimorfismo do gene TNF-beta, a significância da diferença observada na frequência do grupo controle e com DP foi verificada pelo teste Exato de Fisher. O risco à doença associado a alelos ou genótipos foi calculado por “odds ratio” (OR) com um intervalo de confiança (CI) de 95% utilizando-se do programa SAS (v.6.11).

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas:

As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 1. Os pacientes do grupo Controle apresentaram uma média no nível de inserção clínica (CAL= 1,9 mm $\pm$ 1,3) inferior ao grupo dos pacientes com DP (7,9 mm $\pm$ 1,9), o grupo com DP apresentou maior número de dentes com mobilidade (3,5 dentes $\pm$ 4,5), enquanto o grupo Controle menor número de dentes com mobilidade (0,07 dentes $\pm$ 0,2).

5.2 Frequência alélica e genotípica:

A distribuição dos alelos e dos genótipos está apresentada na tabela 2. O alelo mais freqüente na população estudada foi o alelo A e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle x DP ($p=0,0019$) mostrando um risco relativo para os pacientes que possuíam o alelo G de 2,6 (G vs. A, OR= 2,67, 95% CI 1,45 – 4,78) mais chances de desenvolverem a DP em relação aos que possuíam o alelo A.

Em relação aos genótipos, o mais freqüente no grupo Controle foi o A/A (59%), e no grupo com DP foi o A/G (52.5%) e o menos freqüente no grupo Controle foi o G/G (2%), no grupo com DP foi também o G/G, mas com uma freqüência maior (16%), o que demonstra uma diferença estatisticamente

significativa ($p=0.0059$), sendo suficiente apenas um alelo G para mostrar um risco relativo de 3,1 (G/G + G/A vs. AA, OR= 3,1, 95% CI 1,45 – 6,65).

Tabela 2. **Freqüência dos genótipos e alelos do polimorfismo no gene TNF- β (+252 A/G)**

	Grupo com DP	Grupo Controle
	(p= 0,0059)	
Genótipos		
TNF-β G/G	13 (16%)	1 (2%)
TNF-β G/A	43 (52,5%)	17 (39%)
TNF-β A/A	26 (31,5%)	26 (59%)
Freqüência dos alelos	(p= 0,0019)	
Alelo G	42%	21,50%
Alelo A	58%	78,50%

6. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, de natureza crônica e sua patogênese é vista como uma complexa interação entre o biofilme dental, resposta do hospedeiro (aspecto genético) e modificada por fatores ambientais podendo ser influenciada por uma variedade de genes, que determinam diferentes aspectos da patologia da doença (Inagaki *et al*, 2003).

O biofilme dental é uma condição necessária para que a DP se desenvolva, embora a quantidade e as espécies bacterianas não sejam suficientes para explicar o complexo processo desta doença (Kornman *et al*, 1997). Quadros graves de DP podem ocorrer na ausência de um biofilme dental expressivo, sugerindo uma resposta inflamatória exagerada do indivíduo (Reinhardt *et al*, 1993) o que indica uma contribuição importante da resposta do hospedeiro em relação à patogênese da DP (Page 1999; Kornman and Loe, 2000).

Diferentes estudos têm demonstrado uma relação da DP com fatores genéticos. Demonstrou-se que polimorfismos nos genes da IL-1 (Kornman *et al*, 1997), IL-6 (Trevilatto *et al*, 2003) e receptor da vitamina D (Brito Junior *et al*, 2004) estão associados com um aumento no risco a periodontite crônica.

Nossos dados mostraram que pacientes com periodontite crônica apresentaram uma significativa associação do polimorfismo do gene TNF-beta (+252 A/G) com o alelo G, que apresentou maior frequência nos indivíduos do

grupo com DP em comparação com os indivíduos do grupo Controle. A presença de apenas um alelo G (G/A + G/G) na distribuição dos genótipos dos pacientes foi suficiente para levar a uma predisposição aumentada em 3 vezes nestes pacientes em relação a indivíduos que possuíam o genótipo AA. Dados que sugerem a relação do alelo G predispondo à DP.

Em estudo recente Fassmann e colaboradores (2003) avaliaram polimorfismos nos genes de TNF- α e TNF - β correlacionando com doença periodontal crônica em pacientes da República Tcheca, contudo nesse estudo a frequência do genótipo GG do TNF- β foi menor em pacientes com periodontite quando comparado aos indivíduos controle.

Nossos resultados não confirmam os achados de Fassman e colaboradores e estão coerentes com as funções já descritas de TNF β , sabe-se que TNF- β modula níveis plasmáticos de TNF- α (Stuber *et al*, 1996; Pociot *et al*, 1993), a qual é uma citocina promotora de reabsorção óssea (Lorenzo, 1991), além de possuir efeito indutivo na expressão gênica das metaloproteases da matriz, collagenases e gelatinases e serem observadas em altas quantidades em processos patológicos que incluem: a periodontite, osteoartrite, cânceres metastáticos e aneurismas (Birkedal-Hansen, 1993). A produção de TNF- α varia amplamente mesmo dentre indivíduos saudáveis e essa variação ocorre provavelmente também em resultado de polimorfismos nos genes TNF- α e TNF - β influenciarem na quantidade de TNF- α produzida após um estímulo inflamatório (Wilson *et al*, 1995), e a presença do alelo G no gene do TNF- β

demonstrou estar correlacionada com o aumento na produção de TNF- β e ativação de linfócitos (Messer *et al*, 1991).

Sendo uma citocina inflamatória, TNF- β apresenta-se com um importante papel na patogênese da aterosclerose e o SNP no alelo +252G do gene do TNF - β parece estar associado com altos níveis de Proteína Reativa - C (CRP), um marcador de risco para doença cardiovascular. (Suzuki *et al*, 2004; Ozaki *et al*, 2002).

Nos últimos 10 anos, vários estudos epidemiológicos avaliaram a associação entre infecção oral e doença sistêmica e dentre essas observações, têm sido mostrados níveis aumentados de CRP em indivíduos com doença periodontal quando comparados a controles saudáveis (Beck *et al*, 1996; Noack *et al*, 2001; D' Aiuto *et al*, 2004). Níveis de CRP também têm sido mostrados mais elevados em indivíduos portadores de doença cardiovascular comparados aos controle (Meurman *et al*, 2004). Apesar de termos selecionado indivíduos sem alterações sistêmicas para o presente estudo, consideramos importante mencionar o papel do TNF - β na patogênese de outras doenças sistêmicas e a associação destas com a doença periodontal.

Nossos resultados mostram uma correlação positiva entre a maior frequência do polimorfismo no gene TNF- β (+252 A/G) em pacientes com doença periodontal crônica, suporta a hipótese de alelos raros de citocinas inflamatórias poderem representar uma predisposição para o desenvolvimento de doenças inflamatórias de ordem sistêmica associadas com infecções como a periodontite (Page *et al*, 2000).

Considerando-se que o gene TNF- β encontra-se alojado no cromossomo 6p21, o qual faz parte do HLA (Antígeno de Leucócitos Humanos-Classe III) abrigando muitos genes imunologicamente relevantes que podem contribuir para uma resposta inflamatória, que na periodontite pode levar à perda de tecidos periodontais de suporte e, com base em nossos resultados, sugerimos que o polimorfismo no gene TNF- β (+22A/G) atua como cofator na etiopatogenese da periodontite, considerada uma doença de etiologia multifatorial envolvendo infecção oral e resposta inflamatória exacerbada em indivíduos susceptíveis.

7. CONCLUSÕES

1. O presente estudo mostrou que o alelo G presente no polimorfismo do gene TNF- β (+252A/G) está relacionado com a perda de tecidos de sustentação, aumentando o risco de perda de inserção clínica na população com doença periodontal estudada.

2. O genótipo GG ou GA do TNF- β (+252A/G) pode ser um marcador de risco quanto à susceptibilidade do indivíduo à doença periodontal crônica na população estudada.

REFERÊNCIAS

Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontol 2000**. 2002; 29: 7-10.

Amar S, Van Dyke TE, Eugster HP, Schultze N, Koebel P, Bluethmann H. Tumor necrosis factor (TNF)-induced cutaneous necrosis is mediated by TNF receptor 1. **J Inflamm**. 1995-96; 47(4): 180-9.

Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. **J Periodontol** 1996 67:1123-1137

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microb Infect**. 2000; 2: 1181-92.

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Méd**. 1996; 334: 1717 –25.

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol** . 1993; 64: 474-84.

Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**. 1997; 90(4): 589–92.

Brinkman BMN, Zuijdgeest D, Kaijzel EI. Relevance of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 promoter polymorphism in TNF-alpha gene regulation. **J Inflam.** 1996; 46: 32–41 ;

Brown I, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontology 2000.** 1993; 2: 57-71.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci.** 1975; 72: 3666–70.

D' Aiuto F, Nibali L, Mohamed Ali V, Vallance P, Tonetti MS. Periodontal therapy: a novel non-drug-induced experimental model to study human inflammation. **J Periodontal Res** 2004;39:294-299

de Brito Junior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. **J Periodontol.** 2004 Aug;75(8):1090-5.

Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. **J Periodontal Res.** 2003 Aug;38(4):394-9.

Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y. Gingival mononuclear cells from chronic inflammatory periodontal tissue produce interleukin (IL)-5 and IL-6, but not IL-2 and IL-4. **Am J Pathol.** 1993; 142: 1239-50.

Fujihashi K, YamamotoM, Hiori T, Bamberg TV, Mcghee JR, Kiyono H. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4⁺ cells isolated from inflamed human gingival tissues. **Clin Exp Immunol.** 1996; 103: 422-28.

Galbraith GMP, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y & Pandey,JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology.** 1999; 26: 705–9.

Genco RJ & Slots J. Host responses in periodontal diseases. **J Dent Res.** 1984; 63: 441-51.

Goetz FW, Planas JV, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. **Dev Comp Immunol.** 2004; 28(5): 487-97.

Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP. Lymphotoxin in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. **Nature.** 1969; 221:1155–57.

Gommerman JL, Browning JL. Lymphotoxin/ light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. **Nat Rev Immunol**. 2003; 3(8): 642–55.

Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. **Int J Clin Lab Res**. 1996; 26(3):143–59.

Herbein G, O'brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)- {alpha} and TNF receptors in viral pathogenesis. **Proc Soc Exp Biol Med**. 2000; 223(3): 241–57.

Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I Levels of Porphyromonas gingivalis Fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. **Microbiol Immunol**. 1997; 41(1): 21-6.

Holla LI, Buckova D, Fassmann A, Halabala T, Vasku A & Vacha J. Promoter polymorphism in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. **J Med Genet**. 2002; 39: 844-48.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure–function relationship(s). **Microsc Res Tech**. 2000; 50(3): 184–95.

Inagaki K, Krall EA, Fleet JC, & Garcia RI. Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. **J Periodontol**. 2003; 74: 161-67.

Johnson GK & Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status.
J Dent Educ, 2001; 65: 313-21.

Korner, H., and J.D. Sedgwick.. Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissuespecific autoimmunity.
Immunol. Cell Biol. 199674:465–472.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1997; 24(1): 72-7.

Kornman KS, Loe H. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. **Periodontol 2000.** 1993; (2): 83-97.

Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. **Eur J Immunogenet.** 2004 Oct; 31(5):207-13.

Linden GJ, Mullally BH, Freeman R. Stress and the progression of periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1996; 23: 675-80.

Lorenzo JA. The role of cytokines in the regulation of local resorption.
Crit Rev Immunol. 1991; 11: 195-213.

MacEwan DJ. TNF ligands and receptors a matter of life and death. **Br J Pharmacol.** 2002; 135(4): 855–75.

Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. **Compend Contin Educ Dent.** 2000; 21: 943-46.

Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **J Exp Med.** 1991;173:209-219.

Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. **Crit Rev Oral Biol Med** 2004;15:403-413.

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res.** 1985; 11;13(17): 6361-73.

Newton JL, Harney SMJ, Timms AE, Sims A, Rockett K, Dark C, *et al.*
Dissection of Class III Major Histocompatibility Complex Haplotypes Associated
With Rheumatoid Arthritis **Arthritis & Rheumatism**. 2004; 50(7): 2122-29.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E.
Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. **J
Periodontol** 2001;72:1221-1227.

Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of prostaglandin
E in crevicular fluid. **J Clin Periodontol**. 1981; 8: 359-67.

Ollier WE. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**. 2004
Nov 21-Dec 7;28(4-5):174-8

Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T *et al.*
Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with
susceptibility to myocardial infarction. **Nat Genet**. 2002; 32: 650 – 654.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS.
Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical
implications and future directions. **Periodontol 2000**. 1997; 14: 216-48.

Page, R. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. **J Periodont Res.** 1999; 34(7): 331-39.

Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol.** 1993 Jan;23(1):224-31.

Puzas J, Hicks D, Reynolds S, O'Keefe R. Regulation of osteoclastic activity in infection. **Meth Enzymol.** 1994; 236: 47-58.

Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1993; 20:225-31.

Rossomando EF, Kennedy JE & Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Arch Oral Biol.** 1990; 35: 431-34.

Scarel-Caminaga RM, Trevisatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in Brazilian population. **J Clin Periodontol.** 2003; 30(4): 341-45.

Schneider K, Potter KG, Ware CF, Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. **Immunol Rev.** 2004; 202: 49-66.

Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Brito RB, Line SR. Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(6): 519-23.

Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW: Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. **Immunol Ser** 1992; 56: 3– 34.

Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. **Atherosclerosis**. 2004;176(1):91-94.

Thompson MW, Mcinnes RR, Williard HF. **Thompson & thompson: Genetics in Medicine**. 5.ed. Pensilvania: Philadelphia, 1991.

Tinoco EM, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NM. *et al*. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazil population. **European Journal of Oral Sciences**. 1997; 105(1): 9-14.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Souza AP & Line SR. Polymorphism at position –174 of IL-6 gene is association with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. **J Clin Periodontol**. 2003; 30: 438-42.

Ware CF, Santee S, Glass A. Tumor necrosis factor related ligands and receptors. **The cytokine handbook**. New York: Academic Press. 1998. p. 549–92.

Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. **J Inflamm** 1995;45:1-12.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor [alpha] promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci.** 1997; 94: 3195–99.

Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. **Crit Care Med.** 1996; 24(3): 381-4.

Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. **Atherosclerosis.** 2004;176(1):91-94

ANEXOS

TRABALHO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

Polymorphism in lymphotoxin- alpha gene is associated with susceptibility to periodontal disease.

Polymorphism in lymphotoxin- alpha gene is associated with susceptibility to periodontal disease.

Vasconcelos. D.F.P.¹. Silva. M.A.D.¹; Marques. M.R.¹; Brito. R.B².; Barros. S.P.¹

¹Department of Morphology, Division of Histology, School of Dentistry at Piracicaba, University of Campinas. Brazil;

²Department of Morphology, Division of Histology, Institute São Leopoldo Mandic, Brazil;

Corresponding author:

Silvana P. Barros

sbarros@fop.unicamp.br

Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP

Av. Limeira, 901, CEP 13414-903, CP 52, Piracicaba-SP, Brazil,

Phone: +55-019-34125381

Fax: +55-019-34125218

Abstract

Background: The periodontal destruction that leads to clinical findings such as increased periodontal probing depth involves a complex interaction between invading pathogenic microorganisms and the host immune system. Lymphotoxin alpha (LT- α) is a potent multifunctional immune modulator that affects the susceptibility to a variety of immune disorders including periodontal disease.

Objective: The aim of this study was to investigate the possible association between chronic periodontitis (CP) and polymorphisms of the LT- α gene.

Materials and Methods: One hundred twenty six individuals were evaluated by measuring clinical attachment loss and divided in 44 health individuals (control group-CG) and 82 subjects with CP. DNA samples were obtained from the individual's epithelial cells through scraping of the buccal mucosa. Polymorphism in the LT- α gene was analyzed by PCR, followed by NcoI restriction endonuclease digestion (RFLP).

Results: The LT- α (+252A/G) polymorphism showed association with chronic periodontitis. Significant differences were found for the LT- α allele or carriage rate frequencies; odds ratio (OR) =2.67

Conclusions: These findings suggest the LT- α gene genotype might be a risk indicator for the susceptibility to chronic periodontal disease in the studied population.

Key words: Chronic periodontal disease, polymorphism, LT- α .

Introduction

Periodontal disease is characterized by inflammatory destruction of tissues that support the tooth, including the epithelial attachment, periodontal ligament, cementum, and alveolar bone and eventually tooth loss.

Although bacterial infection is required for periodontitis, in a subset of individuals, severe disease may occur in the absence of a large bacterial load, suggesting an exaggerated host response to a modest microbial challenge and also indicating a critical contribution of the host response to disease expression.^{1,2}

Since individual inflammatory response induced by the pathogens seems to play a critical role in the disease pathogenesis, polymorphisms in genes encoding molecules of the host defense system such as cytokines, have been targeted as potential genetic markers.³⁻⁴

The tumor necrosis factor (TNF)-related cytokines provide essential communication pathways that help orchestrate inflammatory and immune responses. TNF is involved in tissue destruction and bone resorption, and suggested as an important participant in the pathogenesis of periodontal disease.⁷

TNF was also found in high levels in crevicular fluid and periodontal tissues in individuals with periodontitis.^{8,9} The tumour necrosis factor alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine, mainly produced by monocytes, macrophages and by T and B lymphocytes¹⁰. The genetics of TNF- α has been a focus for research in infectious diseases, several polymorphisms have been identified in the TNF locus and some of them are associated with variation of TNF- α production.^{11,12} The cytokines TNF- β , also known as lymphotoxin alpha (LT- α), and TNF- α exhibit a

broad spectrum of inflammatory and immunomodulatory activities. The genes for TNF- α and LT- α are located close to each other within the human leukocyte antigen (HLA) class III gene cluster on chromosome 6p¹³. LT- α is a cytokine produced by lymphocytes and the substance LT- α mediates a wide variety of inflammatory and immunostimulatory responses.¹⁴ Although most studies of susceptibility genes for immune diseases have focused on the TNF- α , LT- α has been recently demonstrated to be associated with several immune disorders including rheumatoid arthritis¹⁵ asthma¹⁶ and, in 2002, LT- α was identified as a major risk factor for myocardial infarction (MI) in Japanese.¹⁷

The common allele of LT- α gene is TNF- β 2 and contains an adenine “A” at position 1,069 in the first intron of the LT- α gene. The rarer allele is TNF- β 1 and contains a guanine “G” at this position (approximately 70% of the human chromosomes contain an adenine “A” and 30% contain a guanine “G”). The “G” variant (TNFB1 allele) is associated with the presence of a digestion site for the DNA sequence specific restriction enzyme NcoI.¹⁸ The presence of guanine defines the mutant allele, which has been associated with higher TNF- α and LT- α .^{19,20}

The purpose of this study was to verify whether chronic periodontitis is associated with the NcoI polymorphism in intron 1 (+252A/G) of the LT- α gene in a Brazilian population.

Material and Methods

Selection of subjects

The study population represented 126 caucasian subjects from Southeastern region of Brazil. The patient population included systemically healthy unrelated subjects, non-smokers >25 years (mean 44.6) who were referred to the Dental Clinics of the Faculty of Dentistry at Piracicaba – UNICAMP (approved by the Ethical Committee in Research at FOP/UNICAMP # 76/2003). The baseline clinical parameters for the subject population are presented in Table 1. All subjects were in good general health and had at least 20 teeth in the mouth. Subjects did not have any of the following exclusion criteria: diseases of the oral hard or soft tissues except caries and periodontal disease; use of orthodontic appliances; need for pre-medication for dental treatment; chronic usage of anti-inflammatory drugs; a history of diabetes, hepatitis or HIV infection; immunosuppressive chemotherapy; history of any disease known to severely compromise immune function; present acute necrotizing ulcerative gingivitis or current pregnancy or lactation. Medical and clinical parameters were obtained by a single calibrated examiner. Diagnosis and classification of disease severity were made on the basis of clinical parameters and consisted of physical examination, probing pocket depth, clinical attachment level (CAL), tooth mobility, gingival recession and observation of bleeding on probing. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at 6 sites around each tooth. Subjects were included in clinical categories according to periodontal disease severity:

1. *Control group (CG)*: subjects found to exhibit no signs of periodontal disease as determined by the absence of (CAL) and no sites with probing depth > 3mm, together with less than 10% of sites with gingivitis upon clinical examination (n=44).

2. *Chronic Periodontitis (CP)*: formed by patients with teeth exhibiting > 5mm CAL (n=82). All patients had at least six teeth exhibiting sites CAL in at least two different quadrants.

Analysis of genetic polymorphisms

Sampling

The sampling of epithelial buccal cells was performed as described: Individuals undertook a mouthwash after 1 min, containing 5 ml 3 % glucose. Following mouthwash, a sterile wood spatula was used to scrape oral mucosa. The tip of the spatula was then shaken into the retained mouthwash solution. Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 500 µl of extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5 % SDS]. The samples were then frozen at -20°C until used for DNA extraction.²¹

DNA Extraction

After defrosted, samples were incubated overnight (O/N) with 100 ng/mL proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 37°C under agitation. DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol

precipitation. DNA was dissolved in 70 μ L TE buffer [10 mM Tris (pH 7.8), 1 mM EDTA]. The concentration was estimated by measurements of OD 260.

PCR and Restriction endonuclease digestion (RFLP)

The first intron of the TNF- β gene was amplified by PCR utilizing the following primers²²: F -5'- AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C -3'

R -5'- CCG TGC TTC GTG CTT TGG ACT A -3'

Amplification reactions were carried out with 500 ng genomic DNA in a total volume of 50 μ L, containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1mM of each primer, 20 mM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2.0 mM MgCl₂, and 2 U Taq DNA polymerase (Invitrogen Life technologies). The reactions were performed in a thermocycler and consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1min at 53°C and 1 min at 72°C, with a final extension step of 7 min at 72°C.

The products were digested with 2 U per 25 μ L reaction of Nco I at 37°C overnight. The digested fragments were separated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis. The gels were stained by the rapid silver staining method.²³ The homozygous 2 allele (AA) of the LT- α gene appears as a non-digested single 782 bp band and the homozygous 1 allele (GG) as being digested into 586 bp and 196 bp bands. Heterozygotes 1.2 exhibited all three bands – 782, 586 and 196 bp (GA).

Statistical analysis

The significance of the differences in observed frequencies of polymorphism in both groups was determined by the Fisher exact test and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Clinical characteristics and the LT- α (+252) phenotype:

The clinical parameters applied are presented in Table 1.

Distribution of inflammatory cytokine SNP in CP group and CG group:

The distribution of LT- α genotypes in CG and the CP is shown in Table 2. A significant difference was found in the LT- α genotype distribution between CG and CP. The frequency of LT- α (+252) G/G and G/A was significantly higher in CP group than in healthy controls (G/G + G/A vs. AA, $p = 0.0059$, OR = 3.1, 95% CI 1.45 – 6.65). When the allelic frequencies of individual SNP was compared, the A allele at LT- α (+252) was less frequently detected in CP group than in CG group so, the proportion of individuals carrying the LT- α G/G genotype was significantly lower in the control group (2%) than in chronic periodontitis group (16%).

The distribution of the carriage rate frequencies is showed in Table 2, significant differences were found for the LT- α allele, OR (1 vs. 2) 2.67, 95% CI 1.45 – 4.78).

Table 1 - Clinical parameters of the study population.

	Controls (n = 44)	Chronic periodontitis (n = 82)
Age (years)		
Mean $\pm$ SD (range)	39.0 $\pm$ 14.3	45.9 $\pm$ 10.3
Gender (%)		
Male	27	39
Female	73	61
Pocket probing	1.9 $\pm$ 1.3	7.9 $\pm$ 1.9
Dental mobility (tooth)	0.07 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 4.5

Table 2 - Frequencies of genotypes and alleles of polymorphism in LT- α (NcoI,+252) gene.

	Periodontitis	Controls
Genotypes (p= 0.0059)		
TNF- β G/G	13 (16%)	1 (2%)
TNF- β G/A	43 (52.5%)	17 (39%)
TNF- β A/A	26 (31.5%)	26 (59%)
Allele frequencies (p=0.0019)		
allele1-G	0.42	0.215
allele 2-A	0.58	0.785

We evaluated Hardy–Weinberg equilibrium of the distribution of genotypes in the SNP by χ^2 test for both the affected individuals and the control group, and found no significant difference ($P > 0.01$)

Discussion

The data reported in this study showed that patients with severe periodontitis presented a significant association with the carriage of the rarer TNF- β 1 allele that was higher in the periodontal patients compared to controls.

The presence of the TNF- β 1 allele has been showed to correlate to increased production of LT- α in activated T lymphocytes¹⁹ and with a significant role in inflammatory mechanisms of local autoimmune reactions and susceptibility to inflammatory diseases.

There are evidences correlating the levels of inflammatory markers to periodontal infections²⁴ where differential functional cellular activities may suggest the existence of an altered cellular immune mechanism for the susceptibility to periodontal disease.

A recent report²⁵ has assessed polymorphisms in the TNF- α and LT- α genes evaluating the influence of the LT- α +252 in chronic periodontitis, however the frequency of the LT- α +252 presented was lower in Czech patients with chronic periodontitis compared to controls.

TNF- α production varies widely even between healthy persons. This variation occurs also because polymorphisms of the TNF- α and LT- α genes influence the amount of TNF- α produced after an inflammatory stimulus.²⁶ The present data showing positive association between the higher frequency of LT- α +252 polymorphism in chronic periodontitis patients, supports the hypothesis that individual's genotypes carrying rare alleles of specific cytokine genes may represent a predisposition for developing systemic disorders associated with chronic infections like periodontitis.

LT- α as a proinflammatory cytokine, has also been showed to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and, SNP at LT- α +252G allele was found to be associated with high C-reactive protein levels, an inflammatory biomarker, predictor of future risk for cardiovascular disease.^{17,27}

In the last ten years, several epidemiological studies have assessed the association between oral infection and systemic disease and amongst the observations, it has been presented statistically significant increases in CRP levels in subjects with moderate to severe periodontitis when compared with periodontal healthy²⁸⁻³⁰ and CRP levels were also reported to be higher in cardiovascular disease (CVD) patients with severe periodontitis than in healthy cases.³¹

Considering that the genes for TNF- α and LT- α are located on chromosome 6p21, which harbors many immunologically relevant genes in the HLA class III region, we suggest that LT- α +252 locus plays a role as a cofactor in the etiopathogenesis of periodontitis, a disease of multifactorial etiology involving mixed infection and exacerbated inflammatory response in susceptible individuals.

Acknowledgement: The authors would like to thank Professor Enilson Sallum and the Periodontology Division in the School of Dentistry at Piracicaba for the collaboration in the selection of the patients for this study.

References

1. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:225-231.
2. Kornman KS, Löe H. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1993;2:83-97.
3. Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet* 2004;31:207-213.
4. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:705-709.
5. Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K. Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:463-469.
6. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB Jr, Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003;30:341-345.
7. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216-248.
8. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990;35:431-434.
9. Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I. Levels of Porphyromonas gingivalis Fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult

human

subjects.

Microbiol Immunol 1997;41:21-26.

10. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser* 1992;56:3-34. Review.
11. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995;46:32-41.
12. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3195-3199.
13. Schneider K, Potter KG, Ware CF. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev* 2004;202:49-66.
14. Bazzoni F, Beutler B. A controlled trial of an educational program to prevent low back injuries. *N Engl J Med* 1997;337:322-328.
15. Newton JL, Harney SM, Timms AE, Sims AM, Rockett K, Darke C, Wordsworth BP, Kwiatkowski D, Brown MA. Dissection of class III major histocompatibility complex haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2122-2129.
16. Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28:578-584.
17. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002;32:650-654.
18. Tabrizi AR, Zehnbauser BA, Freeman BD, Buchman TG. Genetic markers in sepsis. *J Am Coll Surg* 2001;192:106-117.
19. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991;173:209-219.

20. Abraham LJ, French MA, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 1993;92:14-18.
21. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:6-9.
22. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384.
23. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:914-921.
24. Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ. Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2005;40:53-58.
25. Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontal Res* 2003 ;38:394-399.
26. Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* 1995;45:1-12.
27. Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. LTA 252G allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. *Atherosclerosis*. 2004;176(1):91-94.
28. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 1996;67:1123-1137.
29. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72:1221-1227.
30. D' Aiuto F, Nibali L, Mohamed Ali V, Vallance P, Tonetti MS. Periodontal therapy: a novel non-drug-induced experimental model to study human inflammation. *J Periodontal Res* 2004;39:294-299.
31. Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:403-413.

32. Machulla HK, Stein J, Gautsch A, Langner J, Schaller HG, Reichert S. HLA-A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol* 2002;29:573-579.
33. Katz J, Goultschin J, Benoliel R, Brautbar C. Human leukocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressing periodontitis. *J Periodontol* 1987;58:607-610.