

Rui Barbosa de Brito Junior

***ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES
DO RECEPTOR CD14, RECEPTOR DE VITAMINA D
(VDR) E HLA-DRB1 E
DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA***

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Buco-Dental, área de
Histologia.

***Piracicaba
2003***

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Rui Barbosa de Brito Junior

***ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES
DO RECEPTOR CD14, RECEPTOR DE VITAMINA D
(VDR) E HLA-DRB1
E DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA***

Este exemplar foi devidamente corrigido.
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 021/10/03

Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de Histologia.

Orientadora: Profa. Silvana Pereira Barros

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silvana Pereira Barros

Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Profa. Dra. Maria Ângela Naval Machado

Profa. Dra. Magda Feres

Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Suplentes:

Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo

Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

***Piracicaba
2003***

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	B777a
V	EX
TOMBO BC/	56694
PROC	16/117104
C	☐
D	☒
PREÇO	22,00
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CM00193216-9

BIBID. 308 789

Ficha Catalográfica

B777a Brito Junior, Rui Barbosa de.
 Associação entre polimorfismos nos genes do receptor CD14, receptor de vitamina D (VDR) e HLA-DRB1 e doença periodontal crônica. / Rui Barbosa de Brito Junior. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 xi, 92f. : il.

Orientadora : Profª Drª Silvana Pereira Barros.
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Genética. 2. Periodontite. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Biologia molecular. I. Barros, Silvana Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Agosto de 2003, considerou o candidato RUI BARBOSA DE BRITO JUNIOR aprovado.

1. Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS _____

2. Profa. Dra. PAULA CRISTINA TREVILATTO _____

3. Profa. Dra. MARIA ÂNGELA NAVAL MACHADO _____

4. Profa. Dra. MAGDA FERES _____

5. Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM _____

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

"Naquele dia, dir-se-á em Jerusalém:
 'Não temas, Sião!
 Não se enfraqueçam os teus braços!
 O Senhor teu Deus está no meio de ti
 Como herói Salvador!
Ele anda em transportes de alegria por causa de ti,
 E te renova seu amor.
 Ele exulta de alegria a teu respeito
Como num dia de festa'." (Sof.3, 16-18)

 "Vou ficar de sentinela,
 e postar-me sobre a trincheira;
vou espreitar o que vai me dizer o Senhor,
 e o que ele vai responder ao meu pedido.
 E o senhor respondeu-me assim:
 'Escreve esta visão, grava-a em tabuinhas,
 para que ela posso ser lida facilmente;
 porque há ainda uma visão para um termo fixado,
ela se aproxima rapidamente de seu termo e não falhará.
 Mas, se tardar, espera-a,
Porque ela se realizará com toda a certeza e não falhará. Eis que sucumbe o que não tem a alma
 íntegra, mas o justo vive por sua fidelidade'".
 (Hab. 2, 1-4)

DEDICATÓRIA

*A Deus e a meus Pais,
Graça e Rui, sem os
quais nada disso seria
possível.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À Profa. Dra. Silvana Pereira
Barros, pela orientação baseada
em confiança e liberdade e com
quem aprendi que elogios muitas
vezes são mais construtivos que
duras críticas.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP, pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. Thales Rocha, diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. Lourenço Sobrinho Correr, Coordenador Geral dos Programas de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, do Departamento de Prótese e Periodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, do Departamento de Diagnóstico Oral, área de Patologia e Semiologia da FOP/UNICAMP, a quem devo meus primeiros passos na vida acadêmica e científica.

À Profa. Dra. Magda Feres, da Universidade de Guarulhos, pelo estímulo involuntário.

A Paula Cristina Trevilatto, pela amizade incondicional e ensinamentos pessoais e científicos que levarei guardados por toda vida.

À Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga e Ana Paula de Sousa Pardo pela amizade dentro e fora do laboratório.

À Silvana Passeto, que esteve ao meu lado em momentos felizes e de incertezas.

À amiga Flávia Martão Flório, pela afinidade e eterna e duradoura amizade.

A Emerson Scapin, quem me ensinou o verdadeiro significado da palavra respeito.

À amiga Hannah Carmen Carlos Ribeiro Silva, que continuou sempre presente apesar da longa distância.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, exemplo de seriedade e dedicação científica.

A todos os demais professores do Departamento de Morfologia, especialmente aos docentes da área de Histologia, Profª. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, Prof. Dr. José Merzel.

À Eliene, Cidinha, Suzete, Valquíria, Ivani e Joelma, meu agradecimento pelo agradável convívio diário.

Aos amigos do Programa de Biologia Buco-Dental, pelo tempo que convivemos.

À Érica, secretária da Pós-Graduação, pelos esclarecimentos cabíveis a qualquer tempo.

Aos amigos: Cláudio Sanches, Érica Goulart, Flavinha Novaes, Flávio Hideo, Renato Junque. Mesmo distantes do âmbito profissional, vocês de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP), pelo patrocínio oferecido através de Bolsa de Doutorado (00/04487-1) e Auxílio Pesquisa (01/13998-2).

A todos que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser finalizado.

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUÇÃO	3
4. REVISÃO DA LITERATURA	5
4.1. DOENÇA PERIODONTAL	5
4.2. CD14	6
4.3. RECEPTOR DA VITAMINA D (VDR)	8
4.4. HUMAN LEUCOCYTES ANTIGENS – HLA	10
5. PROPOSIÇÃO	13
6. MATERIAL E MÉTODOS	14
6.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA	14
6.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL	15
6.3. EXTRAÇÃO DO DNA	15
6.4. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO PROMOTOR DO GENE DO CD14	16
– C(-260)T	
6.5. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO PROMOTOR DO GENE DO CD14	17
(Ava II)	
6.6. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DO VDR (<i>Bsm</i> I)	18
6.7. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DO VDR (<i>Taq</i> I)	20
6.8. ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE HLA-DRB1	21
6.9. ELETROFORESE	23
6.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
7. RESULTADOS	25
8. DISCUSSÃO	33
9. CONCLUSÕES	40
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
11. ANEXOS	59
11.1 ARTIGO 01	60
11.2 ARTIGO 02	79
11.3 COMITÊ DE ÉTICA	92

1. RESUMO

A periodontite crônica, uma das maiores causas de perda dental em adultos, é caracterizada por inflamação dos tecidos periodontais provocada principalmente por infecção bacteriana subgengival gram negativa anaeróbica. Respostas celulares na periodontite são mediadas, em parte, por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), que ativam monócitos a expressar citocinas e fatores de crescimento via receptor de LPS (CD14). Polimorfismos genéticos no receptor da vitamina D (VDR) estão associados a parâmetros da homeostasia óssea e com doenças nas quais perda óssea representa um sinal cardinal, incluindo doença periodontal. A suscetibilidade a algumas doenças imunes e/ou infecciosas pode ter aspectos genéticos associados ao Leucócito de Antígeno Humano (HLA), que é essencial no reconhecimento de antígenos na resposta imune humoral. O objetivo deste estudo foi determinar se a doença periodontal crônica está associada a polimorfismos no promotor do gene CD14, do gene VDR e do gene HLA-DRB1. O DNA foi obtido a partir de células epiteliais bucais de indivíduos divididos em: indivíduos saudáveis (grupo controle), pacientes com periodontite moderada e indivíduos com periodontite severa. Os polimorfismos foram analisados por PCR, seguido de digestão com enzima de restrição (RFLP). Os produtos foram analisados em gel de poliacrilamida a 10% e corados por prata. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) nas frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes do HLA-DRB1 e VDR entre o grupo controle e grupos com doença periodontal. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos polimorfismos do gene do receptor do CD14. Concluímos que os polimorfismos estudados nos genes HLA-DRB1 e VDR estiveram associados com a periodontite crônica na população analisada. Os polimorfismos estudados no gene do CD14 não se associaram a periodontite crônica na população estudada.

2. ABSTRACT

Chronic periodontitis, which is the major cause of tooth loss in adults, is characterized by a chronic inflammation of the periodontal tissues mainly caused by an infection of subgingival gram negative anaerobic bacteria. Cellular responses in periodontitis are mediated, in part, by bacterial lipopolysaccharides (LPS), which activates monocytes to express cytokines, growth factors and procoagulatory mediators via the LPS receptor CD14. Genetic polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene are associated to parameters of bone homeostasis and with diseases in which bone loss is a cardinal sign, including periodontal disease. The susceptibility to some diseases with immune and/or infectious aspects may have a genetic association with Human Leukocyte Antigen (HLA), which is essential in the recognition of antigens in humoral immune response. The aim of this study was to determine whether PD is associated with a polymorphism in the promoter of CD14 gene, VDR gene and HLA-DRB1 gene. DNA was extracted from buccal epithelial cells of unrelated adult individuals divided in: healthy individuals (control group), patients with moderate periodontitis and with severe periodontitis. The polymorphisms were analyzed by PCR technique, followed by restriction digestion (RFLP). The products were analyzed in 10% polyacrylamide gel electrophoresis and stained by rapid silver staining method. Significant differences in the allele and genotype frequencies of the polymorphism of the HLA-DRB1 and VDR gene ($p<0.05$) were found between control and groups with periodontal disease. There were no significant differences among groups for the CD14 gene ($p>0.05$). We concluded that the polymorphisms of the HLA-DRB1 gene and VDR gene studied were associated with the disease in this population and that the polymorphism of the CD14 gene was not associated with the disease.

3. INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, a capacidade de cicatrização e regeneração dos tecidos prevalece sobre a destruição por eventuais lesões (PAGE & KORNMAN, 1997), entretanto a doença periodontal (DP) humana é um exemplo no qual isto não ocorre freqüentemente, e a destruição dos tecidos, com a continuidade ou recorrência da doença, é perpetuada a ponto de se resolver com a formação de um abscesso e perda do dente como resultado final (PAGE & KORNMAN, 1997). Estudos mostram que a doença pode ser mais agressiva se aspectos específicos do mecanismo de defesa do hospedeiro forem mais expressos, aspectos estes regulados por fatores intrínsecos (genéticos) (HART, 1996; HASSEL, 1995) e/ou induzidos por fatores ambientais (nicotina) (SEYMOR, 1991). Apesar de análises investigativas sobre o modo de segregação da herança da DP suportarem a hipótese de esta doença ser hereditária (BOUGHMAN et al., 1990; MARAZITA, 1994), tentativas para identificar o gene de maior efeito para DP não têm produzido resultados consistentes (CRPD, 1996). Informações e conhecimentos sobre a base celular e molecular podem enriquecer o conhecimento sobre a patogênese da DP, com detalhes sobre os mecanismos de acometimento da doença.

Mesmo havendo poucos dados referentes à atividade do receptor CD 14 na doença periodontal, acreditamos que esta seja de relevante importância no início do processo da doença periodontal, no recebimento da informação sobre a instalação de bactérias periodontopatogênicas mediada pela proteína de ligação ao LPS.

O receptor da vitamina D apresenta funções relacionadas à densidade e *turnover* ósseos, o que, em última análise, influenciará nos níveis de reabsorção alveolar durante o processo da doença.

A susceptibilidade a algumas doenças infecciosas mostram uma associação genética com o gene - Human Leukocyte Antigen (HLA), moléculas das células apresentadoras de antígenos que têm um papel na iniciação das respostas imunes antígeno-específicas. As moléculas classe II de HLA são especialmente relevantes à resposta imune no reconhecimento de antígeno estranho por levar à ativação da célula T CD4⁺ via receptor de célula T ao formar um complexo com um peptídeo antigênico e apresentando-o a célula T.

Desde que o complexo HLA tem papel crítico na resposta imune, seu envolvimento no reconhecimento de antígenos de patógenos associados à doença periodontal tem sido considerado. Contudo dados envolvendo DP e HLA ainda permanecem não conclusivos.

Numa etapa em que a resposta do hospedeiro é foco de atenção na compreensão da patogênese e etiopatologia da doença periodontal, faz-se relevante o estudo de polimorfismos em genes relacionados ao mecanismo da doença.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 DOENÇA PERIODONTAL

As doenças periodontais (DP) compreendem um grupo de infecções que causam perda irreversível dos tecidos de suporte dos dentes. Estudos epidemiológicos indicam que esta doença está generalizada na população mundial (BROWN & LOE, 1993; DINI et al., 1994; TINOCO et al, 1997). Características individuais mostram consideráveis diferenças na suscetibilidade e severidade da doença periodontal (PAGE, 1999). Há citações indicando que fatores genéticos respondem por mais de 50% da suscetibilidade dos indivíduos à DP (PAGE, 1999), entretanto poucos estudos genéticos têm sido realizados buscando esta associação.

Durante as décadas de 70 e 80 vários estudos visaram elucidar a natureza da infecção na doença periodontal humana. Desde os anos noventa tem-se demonstrado que, apesar de a presença das bactérias ser essencial para que a doença se instale, esta não tem sido um fator suficiente na manifestação da DP crônica (KORNMAN et al, 1997). Fatores de risco, como a resposta do hospedeiro e a influência de agentes como o tabaco ou má higienização, podem determinar o modo de progressão da DP e se equiparar à influência das bactérias na determinação da severidade clínica. Estas observações têm mudado a idéia sobre a patogênese, prevenção e tratamento da DP (JOHNSON et al, 2001; PAGE, 1999). Muitas investigações têm sido feitas avaliando o modo como as bactérias periodontopatogênicas licitam a formação de bolsas periodontais convertendo epitélio juncional em epitélio de bolsa, provocando assim a destruição do ligamento periodontal e tecidos circundantes da gengiva e osso alveolar (PAGE & KORNMAN, 1997). Considera-se também que as bactérias podem levar à destruição dos tecidos de forma indireta, e isto

ocorre pela a ativação de vários componentes do sistema imunológico de defesa do hospedeiro (PAGE & KORNMAN, 1997).

Estudos recentes têm analisado polimorfismos em genes de mediadores pró-inflamatórios (reguladores da resposta inflamatória), como os reguladores da intensidade da resposta do hospedeiro ou do risco à doença periodontal, como as citocinas interleucina-1 (IL-1) α e β (KORNMAN et al., 1997; DIEHL, et al., 1999; MACGUIRE et al., 1999), IL-6 (TREVILATTO et al., 2003), IL-4 (SCAREL-CAMINAGA et al., 2003), metaloproteinase 1 - MMP-1 (SOUZA et al., 2003), IL-2 (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002), fator de crescimento tumoral B1 – TGF-B1(SOUZA et al., 2003), receptor de vitamina D (VDR) (HENNIG et al., 1999) o fator de necrose tumoral (TNF) α e os genes classe II do complexo de histocompatibilidade principal (HLA), envolvidos na patogênese da doença e são apontados como agentes de risco à progressão da DP (TAKASHIBA et al., 1999).

4.2 CD14

A molécula CD14, descrita como o principal receptor de endotoxinas, é um dos receptores que atuam no reconhecimento de lipopolisacarídeos (LPS, endotoxinas) e gram positivos ou componentes da parede celular de micobactérias, e desta maneira podem iniciar a resposta imune à invasão bacteriana (WRIGHT, et al. 1990; ANTAAL-SZALMAS, 2000). O CD14 é expresso primariamente na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos gengivais (mCD14) (SUGAWARA, 1998).

O CD14 é uma glicoproteína de 55 kD, identificada como um receptor para lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) (WRIGHT et al., 1990). Foi identificado por anticorpos monoclonais com seletividade para monócitos e macrófagos humanos, usado

como marcador de células identificadoras destas linhagens celulares. Em adição, granulócitos ativados também são capazes de expressar o CD14. Os LPS bacterianos são os principais componentes da membrana externa de bactérias gram-negativas. Estes consistem de uma cadeia específica, com um oligossacaríde central e um componente lipídico, denominado lipídio A (RIETSCHEL et al., 1994). As células imunes do hospedeiro reconhecem o total de LPS e rapidamente aumentam os mecanismos de defesa inflamatória. Entretanto, uma resposta exacerbada pode induzir a uma grande liberação de citocinas conduzindo a um choque séptico (SCHÜTT, 1999).

Além do papel do CD14 na defesa do hospedeiro, várias outras funções biológicas têm sido encontradas. O CD14 está envolvido na fagocitose de bactérias gram negativas (GRUNWALD et al., 1996), na reabsorção óssea mediada por LPS (AMANO et al, 1997), e nas interações entre monócitos e células endoteliais. Além disso, mudanças na expressão de CD14 e níveis séricos de CD14 parecem estar associados com vários estados patológicos, incluindo a doença periodontal (HAYASHI et al, 1999).

A produção de CD14 é geneticamente regulada. O gene do receptor CD14 está no cromossomo 5 (região q23-21), consiste de aproximadamente 3900 pares de bases organizadas em 2 exons e codifica uma proteína de 375 amino ácidos rica em leucina (FERRERO et al, 1988). A proteína madura é expressa como uma molécula de superfície celular ancorada à glicosil-fosfatidinositol (GPI), com domínio transmembrana ausente (SCHÜTT, 1999). Muitos grupos de pesquisadores têm procurado definir o sítio de ligação do CD14 ao LPS. Os resultados são variáveis e dependem do método utilizado. Apenas mutações dos aminoácidos 39-44, dentre vinte e três substituições mutantes nos aminoácidos 1-152 de CD14 humanos, resultaram em perda de ligação ao LPS (STELTER, 1997). Na região promotora do gene do CD14, uma transição de C para T foi identificada

na posição -159 aquém do sítio de início da transcrição. Esta substituição está próxima a um sítio de ligação SP1, que tem muita influência na expressão de CD14 de monócitos específicos, e próxima a um sítio de proteína ligante CCAAT/*enhancer* que pode ter um importante papel na ativação do promotor do gene CD14 durante o desenvolvimento monocítico (ZANG et al., 1994; PAN et al., 1999).

Recentes observações sugerem que indivíduos homozigotos TT para este gene apresentam um significativo aumento na densidade de CD14 no monócito sanguíneo e aumento nos níveis séricos de CD14 (sCD14), quando comparados com aqueles que apresentam genótipos CT ou CC (HUBACEK et al., 1999; BOLDINI et al., 1999). Recentemente, quatro SNPs (polimorfismos de única base) adicionais a 2 kb de sítios iniciadores de transcrição, nas posições -1619, -1359, -1145 e -809, foram sendo identificados (BALDINI et al., 2000). Indivíduos que carregam alguns haplótipos específicos para esses SNPs têm um aumento de sCD14 (VERCELLI et al., 2001). Estes achados sugerem que alguns genótipos de CD14 sejam relevantes em condições nas quais níveis de CD14 estão aumentados, como na periodontite (HAYASHI et al., 1999).

Considerando os dados previamente reportados, a análise de polimorfismos no promotor do gene do CD14 em pacientes com doença periodontal crônica torna-se interessante.

4.3 RECEPTOR DA VITAMINA D (VDR)

As vitaminas são substâncias orgânicas importantes para funções essenciais à maioria das formas de vida. Porém, alguns organismos são incapazes de sintetizá-las, e assim necessitam obtê-las, em microquantidades, de fontes externas. A vitamina D, lipossolúvel, é formada a partir do 7-desidrocolesterol quando a pele é exposta à luz do sol

(BJORN, 2000; ALAGOL, 2000), sendo o maior precursor biológico de 1,25-diidroxicolecalciferol (calcitriol), substância com ação hormonal, reguladora do metabolismo de Ca^{2+} no intestino, ossos e rins (CARLBERG, 1999). Acredita-se que o calcitriol fixa-se aos receptores que ativam a síntese das proteínas de transporte de cálcio e fósforo (DE LUCA, 1985).

A vitamina D exerce duas ações opostas sobre o osso, dependendo dos níveis plasmáticos de cálcio, em condições de hipocalcemia, o calcitriol colabora com o paratormônio na reabsorção de cálcio e fósforo do osso para manter níveis adequados de Ca^{2+} no sangue. Ainda não é claro como é mediada a função reabsortiva. Alguns estudos sugerem que a vitamina D estimula a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. A vitamina D também é necessária para a mineralização normal da cartilagem epifisária e da matriz osteóide (HOLTROP, 1981).

A densidade mineral óssea é influenciada por vários fatores, como uma dieta rica em cálcio, atividade física e também determinantes genéticos (TAGLIABUE et al., 1999). Como a vitamina D é importante no metabolismo de cálcio e na troca óssea, tem-se sugerido que polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR) participam como um determinante significativo da modificação óssea (MORRISON, et al., 1994; HENNIG et al. 1999; KURABAYASHI, 1999; TAGLIABUE et al., 1999).

Uma característica importante de doenças periodontais é a perda de osso alveolar. Estudos recentes sugerem que osteopenia pode ser um fator de predisposição para doença periodontal por aumentar a suscetibilidade aos efeitos da DP, como a perda óssea alveolar. A etiologia de osteopenia generalizada é multifatorial e envolve um número de fatores de risco estabelecidos para DP, como: idade, fumo, menopausa, gênero, e certos medicamentos (JEFFCOAT, et al, 1993; MOHAMMAD et al, 1994).

Polimorfismos em genes que codificam mediadores da homeostasia óssea têm sido associados a parâmetros de densidade mineral óssea e incidência de desordens comuns ao metabolismo ósseo, em particular a osteoporose (GROSS et al, 1996; MORRISON et al, 1997). O pico de massa óssea, um dos principais determinantes da densidade óssea, parece ser geneticamente herdado. Alguns autores (MORRISON et al., 1992; MORRISON et al., 1994) mostraram que polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR) pode ser um marcador para esta herança e que sua genotipagem pode apresentar indicativos para a predisposição de baixa massa óssea.

É importante notar que a doença periodontal e o desenvolvimento de osteopenia/osteoporose têm mecanismos patológicos comuns envolvendo ruptura da homeostasia óssea. Portanto, é razoável hipotetizar que essas alterações podem compartilhar fatores de risco genéticos (HENNIG et al, 1999; HART, 1996). O desenvolvimento de doenças específicas pode depender da coincidência de determinantes genéticos múltiplos com elementos ambientais específicos, que na doença periodontal corresponde a determinados tipos de bactérias orais (TREVILATTO et al., 2002).

Polimorfismos genéticos no receptor da vitamina D (VDR) estão associados a parâmetros de homeostasia óssea e com doenças nas quais perda óssea representa um importante sinal cardinal (HENNIG et al., 1999). Como a perda óssea progressiva é um resultado da DP, torna-se interessante estudar a possível associação entre polimorfismos no gene do VDR e doença periodontal.

4.4 ANTÍGENOS DE LEUCÓCITOS HUMANOS - HLA

HLA (*Human Leucocytes Antigens*) também chamado complexo de histocompatibilidade principal está localizado no cromossomo 6. Esse complexo é composto

de 4 loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, que codificam os determinantes da classe I, e o HLA-D, que codifica determinantes da classe II. O HLA-D consiste de HLA – DR, HLA – DQ e HLA- DP e contém genes da resposta imune. Os genes classe II do complexo de histocompatibilidade principal codificam uma série de glicoproteínas de superfície celular altamente polimórficas. Moléculas de HLA-DR estão presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, e têm um papel central na apresentação de antígenos às células T (linfócitos T helper), estas células apresentam um receptor CD4 e estão envolvidas na regulação da resposta imune humoral e celular (BONFIL et al, 1999).

Genótipos de HLA parecem estar envolvidos em reações imunes que induzem destruição tecidual em doenças auto-imunes infecciosas. Após uma defesa não específica pelos neutrófilos, a bactéria é fagocitada e digerida por monócitos/macrófagos e apresentada para as células CD4⁺ T helper. Os componentes bacterianos são quebrados em pequenos peptídios que são ligados a territórios variados do HLA através de âncoras de aminoácidos que são dependentes da afinidade entre o antígeno e a molécula de HLA. Esta capacidade de ligação depende da seqüência de aminoácidos da molécula de HLA envolvida, que é específica para cada genótipo de HLA. Após este evento, células CD4⁺ T helper são ativadas, se proliferam e mediam a seqüência de passos da reação imune. Portanto, a molécula de HLA tem um importante papel na iniciação na resposta imune específica de doenças infecciosas (TAKASHIBA et al, 1999).

Recentemente têm surgido evidências de que a susceptibilidade à infecção microbiana é em parte determinada por uma predisposição genética (HART, 1996). É bem estabelecido que a doença periodontal crônica, que é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dentais, e que pode resultar em perda do dente, tem uma etiologia microbiana e que o biofilme placa dental tem papel fundamental no processo inflamatório

(SOCRANSKY, 1999). O complexo HLA pode estar envolvido no reconhecimento de antígenos de patógenos da doença periodontal, uma vez que antígenos classe II foram identificados em células de Langerhans de tecido gengival (WALSH, 1986). As células de Langerhans têm sido correlacionadas com a presença de patógenos específicos na periodontite (SAGLIE, 1987).

Desde que o complexo HLA apresenta papel crítico na resposta imune, tem sido considerado seu envolvimento no reconhecimento de antígenos de patógenos na doença periodontal. Contudo os dados envolvendo DP e HLA ainda permanecem não conclusivos (TAKASHIBA et al, 1999).

Estas evidências nos levaram a investigar o papel das moléculas classe II do HLA, no caso DRB1, no desenvolvimento e/ou severidade da doença periodontal. Informações e conhecimentos sobre a base celular e molecular podem enriquecer o conhecimento sobre a patogênese da DP, com detalhes sobre os mecanismos de acometimento da doença, o que pode auxiliar nos critérios de diagnóstico, prevenção e tratamento da doença.

5. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar a possível associação entre a Doença Periodontal Crônica e polimorfismos em genes do receptor da Vitamina D (VDR), do receptor CD14 e do HLA-DRB1.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA:

Uma amostra de 113 pacientes, não fumantes e com idade superior a 25 anos (média de 42,3 anos), foram recrutados para o estudo dentre os pacientes atendidos na Clínica de Tratamento Odontológico da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Todos os pacientes foram provenientes da cidade de Piracicaba – SP (Região Sudeste do Brasil). As características clínicas da população estudada estão apresentadas na tabela 1. Todos os pacientes apresentavam boa 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 compromettesse a função imunológica, presença de gengivite úlcero necrozante; gravidez ou lactação. Os pacientes foram submetidos a uma completa anamnese e assinaram o termo de consentimento para participação em pesquisa (aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FOP/UNICAMP, protocolo nº 43-A/2000) (ANEXO 01).

O diagnóstico e a classificação da doença periodontal 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. Informações sobre a profundidade à sondagem e nível de inserção clínica foram realizadas por 3 examinadores previamente

calibrados e compreendiam a medida de 6 pontos ao redor de cada dente. Os pacientes foram classificados de acordo com a severidade da doença periodontal crônica:

Grupo Controle: pacientes com ausência de perda de inserção clínica e nenhum dente com profundidade de sondagem > 3 mm (n=44);

Periodontite Moderada: pacientes com dentes exibindo CAL ≥ 3 mm e < 7 mm (n=31)

Periodontite Severa: pacientes com dentes exibindo CAL ≥ 7 mm (n=38).

Na análise dos polimorfismos dos genes do VDR, o Grupo Controle foi mantido, entretanto os grupos Periodontite Moderada e Periodontite Severa foram unidos gerando o seguinte grupo:

Doença Periodontal: pacientes exibindo CAL ≥ 3 mm (n=69)

6.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL:*

O DNA foi extraído a partir de células epiteliais da mucosa bucal obtidas através de um 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-bochada (TREVILATTO & LINE, 2000). Esta solução foi centrifugada por 10 min a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de tampão de extração [10mM Tris-HCl (pH 7,8), 5mM EDTA, 0,5% SDS].

6.3 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 era então purificado utilizando-se a extração pela sequência fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e

precipitação com sal/etanol. O DNA foi ressuspenso em 70 µL de tampão TE [10 mM Tris (ph 7,8), 1mM EDTA]. A concentração do DNA foi estimada em espectofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator – *Pharmacia-Biotec*) em comprimentos de onda de 260 nm.

6.4 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO PROMOTOR DO GENE DO RECEPTOR CD 14 C(-260) → T(561 PB) (U00699)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de primers:

5'- TTGGTGCCAACAGATGAGGTTCAC - 3' (*foward*)

3'-TTCTTTCCTACACAGCGGCACCC - 5' (*reverse*)

(HUBACEK et al., 1999)

A PCR foi realizada com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1µM de cada primer, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de Taq polymerase. As soluções foram incubadas a 95°C por 2 min e submetidas a 35 ciclos de 55s a 94°C, 1min a 63°C e 1 min a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 561 pb (Figura 04).

Digestão com enzima de restrição (técnica de RFLP) (HUBACEK et al., 1999)

Doze micro litros do produto da PCR foram adicionados a 13 µL de solução contendo 2,5 µL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,2 µL *HaeIII* (10.000 U/mL - New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) e 10,3 µL de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 37°C *O/N*.

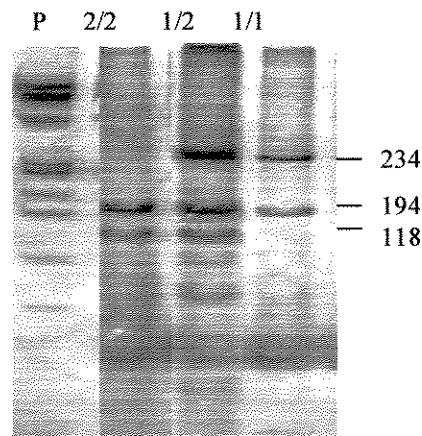


Figura 01. Gel de Poliacrilamida, corado por prata evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor CD14 – C(-260) →T. Paciente paciente heterocigoto (1/2), paciente homocigoto para o alelo 2 (2/2) e padrão de peso molecular (P).

6.5 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO PROMOTOR GENE DO RECEPTOR CD 14

(*Ava II*) (U0069)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de primers:

5'- TCCTATAAGTCCCTGAACCTA -3' (*foward*)

5'- GGTCTAGGAGGCCCAT- 3' (*reverse*)

A PCR foi realizada com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 µM de cada primer, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de *Taq* polymerase. As soluções foram incubadas a 95°C por 4 min e submetidas a 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 61°C e 1 min a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 633 pb.

Digestão com enzima de restrição (técnica de RFLP)

Doze micro litros do produto da PCR foram adicionados a 13 µL de solução contendo 2,5 µL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol,

pH 7,9), 0,4 µL *Ava II* (10,000 U/ml - New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) e 10,1 µL de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 37°C ON.

O RFLP foi criado pela transição de uma única base -310 (G→ X) na região de promotor do gene do receptor CD 14 quando este foi exposto à enzima de restrição *Ava II*. Os alelos foram designados "1" (ausência de sítio para *Ava II*, mantendo o fragmento de 633 pb) e "2" (presença do sítio para *Ava II*, formando um fragmento com 297 pb e outro com 336 pb) (Figura 05).

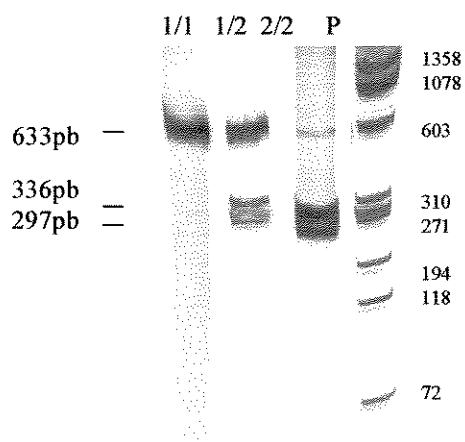


Figura 02. Gel de Poliacrilamida, corado por prata evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor CD14 – *Ava II*. Paciente homozigoto para o alelo 1 (1/1), paciente heterozigoto (1/2), paciente homozigoto para o alelo 2 (2/2) e padrão de peso molecular (P).

6.6 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DO VDR (*BsmI*)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de *primers*:

5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA -3' (*foward*)

5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG - 3' (*reverse*) (RAUCH et al, 1997)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL , contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μM de cada primer, 200 μM de dNTPs e 2 unidades de *Taq* polimerase. As soluções foram incubadas a 95°C por 2 min e submetidas a 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 63°C e 1,5 min a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado continha 872 pb (Figura 01).

Digestão com enzima de restrição (Técnica de RFLP)

Doze micro-litros do produto da PCR foram adicionados a 13 μL de solução contendo 2,5 μL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,2 μL *BsmI* (5,000 U/mL - New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) e 10,3 μL de H_2O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 65°C ON.

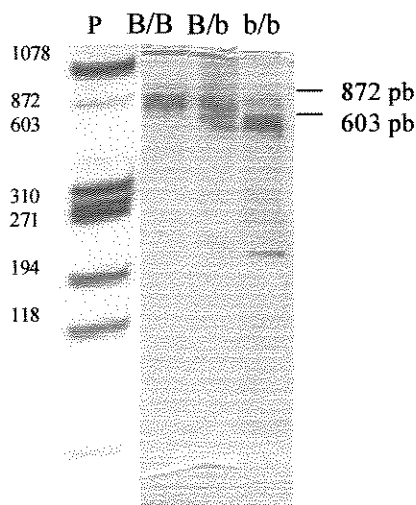


Figura 03. Gel de Poliacrilamida, corado por prata, evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor VDR – *BsmI*. Paciente homozigoto para o alelo B (B/B), paciente heterozigoto (B/b), paciente homozigoto para o alelo b (b/b) e padrão de massa molecular (P).

Os alelos foram designados "b" (presença do sítio para *Bsm* I, formando um fragmento com 603 pb e outro com 194 pb) e "B" (ausência do sítio para *Bsm* I, mantendo o fragmento de 872 pb).

6.7 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D, VDR (*TaqI*). CÓDON 352 NO ÉXON 9 (T→C).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de *primers*:

5'- CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG -3' (*foward*)

5'- GGATGTACGTCTGCAGTGTG- 3' (*reverse*) (HENNIG et al, 1999)

A PCR foi realizada com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1µM de cada primer, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de *Taq* polymerase. As soluções foram incubadas a 95°C por 3 min e submetidas a 35 ciclos de 45s a 95°C, 1min a 63°C e 1,15 min a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 340 pb.

Digestão com enzima de restrição (Técnica de RFLP)

Doze micro litros do produto da PCR foram adicionados a 13 µL de solução contendo 2,5 µL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,4 µL *TaqI* (10,000 U/mL - New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) e 10,1 µL de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 65°C *ON*.

O RFLP foi criado pela transição de uma única base (T→C) no códon 352 do exon 9 do gene do VDR quando este foi exposto à enzima de restrição *TaqI*. Os alelos foram designados "t" (presença do sítio para *TaqI*, formando um fragmento com 260 pb e outro com 80 pb) e "T" (ausência de sítio para *TaqI*, mantendo o fragmento de 340 pb) (Figura 02).

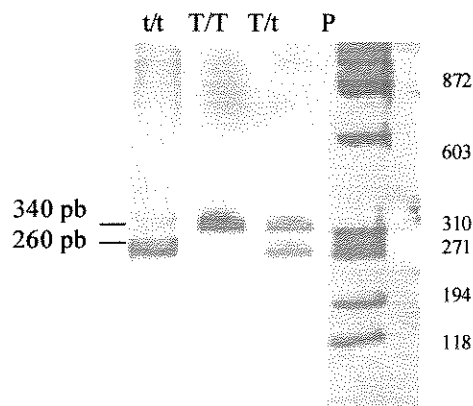


Figura 04 - Gel de Poliacrilamida, corado por prata evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor da vitamina D (VDR – *Taq-I*). Paciente homozigoto para o alelo t (t/t), paciente homozigoto para o alelo T (T/T), paciente heterozigoto (T/t) e padrão de massa molecular (P).

6.8 ANÁLISE DE POLIMORFISMO NO GENE HLA-DRB1:

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de primers:

5'-TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG -3' (forward)

5'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT - 3' (reverse) (TANAKA et al., 1999)

A PCR foi realizada em um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1µM de cada primer, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As soluções foram

incubadas a 94°C por 4 min e submetidas a 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 seg a 59°C e 2 min a 72°C e uma extensão final de 72°C por 7 min em termociclador (Perkin-Elmer GeneAmp 2400). O fragmento amplificado apresentava 261 pares de bases (pb).

Digestão com enzima de restrição (Técnica de RFLP)

Doze micro litros do produto de PCR foram adicionados a 13 µL de solução contendo 2,5 µL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,5 µL *Hph*I (5000 U/mL - New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) e 10 µL de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 37°C O/N.

A digestão com a enzima *Hph*I apresenta como produtos de digestão quatro alelos: alelo 1 (ausência do sítio para *Hph*I, mantendo o fragmento em 261 pb), alelo 2 (145 pb, 109 pb e 7 pb), alelo 3 (254 pb e 7 pb), alelo 4 (145 pb e 116 pb) (Figura 03).

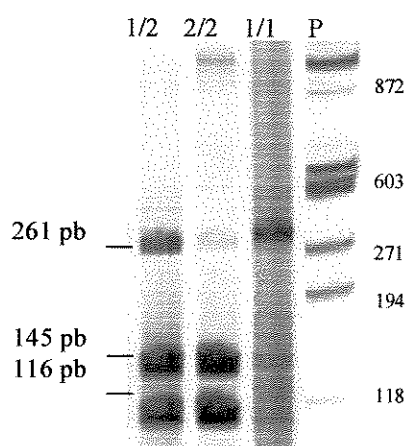


Figura 05- Gel de poliacrilamida, corado por prata evidenciando resultado da RFLP do gene do HLA-DRB1. Paciente heterozigoto (1/2), paciente homozigoto para o alelo 2 (2/2), paciente homozigoto para o alelo 1 (1/1) e padrão de peso molecular (P).

6.9 ELETROFORESE:

O volume total da digestão foi misturado a 3 µL 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 (DNA Silver Staining Kit, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia).

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

VDR

Para a análise dos polimorfismos do gene do VDR, a significância das diferenças observadas nas frequências de cada SNP no grupo Controle e DP foi verificada pelo teste Chi-quadrado (χ^2) e utilizando-se o programa CLUMP que realiza a simulação de MONTE CARLO (SHAM et al., 1995). O uso do método de MONTE CARLO evita a necessidade da correção de BONFERRONI e a dificuldade de acesso na significância da proporção dos alelos. O programa CLUMP é utilizado em estudos genéticos (doença-controle) onde múltiplos alelos são considerados (HODGE et al, 2001). Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. 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 o programa SAS (v.6.11).

A proximidade dos polimorfismos estudados *TaqI* e *BsmI*, justifica a análise simultânea destes como haplótipos. Para calcular a frequência haplotípica, heterozigotidade, equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação, o programa ARLEQUIN (SCHNEIDER et al, 2000) foi utilizado.

CD14 e HLA-DRB1

Para a análise dos polimorfismos nos genes CD14 e HLA-DRB1, a distribuição do genótipo e frequência alélica nos pacientes do grupo com DP e grupo controle foram comparadas através do teste de χ^2 (Qui-quadrado). O risco à doença, associado com alelos ou genótipos, foi calculado através de “odds ratio” (OR) com um intervalo de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre as características clínicas dos pacientes nos três grupos estudados. A maioria dos pacientes era pertencente ao gênero feminino, caucasóide e tinha idade média em torno de 40 anos. Os dados referentes às características clínicas dos pacientes podem ser observados na tabela 01.

Tabela 01. Características clínicas da população estudada (n=113).

	Controle (n=44)	DP ^b (n=69)	Total (n=113)
Idade (anos)			
Média ($\pm$ DP ^a)	43,7(14,1)	41,0(12,5)	42,2(9,9)
Gênero (%)			
Feminino	30(68,2)	57(82,6)	87(77,0)
Masculino	14(31,8)	12(17,4)	26(23,0)
Grupo Étnico (%)			
Caucasóide	37(84,1)	50(72,4)	87(77,0)
Afro-Americano	3(6,8)	10(14,5)	13(11,5)
Mulato	3(6,8)	9(13,1)	12(10,6)
Japones	1(2,3)	0	1(0,9)

^aDesvio Padrão; ^b Doença Periodontal;

CD14

A tabela 02 mostra os dados referentes às frequências alélicas do CD14 C(-260) →T dos pacientes. O alelo 2 esteve presente em mais da metade dos pacientes (60,18%). Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ($p=0,933$) entre os alelos 1 e 2 presentes nos diferentes níveis de doença periodontal, conforme visto na tabela 05. Aparentemente, o polimorfismo estudado não influencia a severidade da doença. A

distribuição genotípica também está evidenciada na tabela 02, mostrando que a maioria dos pacientes (77,88%) eram heterozigotos para esse SNP (CD14 -260 C →T).

Tabela 02: Frequência dos genótipos e alelos do gene do CD 14 C(-260) →T(561pb) nos grupos estudados.

n (%)	GENÓTIPO (n=113)			χ^2
	1/1	1/2	2/2	
Controle	0 (0,00)	36 (31,86)	8 (7,08)	p= 0,537
Moderada	1 (0,89)	23 (20,36)	7 (6,19)	
Severa	0 (0,00)	29 (25,66)	9 (7,96)	
Total	1 (0,89)	88 (77,88)	24 (21,23)	
n (%)	ALELOS (n=226)			
	1	2		
Controle	36 (15,92)	52 (23,01)	p= 0,933	
Moderada	25 (11,07)	37 (16,38)		
Severa	29 (12,83)	47 (20,79)		
Total	90 (39,82)	136 (60,18)		

Em relação ao SNP CD14 *AvalI*, o alelo mais freqüente na população estudada foi o alelo 1 (59,3%), conforme visto na tabela 06. Não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ($p=0,356$) entre os alelos 1 e 2 para os diferentes níveis da doença periodontal. Aparentemente, o polimorfismo estudado não influencia a suscetibilidade e a severidade da doença. A distribuição genotípica também evidenciada na tabela 03 mostra que a maioria dos pacientes eram heterozigotos (56,63%).

Tabela 03: Frequência dos genótipos e alelos do CD 14 (Ava II) nos grupos estudados.

	GENÓTIPO (n=113)			χ^2
	1/1	1/2	2/2	
Controle	13 (11,50)	24 (21,23)	7 (6,19)	$p=0,251$
Moderada	6 (5,31)	22 (19,47)	3 (2,65)	
Severa	16 (14,17)	18 (15,93)	4 (3,55)	
Total	35 (30,98)	64 (56,63)	14 (12,39)	
	ALELOS (n=226)			
	1	2		
Controle	50 (22,12)	38 (16,81)	$p=0,356$	
Moderada	34 (15,06)	28 (12,39)		
Severa	50 (22,12)	26 (11,50)		
Total	134 (59,30)	92 (40,70)		

VDR

ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS E GENÓTIPOS NO GRUPO CONTROLE E NOS GRUPOS COM DOENÇA PERIODONTAL

As frequências dos alelos e genótipos do VDR-*TaqI* e VDR-*BsmI* podem ser observadas na tabela 4. Diferença significativa entre os grupos Controle e DP, analisando os alelos e genótipos, somente foi encontrada no genótipo do VDR-*TaqI* ($p=0,016$). Observou-se que o genótipo heterozigoto (Tt) esteve prevalente no grupo DP (59,4%). O cálculo do OR revelou que indivíduos com alguma forma do alelo “t” (genótipos Tt ou tt) parecem estar 2,4 vezes mais suscetíveis à Doença Periodontal (OR= 2,4; 95% CI=1,10 - 5,21).

Considerando os dois SNPs independentemente, a distribuição genotípica do grupo Controle mostrou-se estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 04 – Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) *Taq I* e *Bsm I* do gene do VDR entre os pacientes controle e com doença periodontal (DP).

SNP ^a	Controle	DP ^b	Qui-quadrado)	Odds Ratio
TaqI				
<i>Alelo n(%)</i>	n = 88	n = 138		
T	62 (70,4)	87 (63,0)	$\chi^2 = 1,31$	
t	26 (29,6)	51 (37,0)	$p = 0,316$	
<i>Genótipo n(%)</i>	n = 44	n = 69		
TT	24 (54,5)	23 (33,3)		(TT vs Tt+tt)
Tt	14 (31,8)	41 (59,4)	$\chi^2 = 8,23$	OR = 2,4 $p=0,041$
tt	6 (13,7)	5 (7,3)	$p = 0,016$	IC 95% = 1,10 < μ < 5,21
BsmI				
<i>Alelo n(%)</i>	n = 88	n = 138		
B	34 (38,6)	63 (46,6)	$\chi^2 = 1,08$	
b	54 (61,4)	75 (43,4)	$p = 0,367$	
<i>Genótipo n(%)</i>	n = 44	n = 69		
BB	8 (18,2)	10 (14,5)		
Bb	18 (40,9)	43 (62,3)	$\chi^2 = 5,315$	
bb	18 (40,9)	16 (23,2)	$p = 0,07$	

^a Polimorfismo de nucleotídeo único; ^b Doença Periodontal

FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS

Foi observado que os dois SNPs exibiram forte desequilíbrio de ligação e apareceram em 4 formas haplotípicas apresentadas na tabela 05. A distribuição da frequência haplotípica mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$) entre grupo Controle e DP (tabela 05). Houve predominância do haplótipo “Tb” no grupo controle (43,2%) e predominância do haplótipo “TB” no grupo DP (36,6%). Analisando-se os resultados pelo cálculo de OR, foi encontrado que pacientes que apresentavam o haplótipo

“TB” estavam duas vezes mais predispostas a desenvolver PD que os indivíduos que apresentavam o haplótipo “Tb” (OR=2,19 – 95% CI=1,12-4,28).

Tabela 05 – Frequência dos haplótipos do gene do VDR no grupo controle e com Doença Periodontal.

Haplótipos	Controle (n=44)	DP ^a (n=69)
TaqI BsmI	n (%)	n (%)
TB	24 (27,3)	50 (36,3)
Tb	38 (43,2)	36 (26,1)
tB	12 (13,6)	14 (10,1)
Tb	14 (15,9)	38 (27,5)
Qui-quadrado	p = 0,02	
Haplotipos		
Tb	38 (43,2)	36 (26,1)
TB	24 (27,3)	50 (36,3)
Odds Ratio	2,19 (95% CI = 1,12 – 4,28)	

^a Doença Periodontal

Houve uma grande porcentagem de heterozigose nos dois grupos estudados (Controle = 0,7032 +/- 0,0266; DP = 0,7211 +/- 0,0132). Estes resultados revelam a importância da organização dos dados haplotípicos arranjados em genótipos, como mostrado na tabela 06. Houve uma diferença significativa na frequência dos haplótipos arranjados em genótipos ($p < 0,05$). Houve predominância do genótipo “Tb/Tb” no grupo controle (31,8%) e uma grande frequência do genótipo “TB/tb” no grupo DP (49,3%). Indivíduos com haplótipo heterozigoto “TB/tb” mostraram estar mais que quatro vezes mais predispostos desenvolver DP que indivíduos “Tb/Tb” (OR = 4,32; 95% CI = 1,50-12,47).

Tabela 04 – Frequência dos haplótipos, arranjados em genótipos do gene do VDR no grupo Controle e com Doença Periodontal (n=113).

Genótipos	Controle (n=44)	DP ^a (n=69)
TaqI BsmI/TaqI BsmI	n (%)	n (%)
TB/tB	1 (2,3)	4 (5,8)
TB/tb	10 (22,7)	34 (49,3)
TB/Tb	7 (15,9)	10 (14,5)
Tb/Tb	14 (31,8)	11 (15,9)
Tb/tb	3 (6,8)	4 (5,8)
TB/tB	5 (11,4)	5 (7,2)
TB/TB	3 (6,8)	1 (1,5)
TB/tb	1 (2,3)	0 (0,0)
<i>p</i> value (CLUMP)	0,05	
Genótipo		
Tb/Tb	14 (31,8)	11 (15,9)
TB/tb	10 (22,7)	34 (49,3)
<i>p</i> Value (Qui-quadrado)	0,00	
Odds Ratio	4,32 (95% CI = 1,50 – 12,47)	

^a Doença Periodontal

HLA

Dentre os pacientes com genótipo 1/1, 77,27% eram do grupo controle, 13,63% eram do grupo com periodontite moderada e 9,09% do grupo com periodontite terminal. Dentre os pacientes com genótipo 2/2, 8,33% eram do grupo controle, 29,16% do grupo com periodontite moderada e 62,50% do grupo com periodontite terminal. Apenas 2 pacientes apresentaram o genótipo 2/3 (1 do grupo Controle e 1 do grupo Severo) e não houve presença do alelo 4. Houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos ($p=0,000$) quando os três grupos foram comparados (os dados de frequência genotípica podem ser observados na tabela 07). Em relação à frequência alélica, observamos que dentre os pacientes que apresentavam o alelo 1, 53,21% pertenciam ao

grupo controle e 22,01% ao grupo com periodontite terminal. Entre pacientes que apresentavam o alelo 2, 25,21% pertenciam ao grupo controle e 44,34% ao grupo com periodontite terminal. Comparando-se a frequência alélica dos 3 grupos estudados encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) evidenciando a associação do alelo 2 com a manifestação da DP (os dados da frequência alélica podem ser observados na tabela 07).

Unindo-se o grupo com periodontite moderada ao grupo com periodontite terminal, e os comparando ao grupo controle (controle vs moderada + terminal), verificamos que indivíduos com genótipo 2/2 tiveram aproximadamente 10 vezes mais chances de apresentar DP que indivíduos heterozigotos (1/2 e 2/3) ou homozigotos (1/1) ($OR = 9,82$; 95 % $CI = 2,1 - 44,3$). Observamos também que a presença do alelo 2 suscetibiliza o paciente em uma frequência 3 vezes maior à DP ($OR = 3,36$; 95 % $CI = 1,91 - 5,9$ – tabela 07).

Unindo-se o grupo controle ao grupo com periodontite moderada e os comparando ao grupo com periodontite terminal (controle + moderada vs terminal), verificamos que indivíduos com genótipo 2/2 tiveram aproximadamente 5 vezes mais chances de apresentar a DP na sua forma severa que indivíduos heterozigotos (1/2 e 2/3) ou homozigotos (1/1) ($OR = 4,78$; 95 % $CI = 1,84 - 12,40$ – tabela 07). Também observamos que a severidade da doença está associada ao alelo 2 visto que pacientes com este alelo tiveram quase 3 vezes mais chances de apresentar a doença na sua forma severa ($OR = 2,75$; 95 % $CI = 1,53 - 4,88$ – tabela 07).

Tabela 07 – Distribuição alélica e genotípica do gene do HLA-DRB1 entre os pacientes do grupo controle (C), e dos grupos com periodontite moderada (M) e severa (S).

grupo controle (C), e dos grupos com performance moderada (M) e severa (S).						
Genótipo n=113					Odds ratio 1/1+1/2+2/3 vs (2/2)	
n(%)	1/1	1/2	2/2	2/3	C vs (M+S)	(C+M) vs S
Controle	17(15,0)	24(21,2)	2(1,8)	1(0,9)	Suscetibilidade	Severidade
Moderada	3(2,6)	21(18,7)	7(6,2)	0(0,0)	OR=9,8	OR=4,7
Severa	2(1,8)	20(17,7)	15(13,2)	1(0,9)	(95%IC=2,1-44,3)	(95%IC=1,8-12,4)
ρ=0,000						
Alelos n=226					Odds ratio 1 +3 vs 2	
n(%)	1	2	3		C vs (M+S)	(C+M) vs S
Controle	58(25,6)	29(12,8)	1(0,5)		suscetibilidade	Severidade
Moderada	27(12,0)	35(15,5)	0(0,0)		OR=3,36	OR=2,7
Severa	24(10,6)	51(22,5)	1(0,5)		(95%IC=1,9-5,9)	(95%IC=1,5-4,8)
ρ=0,000						

8. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença de etiologia multifatorial, de natureza crônica, causada primariamente por microorganismos específicos presentes no biofilme dental em área adjacente à gengiva. A patogênese da periodontite crônica ainda é pouco compreendida e é atualmente vista como uma interação complexa entre a infecção bacteriana e a resposta do hospedeiro, freqüentemente modificada por fatores ambientais. Assim como muitas doenças crônicas, a periodontite pode ser poligênica, ou seja, diferentes genes podem determinar diferentes aspectos da patologia da doença (INAGAKI et al, 2003).

Vários estudos têm sugerido que há uma substancial influência genética na doença periodontal. Recentemente, tem sido demonstrado que polimorfismos nos genes da IL-1 (KORNMAN et al., 1997), IL-6 (TREVILATTO et al., 2003), IL-2 (SCAREL-CAMINAGA et al., 2003) e TGF-B1 (SOUZA et al., 2003) estão associados com um aumento no risco à periodontite crônica.

Neste estudo, foram abordados três aspectos importantes da doença periodontal: a característica infecciosa da doença, estudando-se o CD14; a característica imunológica, através da análise do HLA; e o nível de comprometimento do osso alveolar, investigando-se o VDR.

Estudos indicando que a osteopenia está relacionada à perda óssea alveolar, perda de inserção clínica e perda dental (WACTAWSKI-WENDE et al., 1996; RONDEROS et al., 2000; KRALL et al., 1996) suportam a concepção de que genes envolvidos na homeostasia óssea sistêmica podem ter um importante papel na progressão da DP.

A vitamina D apresenta envolvimento genômico pelo receptor de vitamina D (VDR), que apresenta muitos polimorfismos. O VDR pertence a uma super-família de

receptores esteróides e é largamente expressado em muitas células, incluindo linfócitos, macrófagos, e células B pancreáticas (WALTERS, 1992). Os mecanismos moleculares pelos quais a densidade óssea é regulada via VDR ainda não estão esclarecidos, apesar de que diferenças na região 3' do gene podem alterar os níveis de mRNA (MORRISON et al., 1994). Uma alta densidade óssea está associada com o alelo "b" do gene do VDR (VDR-*BsmI*) (MORRISON et al., 1994).

As frequências dos genótipos e alelos do VDR-*TaqI* encontradas neste estudo com uma casuística formada por um grupo Controle (pacientes saudáveis) e um grupo com pacientes que apresentavam Doença Periodontal foi similar às frequências apresentadas por HENNIG et al. (1999) onde, o alelo "t" para a RFLP do gene do VDR mostrou-se ser mais presente em pacientes com periodontite agressiva (EOP). Assim como eles, SUN et al. (2002) mostraram que as frequências do genótipo "Tt" e alelo "t" foram significativamente maiores em pacientes com EOP. Na doença periodontal crônica, nós encontramos que pacientes com alguma forma do alelo "t" ("Tt" ou "tt") se apresentaram 2,4 vezes mais suscetíveis à doença em comparação com pacientes que não apresentavam este alelo.

As frequências dos genótipos e alelos do VDR-*TaqI* encontradas em nosso resultados foram diferentes quando comparadas com outros estudos do VDR que avaliaram populações diferentes. Outros autores estudando a progressão da doença periodontal, (INAGAKI et al., 2003) reportaram uma frequência de aproximadamente 40% no genótipo "TT" e de 20% no genótipo "tt". ZHAO et al. (1997), que estudaram uma população chinesa, reportaram alta frequência do alelo "T" (95%) e baixa frequência dos pacientes com alelo "t" (5%), indicando que populações diferentes podem ser a razão das diferentes frequências.

Similarmente ao nosso estudo, alguns autores (YOSHIHARA et al., 2001) não encontraram diferenças significativas na distribuição do VDR *BsmI* entre grupos de pacientes com DP e controle saudáveis, entretanto, nossos resultados diferem dos resultados apresentados por esses autores em relação às frequências dos alelos/genótipos, onde nós encontramos uma alta frequência do alelo “b”. Outro estudo (LAZARETTI-CASTRO et al., 1997), em uma população brasileira, mostrou uma correlação significativa entre genótipos de VDR *BsmI* e densidade mineral óssea em mulheres brasileiras saudáveis na pré-menopausa, onde a frequência do genótipo para VDR-*BsmI* foi similar aos nossos achados. Além disso, a frequência étnica nos dois grupos foi similar, compreendendo 77,0% de caucasianos do total de indivíduos estudados (tabela 1). Nossos resultados mostraram que pacientes apresentando o haplótipo “TB” foram mais suscetíveis à doença periodontal que os outros.

Este foi o primeiro estudo que analisou o haplótipo formado pelos SNPs VDR *TaqI* e VDR *BsmI* e doença periodontal. Já havia sido demonstrada a associação entre DP e VDR *BsmI* e o receptor para imunoglobulina Fcγ (YASHIHARA et al., 2001) ou VDR *TaqI* e VDR *ApaI*. Outros autores (GERNERO et al 1996) não encontraram associação entre perda óssea e polimorfismos dos marcadores VDR-*BsmI*, VDR-*TaqI* ou VDR-*ApaI*.

Visando avaliar o possível papel do gene do CD14 na patogênese da periodontite crônica, nós analisamos a associação entre polimorfismos no promotor do gene do CD14 e doença periodontal crônica.

CD14 é um receptor de lipopolissacarídeos (LPS) que existe predominantemente na superfície de monócitos/macrófagos e neutrófilos (WRIGTH et al, 1990; PUGIN et al. 1993; WILSON et al., 1995). A interação entre LPS de bactérias gram-negativas e células

do hospedeiro inicia a secreção de citocinas em tecidos gengivais (HANAZAWA et al, 1992; HANAZAWA et al., 1995) levando à perda de osso alveolar e tecidos de suporte dental na periodontite.

ROBERTS et al. (1997) mostraram através de estudo imunohistoquímico, que em tecido gengival inflamado de pacientes com periodontite havia uma quantidade consideravelmente maior de células coradas positivamente para mRNA de CD14 do que em tecido gengival de pacientes saudáveis.

Lipopolissacarídeos de *Porphyromona gingivalis* (P-LPS), uma importante bactéria patogênica intimamente associada com a destruição de tecidos periodontais (WANG et al. 2002), também levam a um aumento na expressão de mRNA para CD14 e Interleucina-1 β em células da calvária de ratos, induzindo a um aumento de citocinas e de células inflamatórias, estimulando assim a diferenciação de células osteoclásticas e causando reabsorção de osso alveolar (KADONO et al. 1999).

Quanto maior a concentração de CD14 no fluido gengival da área cervical e o número de sítios contendo CD14, menor é a profundidade das bolsas periodontais em pacientes que apresentam periodontite (JIN et al., 2001). Já em pacientes apresentando Periodontite Agressiva (EOP) foi observada uma redução na expressão de CD14, o que segundo BUDUNELI et al. 2001, pode ser relatada como uma deficiência no sistema imune.

Nossos resultados indicam que não houve diferença significativa na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados. Assim como no estudo de HEESSEN et al. (2002) que não encontraram associação entre genótipos de CD14-260 e a expressão de TNF (citocina que age em processos inflamatórios crônicos). Entretanto os mesmos autores encontraram associação entre o mesmo polimorfismo e a expressão de Interleucina-1 β

(citocina muito relacionada à doença periodontal), relatando que houve um aumento na expressão de Interleucina-1 β em pacientes homozigotos para o alelo C (alelo 1) no polimorfismo CD14 – 260 C/T. Há apenas um trabalho (HOLLA et al, 2002) documentando evidências do papel de genótipos específicos de CD14 como um fator de risco para periodontite crônica onde foi observada que uma associação entre o polimorfismo –1359G/T do gene CD14 e a severidade à doença periodontal crônica.

KOENIG et al. (2002) também não encontraram relação entre genótipos de CD14 e algumas doenças inflamatórias crônicas. Outras doenças têm sido investigadas quanto à associação genética relacionada com o CD14, NAUCK et al. (2002) também não encontraram associação entre genótipos de CD14 –260C/T e Doença da Artéria Coronária, entretanto esse mesmo polimorfismo já foi associado a um maior risco ao Infarto do Miocárdio (HUBACEK et al., 1999).

Desde que alterações genéticas representadas por polimorfismos no gene do CD14 parecem estar envolvidas em processos imuno-inflamatórios, os efeitos clínicos desta variação genética dependem da presença de bactérias específicas para iniciar a inflamação (HOLLA, 2002), assim, é importante salientar que pacientes apresentando somente esta predisposição genética, não estão automaticamente predispostos ao desenvolvimento de periodontite (HOLLA, 2002).

A busca de polimorfismos genéticos como características chave em processos biológicos de doenças infecciosas e auto-imunes tem sido objetivo de vários estudos (ABEL et al., 1997; PAGE et al., 1999). Polimorfismos genéticos individuais ou uma combinação de polimorfismos são mantidos na população, pois conferem avanços individuais que promovem flexibilidade na regulação da homeostasia, assim como proteção

contra algumas doenças imunes. Mas isso pode ser contraposto pelo aumento à suscetibilidade a certas doenças (DASER et al., 1996; WILSON et al., 1995).

A expressão de antígenos HLA-DR em pacientes com doença periodontal foi investigada apenas em poucos estudos. KATZ et al. (1987) sugeriram que um aumento na presença deste antígeno leva à predisposição e ao desenvolvimento da DP. Estes autores sugeriram ainda que alguns alelos específicos do HLA-DR podem predispor pacientes à DP. FIRATLI et al. (1996) também encontraram aumento da expressão de HLA-DR em pacientes com DP e enfatizaram que vários mecanismos podem operar em diferentes doenças associadas ao HLA. Estes também sugeriram que o aumento na expressão de HLA-DR pode ser utilizado como critério para diagnóstico de DP. HLA-DR também foi encontrado em quantidade aumentada em pacientes com artrite reumatóide, doença que apresenta uma resposta inflamatória persistente, tanto humoral quanto celular ocorrendo em áreas especializadas compostas por tecido conjuntivo e osso (GARGIULO et al., 1985; HIRSH, et al., 1989).

Não há estudos prévios analisando polimorfismos no gene do HLA-DRB1 e doença periodontal. Entretanto alguns estudos já buscaram associar DP com polimorfismos em outros tipos de HLA.

TAKASHIBA et al. (1994) sugeriram que uma variação genética de HLA-DQB, localizada em um íntron específico, pode ser um marcador genético para DP afetando a reação imune no reconhecimento do antígeno. OHYAMA et al. (1996) sugeriram que a molécula de HLA-DQB1 tem um papel crucial na patogênese da EOP e que a suscetibilidade à EOP pode ser determinada pela habilidade de ligação entre os peptídeos dos microrganismos digeridos e as moléculas de HLA-DQ. HODGE et al. (1999)

estudaram polimorfismos no gene HLA-DQB1 em europeus caucasianos que apresentavam doença periodontal, não encontrando associação alguma.

No presente estudo notamos que houve uma diferença significativa, tanto nas frequências genotípicas como alélicas, entre os grupos de pacientes controle e os portadores de DP. Pudemos constatar a presença do alelo 1 na maioria dos pacientes do grupo controle (53,15%) dado que sugere que este alelo exerce papel de proteção à manifestação da DP, influenciando em sua severidade. Observamos também que a presença do alelo 2 predispõe o paciente à manifestação ou maior severidade da doença periodontal, uma vez que este alelo está bastante presente no grupo com periodontite moderada (30,43%) e ainda apresenta a maior frequência no grupo com periodontite severa (44,34%).

Estas observações estão de acordo com os achados de TAKASHIBA et al. (1999), os quais sugeriram que algumas formas de HLA DRB1 e DQB1 podem acelerar a resposta das células T a certas bactérias periodontopatogênicas, como por exemplo *Porphyromonas gingivalis*, o que leva a um aumento da suscetibilidade do indivíduo à doença periodontal.

A confirmação da influência de polimorfismos pode ser considerada mais uma ferramenta na prevenção da DP, onde pacientes apresentando estes fatores de risco podem ser monitorados regularmente através de um programa apropriado levando a uma possível diminuição da mortalidade dental por DP (WENNSTROM et al., 1990)

9. CONCLUSÕES

1. O presente estudo mostrou que o SNP VDR *TaqI* e os haplótipos “TB” e “TB/tb” estiveram associados com a perda de inserção clínica óssea na doença periodontal crônica da população estudada. Análises dos genótipos do VDR podem ser marcadores de risco na previsão de suscetibilidade à doença periodontal crônica.
2. Com base nos resultados encontrados em relação ao gene do CD14, concluiu-se que os SNPs estudados não estão associados à Doença Periodontal Crônica na população estudada.
3. Concluiu-se também que o polimorfismo no gene HLA-DRB1 (que indica a presença de RFLP para *HphI*) pode ser usado como um marcador de susceptibilidade e severidade para a DP crônica na população estudada, visto que apresentou associação com esta doença.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEL, L.; DESSEIN, A.J. The impact of host genetics on susceptibility to human infections diseases. **Curr Opin Immunol**, v.9, n.4, p.509-516, Aug. 1997
2. ALAGOL, F.; SHIHADDEH, Y.; BOZTEPE, H.; TANAKOL, R.; YARMAN, S.; AZIZLERLI, H.; SANDALCI, O. Sunlight exposure and vitamin D deficiency in turkish women. **J Endocrinol Invest**, v.23, n.3 p.173-7, 2000.
3. AMANO, S.; KAWAKAMI, K.; IWAHASHI, H.; KITANO, S.; HANAZAWA, S. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. **J Cell Physiol**, v.173, p.301-9, 1997.
4. ANTAAL-SZALMAS, P. Evaluation of CD14 in host defence. **Eur J Clin Invest**, v.30, p.167-79, 2000.
5. BALDINI, M.; KABESCH, M.; GRAVES, P.E.; ERIKSON, R.P.; VERCELLI, D.; MARTINEZ, F.D. Detection of four novel polymorphisms in the CD14 promoter and association of their haplotypes with total serum IgE levels. **ATS Meeting**. Toronto, 2000.
6. BALDINI, M.; LOHMAN, C.; HALONEN, M.; ERICKSON, R.P.; HOLT, P.G.; MARTINEZ, F.D. A polymorphism in the 5'flanking region of the CD14 gene is

associated with circulation soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.20, p.976-83, 1999.

7. BJORN, L.O.; WANG, T. Vitamin D in a ecological context. **Int J Circumpolar Health**, v.59, n.1, p.26-32, 2000.
8. BONFIL, J.J.; DILLIER, F.L.; MERCIER, P.; REVIRON, D.; FORTI, B.; SAMBUC, R.; BRODEUR, J.M.; SEDARAT, C. A “case control” study on the rôle of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR.SSO). **J Clin Periodontol**, v. 261, n.2, p. 77-84, Feb. 1999.
9. BOUGHMAN, J.Á.; ASTEMBORSKI, J.Á.; SUZUKI, J.B. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. **J Clin Periodontol.**, v.19, p.233-239, 1992.
10. BROWN, L.; LOE, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 2, p. 57-71 Jun. 1993.
11. BUDUNELI, N.; BICAKCI, N.; KESKINOGLU, A. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets and mCD14 expression in patients with various periodontitis categories. **J Clin Periodontol**, v.28, n.5, p.419-24, 2001.
12. CARLBERG, C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. **Biofactors**, v.10, n.2-3, p.91-7, 1999.

13. Consensus Report for Periodontal Diseases (CRPD): pathogenesis and microbiol factors. **Ann Periodontol**, v.1, p.926-932, 1996.
14. DASER, A.; MITCHISON, H.; MITCHISON, A.; MULLER, B. Non-classical-MHC genetics of immunological disease in man and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. **Cytokine**, v.8, n.8, p.593-597, Aug 1996.
15. DE LUCA, HF. Vitamin D dependent calcium transport. **In Graves, J. S. (ed):** Regulation and development of menbrana transport processes. New York, John Wiley & Sons, p. 159, 1985.
16. DIEHL, S. R.; WANG, Y.; BROOKS, C. N.; BURMEISTER, J. Á.; CALIFANO, J. V.; WANG, S.; SCHENKEIN, H. Á. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphism with early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v.70, n.4, p.418-430, Apr. 1999.
17. DINI, E. L.; GUIMARÃES, L. O. Periodontal conditions and treatment needs (CPITN) in a worker population in Araraquara, SP, Brazil. **International Dental Journal**, v.44, n.4, p.309-311, Aug. 1994.
18. FERRERO, E.; GOYERT, S.M. Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. **Nucleic Acids Res**, v.16, p.4173, 1988.

19. FIRATLI, E.; KANTARCI, A.; CEBECI, I.; TANYERI, H.; SÖNMEZ, G.; CARIN, M.; TUNCER, Ö. Association between HLA antigens and early onset periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.26, n.6, p.563-566, Jun. 1996.
20. GARGIULO, A.V.; TOTO, P.D.; ROBINSON, J.A.; GARGIULO, A.W. Latex slide agglutination vs ELISA system rheumatoid factor detection in inflamed human gingiva. **J Periodont Res**, v.20, n.1, p.31-4, Jan. 1985.
21. GARNERO, P.; BOREL, O.; SORNAY-RENDU, E.; ARLOT, M.E.; DELMAS, P.D. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss and bone mass in postmenopausal women: the OFELY study. **J Bone Miner Res**, v.11, p.827-834, 1996.
22. GROSS, C.; ECCLESHALL, T.R.; FELDMAN, D. Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. **Principles of Bone Biology**. San Diego: Academic Press; p.917-933, 1996.
23. GRUNWALD, U.; FAN, X.L.; JACK, R.S.; WORKALEMAHU, G.; KALLIES, A; STELTER, F.; SCHUTT, C. Monocytes can phagocytose gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. **J Immunol**, v.157, p.4119-25, 1996.
24. HANAZAWA, S; KAWATA, Y; MURAKAMI, Y; NAGANUMA, K; AMANO, S; MIYATA, Y; KITANO, S. *Porphyromona gingivalis fimbriae* stimulated bone

resorption in vitro is inhibited by tyrosine kinase inhibitor. **Infect Immun**, v.63, p.2374-2377, 1995.

25. HANAZAWA, S; MURAKAMI, Y; HIROSE, K; AMANO, S; OHMORI, Y; HIGUCHI, H; KITANO, S. *Porphyromonas gingivalis fimbriae* activate mouse peritoneal macrophages and induce gene expression and production of interleukin-1 **Infect Immun**, v.59, p.1972-1977, 1992.

26. HART, T.C. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v.67, p.355-366, 1996.

27. HASSEL, T.M.; HARRIS, E.L. Genetic influences in caries and periodontal diseases. **Crit Ver Oral Biol Med**, v.6, p.319-342, 1995.

28. HAYASHI, J.; MASAKA, T.; ISHIKAWA, I. Increase levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. **Infect Immun**, v.67, p.417-20, 1999.

29. HEESSEN, M.; BLOEMEKE, B.; BACHMANN-MENNENGA, B.; KUNZ, D. The CD14 – 260 C=>T promoter polymorphism co-segregates with the tumor necrosis factors-alpha (TNF-alpha) –308 G=>A polymorphism and is associated with the interleukin-1beta (IL-1beta) synthesis capacity of human leukocytes. **Eur Cytokine Netw**, v.13, n.2, p.230-3, Apr-Jun, 2002.

30. HENNIG, B.J.W.; PARKHILL, J.M.; CHAPPLE, I.L.C.; HEASMAN, P.A.; TAYLOR, J.J. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. **J Periodontol**, v.70, p.1032-1038, 1999.

31. HIRSH, H.Z.; TARKOWSKI, A.; KOOPMAN, W.J.; MESTECKY, J. Local production of IgA and IgM rheumatoid factors in adult periodontal diseases. **J Clin Immunol**, v.9, n.4, p.273-278, Jul. 1989.

32. HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F.. Failure to detect an association with IL-1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.28, p.430-436, 2001.

33. HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. **Tissue Antigens**, v.54, n.2, p.205-207, Aug. 1999.

34. HOLLA, L.I.; BUCKOVA, D.; FASSMANN, A.; HALABALA, T.; VASKU, A.; VACHA, J. Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. **J Med Genet**, v.39, p.844-848, 2002.

35. HOLTROP, M.F.; COX, K.A.; CLARK, M.B.; HOLICK, M.F.; ANAST, C.S. 1,25 dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone. **Endocrinology**, v.108, p.2293, 1981.

36. HUBACEK, J.A.; PITHA, J.; SKODOVA, Z.; STANEK, V.; POLEDNE, R. C (-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. **Circulation**, v.99, p.3218-20, 1999.
37. INAGAKI, K.; KRALL, E.A.; FLEET, J.C.; GARCIA, R.I. Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. **J Periodontol**, v.74, p.161-167, 2003.
38. JEFFCOAT, M.K.; CHESNUT, C.H. Systemic osteoporosis and oral bone loss: Evidence shows increased risk factors. **J Am Dent Assoc**, v.124, p.49-56, 1993.
39. JIN, L.; DARVEAU, R. P. 2001 Soluble CD14 levels in gingival crevicular fluid of subjects with untreated adult periodontitis. **J Periodontol**, v.72, n.5, p.634-40, May, 2001.
40. JOHNSON, G.K.; SLACH, N.A. Impact of tobacco use on periodontal status. **J Dent Educ**, v.65, n.4, p.313-21, Apr. 2001.
41. KADONO, H.; KIDO, J.; KATAOKA, M.; YAMAUCHI, N.; NAGATA, T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun** Jun, v.67, n.6, p.2841-6, 1999.

42. KATZ, J.; COULTSHIN, J.; BENOUE, R.; BRAUTBAR, C. Human Leucocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressive periodontitis. **J Periodontol**, v.58, n.9, p.607-410, Sep. 1987.
43. KOENIG, W., KHUSEYINOVA, N.; HOFFMANN M. M.; MARZ, W.; FROHLICH, M.; HOFFMEISTER, A.; BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D. CD14 C (-260) → polymorphism, plasma levels of the soluble endotoxin receptor CD14, their association with chronic infections and risk of stable coronary artery disease. **J AM Coll Cardiol**, v.40, n.1, p.34-42, Jul, 2002.
44. KORNMAN, K.S.; DI GIOVINE, F.S. Genetic variation in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Ann Periodontol**, v.3, p.327-38, 1998.
45. KORNMAN, K.S.; CRANE, A; WANG, H.Y.; DIGIOVINE, F.S.; NEWMAN, M. G.; PIRK, F.W; WILSON, T.G.JR.; HIGGINBOTTOM, F.L; DUFF, G.W. The interleucine-1 genotype as a severity factor in a dult periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.24, n.1, p.72-77, Jan. 1997.
46. KRALL, E.A.; GARCIA, R.I.; DAWSON-HUGHES, B. Increased risk of tooth loss is related to bone loss at the whole body, hip, and spine. **Calcif Tissue Int**, v.59, p.433-437, 1996.
47. KURABAYASHI, T.; TOMITA, M.; MATSUSHITA, H.; YAHATA, T.; HONDA, A.; TAKAKUWA, K.; TANAKA, K. Association of vitamin D and estrogen

receptor gene polymorphism with the effect of hormone replacement therapy on bone mineral density in Japanese women. **Am J Obstet Gynecol**, v.180, n.5, p.1115-1120, May. 1999.

48. LAZARETTI-CASTRO, M.; DUARTE DE OLIVEIRA, M.A.; RUSSO, E.M.K.; VIEIRA, J.G.H. Vitamin D receptor alleles and bone mineral density in a normal premenopausal Brazilian female population. **Braz J Med Biol Res**, v.30, p.929-932, 1997.

49. MARAZITA, M.L.; BURMEISTER, J.S.; GUNSOLLEY, J.C.; KOERTGE, T.E.M.; LAKE, K.; SCHENKEIN, H.Á. Evidence for autosomal-dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v.65, p.623-630, 1994.

50. NOUCK, M.; WINKELMANN, B.R.; HOFFMANN, M.M.; BOHM, B.; WIELAND, H.; MARZ, W. C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 gene is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction in the Ludwigshafen risk and cardiovascular health (Luric) study. **Am J Cardiol**, v.90, n.11, p.1249-52, Dec, 2002.

51. MCGUIRE, M.K.; NUNN, M.E.; Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. **J Periodontol**, v.70, n.1, p.49-56, Jan. 1999.

52. MOHAMMAD, A.R.; JONES, J.D.; BRUNSVOLD, M.A. Osteoporosis and periodontal disease: A review. **J Calf Dent Assoc**, v.22, n.3, p.69-75, 1994.
53. MORRISON, N. Vitamin D receptor gene variants and osteoporosis: a contributor to the polygenic control of bone density. In: Feldman D, ed. **Vitamin D**. San Diego: Academic Press; p.713-731, 1997.
54. MORRISON, N.A.; CHENG, J.Q.; TOKITA, A.; KELLY, P.J.; CROFTS, L.; NGUYEN, T.V.; SAMBROOK, P.N.; EISMAN, J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, v.367, p.284-287, 1994.
55. MORRISON, N.A.; YEOMAN, R.; KELLY, P.J.; EISMAN, J.A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v.89, p.6665-6669, 1992.
56. OHYAMA, H.; TAKASHIBA, S.; OYAIZU, K. HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. **J Periodontol**, v.67, n.9, p.888-94, Sep. 1996.
57. PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction **Periodontology 2000**, v.14, p.9-11, Jun. 1997.

58. PAGE, R. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. **J Periodont Res** v.34, n.7, p.331-339, Oct. 1999.
59. PAN, Z.; HETHERINGTON, C.J.; ZHANG, D.E. CCAAT/ enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development. **J Biol Chem**, v. 274, p.23242-8, 1999.
60. PUGIN, J., C. C. SCHURER-MALY, D. LETURCQ, A. MORIARTY, R. J. VLEVITCH, AND P. S. TOBIAS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.2744-2748, 1993.
61. RAUCH, F.; RADERMACHER, A.; DANZ, A.; SCHIEDERMAIER, U.; GOLÜCKE, A.; MICHALK, D.; SCHÖNAU, E. Vitamin D receptor genotypes and change of bone density in physically active German women with high calcium intake **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.105, p.103-108, 1997.
62. RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.V.; MAMAT, U.; SCHIMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADORA, F.; et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, v.8, p.217-225, 1994.

63. ROBERTS, F. A.; HOCKETT, R. D. JR.; BUCY, R. P.; MICHALEK, S. M.
Quantitative assessment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult
periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 12, n.6, p.336-44, Dec 1997.
64. RONDEROS, M.; JACOBS, D.R.; HIMES, J.H.; PIHLSTROM, B.L. Associations
of periodontal diseases with femoral bone mineral density and estrogen replacement
therapy: Cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. **J Clin
Periodontol**, v.27, p.778-786, 2000.
65. SAGLIE FR, PERTUISET JH, SMITH CT. The presence of bacteria in the oral
epithelium in periodontal disease. III. Correlation with Langerhans cells. **J
Periodontol**, v.58, p.417-22, 1987.
66. SCAREL-CAMINAGA, R.M.; TREVILATTO, P.C.; SOUZA, A.P.; BRITO, R.B.;
LINE, S.R. Investigation of na IL-2 polymorphism in patients with different levels
of chronic preiodontits. **J Clin Periodontol**, v.29, n.7, p.587-91, Jul 2002.
67. SCAREL-CAMINAGA, R.M.; TREVILATTO, P.C.; SOUZA, A.P.; BRITO, R.B.;
LINE, S.R. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with defferent
levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v.30,
n.4, p.341-5, Apr. 2003.

68. SCHNEIDER, S; ROESSLI, D; EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN**: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
69. SCHÜTT, C. CD14 **Inter J Biochem & Cell Biol.**, v.31, n.5, 545-549, 1999.
70. SEYMOR, G.J. Importance of the host response in the periodontium. **J Clin Periodontol**, v.18, p.421-426, 1991.
71. SHAM, P.C.; CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Annals of Human Genetics**, v.59, p.97-105, 1995.
72. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; XIMENEZ-FYVIE, L.A., FERES, M.; MAJER, D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. **Periodontal 2000**, v.20, p.341-62, Jun. 1999.
73. SOUZA, A.P.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO, R.B.; LINE, R.S. MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. **J Clin Periodontol**, v.30, n.2, p.154-8, Feb. 2003.

74. SOUZA, A.P.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO, R.B.; LINE, R.S. Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*, v.30, n.6, p.519-23, Jun. 2003.
75. STELTER, F.; BERNHEIDEN, M.; MENZEL, R.; JACK, R.S.; WITT, S.; FAN, X.; PFISTER, M.; SCHUTT, C. Mutation of amino acids 39-44 of human CD14 abrogates binding of lipopolysaccharide and *Escherichia coli*. **Eur J Biochem**, v.243, p.100-109, 1997.
76. SUGAWARA, S.; SUGIYAMA, A.; NEMOTO, E.; RIKIISHI, H.; TAKADA, H.; Heterogeneous expression and release of CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. **Infec Immunol**, v.66, p.3043-9, 1998.
77. SUN, J.L.; MENG, H.X.; CAO, C.F.; TACHI, Y.; SHINOHARA, M.; UEDA, M.; IMAI, H.; OHURA, K. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. **J Periodont Res**, v.37, p.263-267, 2002.
78. TAGLIABUE, J.; FARINA, M.; IMBASCIATI, E.; VERGANI, C.; ANNONI, G.; Bsm1 polymorphism of the vitamin D receptor Gene in hyperparathyroid or hypoparathyroid dialysis patients **Am J Clin Pathol**, v.112, p.366-370, 1999.

79. TAKASHIBA, S.; NOJI, S.; NISHIMURA, E. Unique intronic variations of HLA-DQB gene in early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v.65, n.5, p.379-86, May. 1994.
80. TAKASHIBA, S.; OHYAMA, H.; OYAIZU, K.; KOGOE-KATO, N.; MURAYAMA, Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. **J Periodontal Res** v.34, n.7, p.374-378, Oct. 1999.
81. TANAKA, T.; OHMORI, M.; YASUNAGA, S.; OHSHIMA, K.; KIKUCHI, M.; SASAZUKI, T. DNA typing of HLA class II genes (HLA-DR, -DQ and -DP) in Japanese patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease). **Tissue Antigens**, v.54, p.246-253, 1999.
82. TINOCO, E.M.; BELDI, M.I.; LOUREIRO, C.A.; LANA, M.; CAMPEDELLI, F.; TINOCO, N.M.; GJERMO, P.; PREUS, H. R. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **European Journal of Oral Sciences**, v.105, n.1, p.9-14, Feb. 1997.
83. TREVILATTO, P.C.; LINE, S.R.P. Use of buccal cells for PCR amplification of large DNA fragments. **J Forens Odonto-Stomatol**, v.18, n.1, p.6-9, Jun 2000.
84. TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO, R.B.; SOUZA, A.P.; LINE, S.R. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with

susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol*, v. 30, n.5, p.438-42, May, 2003

85. TREVILATTO, P.C.; TRAMONTINA, V.A.; MACHADO, M.A.; GONÇALVES, R.B.; SALLUM, A.W.; LINE, S.R.. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.29, p.233-9, 2002.

86. VERCELLI, D.; BALDINI, M.; MARTINEZ.. The monocyte/IgE connection:may polymorphisms in the CD14 gene teach us about IgE regulation? *Int Arch Allergy Immunol*, v.124, p.20-4, 2001.

87. WACTAWSKI-WENDE, J.; GROSSI, S., TREVISAN, M.; et al. the role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol* , v. 67(Suppl.), p.1076-1084, 1996.

88. WALSH, L.J.; SEYMOR, G.J.; POWELL, R.N. Modulation of Class II (DR and DQ) antigen expression on gingival Langerhans cells *in vitro* by gamma interferon and prostaglandin E2. *J Oral Pathol*, v.15, p.347-51, 1986.

89. WALTERS, M.R. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*, v.13, p.719-764, 1992.

90. WANG, P.L.; OHURA, K. Porphyromona gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-cd14 and toll-like receptors. **Crit Ver Oral Biol Med**, v.13, n.2, p.132-42, 2002.
91. WENNSTROM, J.L.; PAPAPANOU, P.N.; GRONDAHL, K. A. model for decision making regarding periodontal treatment needs. **J Clin Periodontol** v.17, n.4, p.217-22, Apr. 1990.
92. WILLIAMS, R.C. Periodontol disease. **N Engl J Med**, v.322, p.373-82, 1990.
93. WILSON, M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. **Sci. Prog**, v.78, p.19-34, 1995.
94. WILSON, A.G.; DUFF, G.W. Genetic traits in common diseases. **Br Med J**, v.310, p.1482-3, Jun. 1995.
95. WRIGHT, R.A.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; MATHISON, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v.249, p.1431-1433, 1999.
96. YOSHIHARA, A.; SUGITA, N.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; MIYAZAKI, H.; YOSHIE, H. Analysis of vitamin D and Fcy receptor

polymorphism in Japanese patients with generalized early-onset periodontitis. **J Dent Res**, v.80, n.12, p.2051-2054, 2001.

97. ZHANG, D.E.; HETHERINGTON, C.J.; TAN, S.; DZIENNIS, S.E.; GONZALEZ, D.A.; CHEN, H.M.; TENEN, D.G. Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. **J Biol Chem**, v.269, p.11425-34, 1994.

98. ZHAO, J.; ZHOU, X.; MENG, X.; et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in China. **Chin Med J**, v.110, p.366-371, 1997.

11. ANEXOS

ARTIGO 1: Journal of Periodontology - Submitted

Title: POLYMORPHISMS IN THE VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE ARE ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASE.

Rui Barbosa de Brito Junior*

Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga[‡]

Paula Cristina Trevilatto[†]

Ana Paula de Souza[‡]

Silvana Pereira Barros*

*Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil; [†] School of Dentistry Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, PR, Brazil; [‡] University of the Sacred Heart, Bauru, SP, Brazil.

Address (corresponding author):

Silvana Pereira Barros

Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP - Departamento de Morfologia

Av. Limeira, 901 CEP: 13414-018 Piracicaba SP Brazil

Telephone number: +55 (019) 3412-5381 Fax number: +55 (019) 3412-5218

Email: sbarros@fop.unicamp.br

This study was supported by FAPESP grants 00/04487-1 and 01/13998-2

Short title: Association between VRD polymorphisms and periodontal disease.

ABSTRACT

Background: Genetic polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene are associated to parameters of bone homeostasis and with diseases in which bone loss is a cardinal sign, including periodontal disease. The aim of this study was to determine whether chronic periodontal disease is associated with polymorphisms in the VDR gene in a Brazilian population.

Methods: One hundred thirteen unrelated adult individuals were evaluated by measuring clinical attachment loss (CAL) and divided in two groups: 44 health individuals (Control Group) and 69 subjects with chronic periodontal disease (PD). DNA was obtained from the subjects' epithelial cells through scraping of the buccal mucosa. Two polymorphisms in the VDR gene were analyzed by PCR, followed by *TaqI* and *BsmI* restriction endonuclease digestion (RFLP).

Results: Frequencies of VDR/*TaqI* and VDR/*BsmI* showed significant differences between Control Group and group with PD ($p<0,05$). The "Tb" haplotype was prevalent in the Control Group (43.2%), and the "TB" haplotype in the PD group (36.6%). The "TB" haplotype seemed to increase susceptibility to CP (OR=2.19). The heterozygous haplotype "TB/tb" was predominant in the PD group (OR=4.32; $p=0,005$).

Conclusions: The *TaqI* and *BsmI* polymorphisms of the VDR gene are associated with clinical attachment loss due periodontal disease, in the studied population. These findings suggest that VDR genotype might be a risk indicator for the susceptibility to chronic periodontal disease.

KEY WORDS

Periodontal disease; risk factor; receptors, vitamin D; genetic polymorphism; PCR-RFLP; *BsmI*, *TaqI*.

INTRODUCTION

It is well established that chronic periodontal disease has a microbial etiology and that dental plaque must be present in order for inflammation of the periodontium to occur¹. However, convincing evidences have emerged that individual susceptibility to the periodontal disease is determined in part by a genetic predisposition².

Heritable risk factors may be related to inflammatory or immune mechanisms that, if rendered ineffective or hyperactive, could enhance the pathogenic potential of plaque bacteria in susceptible individuals³. Investigators currently are attempting to identify genetic factors that act to enhance susceptibility to PD⁴⁻⁷. It is clear that identification of important genetic and microbial factors will help in the classification, diagnosis, and treatment of periodontal diseases^{4,8}. With the advent of molecular epidemiology it is now realistic to consider study designs that permit evaluation of individual risk profiles including both, host genetic and environmental components⁹.

A key feature of periodontal diseases is loss of alveolar bone. Recent research suggests that osteopenia may be a predisposing factor for periodontal disease by increasing susceptibility to the effects of periodontal disease-mediated oral bone loss¹. The etiology of generalized osteopenia is multifactorial and includes a number of established risk factors for periodontal disease, such as: age, smoking, menopause, gender, and certain medications^{1,2}.

Genetic polymorphisms in genes which encode mediators of bone homeostasis have been shown to be associated with parameters of bone mineral density and incidence of common disorders of bone metabolism, in particular osteoporosis¹⁰⁻¹². Peak bone mass, one of the major determinants of future bone density, has been shown to be strongly inherited. Some authors¹³⁻¹⁴ showed that polymorphisms of the vitamin D receptor (VDR) gene could

be a marker of this inheritance and that genotyping may provide a clue to predisposition to low bone mass.

It is important to note that periodontal disease and development of osteopenia/osteoporosis have some common pathological mechanisms involving disruption of bone homeostasis. It is therefore reasonable to hypothesize that they may share genetic risk factors⁸⁻⁹. The development of a specific disease may depend on the coincidence of multiple genetic determinants with specific environmental elements, that in the periodontal disease correspond to certain oral bacteria¹⁵.

Genetic polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene are also associated with parameters of bone homeostasis and with diseases in which bone loss is a cardinal signal⁸. As progressive bone loss is the ultimate result of PD, the aim of this study was to investigate whether the frequencies of two single nucleotide polymorphisms (SNPs), designed by the *TaqI* and *BsmI* restriction enzymes, could be associated with chronic PD.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

A sample of 113 unrelated, non-smoking subjects ranging in age from 29 to 74 years (mean age, 42.2 years), were recruited for this study from the patient pool at the Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba – UNICAMP. The patients are from the Southeastern region of Brazil who signed a consent form that was approved by the Ethical Committee in Research at FOP/UNICAMP (protocol 43-A/2000). 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. 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; current pregnancy or lactation⁵. Diagnosis and classification of the disease severity were established on the basis of clinical parameters consisting of physical examination, medical and dental history, probing depth, assessment of attachment loss (CAL), tooth mobility and observation of bleeding on probing. Measurements of probing depth and attachment level were recorded at 6 points around each tooth. Subjects were included in the following clinical categories:

- 1) *Control group*: Subjects exhibiting no signs of periodontal disease determined by the absence of clinical attachment loss and no sites with probing depth >3 mm (n = 44).
- 2) *Periodontal disease*: Patients with teeth presenting levels ≥ 3 mm CAL (n = 69).

Sample Collection and DNA Extraction

Cells were obtained through mouthwash with 3% glucose solution and scrapings of the buccal mucosa with a sterile wood spatula. DNA was extracted from epithelial buccal cells with sequential phenol/chlorophorm solution and precipitated with salt/ethanol solution¹⁶.

Analysis of VDR – TaqI Site Polymorphism

The first VDR region with 340 pb was amplified by PCR utilizing the primers corresponding to sequences in intron 8 (F -5' CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G 3') and exon 9 (R -5' GGA TGT ACG TCT GCA GTG TG 3')⁸.

Reaction conditions and cycling parameters were as follows: 400 to 500ng of genomic DNA was used for PCR amplification in reaction mixture containing 10 x reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1µM of each primer, and 2U Taq Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The reactions were performed in a *Perkin-Elmer GeneAmp* 2400 thermal cycler and consisted of an initial denaturation step of 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 45 seconds, 63°C for 1 minute, 72°C for 75 seconds, and a final extension of 72°C for 7 minutes.

Ten µL of the PCR fragment was subject to restriction enzyme digestion using 1U *TaqI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) at 37°C O.N. and the resulting fragments were separated by 10 % polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was stained by rapid silver staining method¹⁷. The RFLP is formed by a single base transition (T→C) at codon 352 in exon 9 of the VDR gene that creates a *TaqI* restriction site. The alleles, which result from this change are designated “t” (*TaqI* site present, with 2 fragments: 260 bp and 80 bp) or “T” (*TaqI* site absent).

Analysis of VDR – BsmI Site Polymorphism

The second VDR region was amplified by PCR and digestion of PCR products were performed as described previously¹⁴. Specific oligonucleotide primers (F -5'CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA 3' and R -5'AAC CAG CGG GAA GAG

GTC AAG GG 3') were utilized with PCR to amplify the fragment of the VDR gene including the *BsmI* restriction site in intron 8. PCR was performed using denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 1 minute, 63°C for 1 minute, 72°C for 1,5 minute and a final extension at 72°C for 7 minutes. PCR products were digested with 1U *BsmI* (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) at 65°C overnight. The resulting fragments were separated by 10 % polyacrylamide gel electrophoresis and stained by rapid silver staining method. The alleles which result from the cleavage of *BsmI* are designated "b" (*BsmI* site present, with 2 fragments: 603 and 194 pb) or "B" (*BsmI* site absent, with a fragment: 872pb).

Statistical Analysis

The significance of the differences in observed frequencies of each polymorphism in Control and PD groups was assessed by standard Chi-squared (χ^2) and using the CLUMP program that employs MONTE CARLO simulations¹⁸. The use of Monte Carlo method avoids the need for a BONFERRONI correction and the difficulty of assessing the significance of rarer alleles. The CLUMP program is designed for use in genetic case-control studies where multiple alleles are being considered and the observed frequencies of some alleles are rare¹⁹. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The risk associated with individual alleles or genotypes was calculated as the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) using SAS statistical package (v.6.11).

The high proximity of the *TaqI* and *BsmI* SNPs justify the simultaneous analysis as haplotypes. In order to calculate haplotype frequencies, gene heterozygosity, Hardy-Weinberg expectations and linkage disequilibrium it was used the computer program package ARLEQUIN²⁰.

RESULTS

Frequency Analysis in the Control and Chronic Periodontitis group

The frequencies of the alleles and genotypes of the VDR-*TaqI* and VDR-*BsmI* can be observed in table 2. Significance difference between Control and PD groups, analyzing alleles and genotypes, was found only in the genotype of VDR *TaqI* ($p = 0.016$). The calculus of the odds ratio (OR) revealed that individuals with any form of “t” allele (Tt or tt genotypes) seemed to be 2.4 times more susceptible to Periodontal Disease (OR = 2.4; 95% CI = 1.10-5.21). It was observed that the heterozygous genotype “Tt” was prevalent in the PD group (59.4%).

Considering the two single nucleotide polymorphisms (SNPs) independently, the genotype distributions were consistent with the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium in the Control group.

Haplotype Frequencies

It was observed that the two SNPs exhibit strong linkage disequilibrium and appear in four potential haplotypes presented in table 3. The distribution of the haplotype frequencies showed a difference statistically significant ($p = 0.02$) between Control and PD groups (Table 3). There was a predominance of the haplotype “Tb” in Control group (43.2%) and a predominance of haplotype “TB” in PD group (36.6%). Analyzing this result using the calculus of OD, we found that patients with “TB” haplotype are two times more likely to develop PD than the “Tb” individuals (OR = 2.19 – 95% CI=1.12 – 4.28).

There was high percentage of heterozygosity in both studied groups (Control = 0.7032 +/- 0.0266; PD = 0.7211 +/- 0.0132). These results reveal the importance of the organization of the haplotype data arranged as genotypes showed in Table 4. There was significant difference in the frequency of haplotypes in the sample ($p=0.05$). There was predominance in “Tb/Tb” genotype in Control group (31.8%) and a high frequency in “TB/tb” genotype in PD group (49.3%). Subjects with the heterozygous haplotype “TB/tb” seemed to be over than four times more likely to develop PD than Tb/Tb individuals (OR = 4.32; 95% CI = 1.50 – 12.47).

DISCUSSION

Periodontitis is a chronic multifactorial disease that is caused primarily by microorganisms present in the plaque adjacent to the gingiva. Like many chronic diseases, periodontitis may be polygenic. Different genes may influence different aspects of the disease pathology⁶, also studies indicating that osteopenia and systemic bone loss are related to loss of alveolar bone and clinical attachment and teeth²¹⁻²³ lend further support to the concept that genes involved in systemic bone homeostasis may have an important role in the progression of periodontal disease.

Vitamin D exerts its genomic action via the nuclear vitamin D receptor (VDR), which shows an extensive polymorphism. The VDR belongs to the steroid receptor superfamily and is widely expressed in many cell types, including lymphocytes, macrophages, and pancreatic B-cells²⁴. The molecular mechanisms in which bone density is regulated by the vitamin D receptor gene are not certain, although allelic differences in the 3'

untranslated region may alter messenger RNA levels¹⁴. A higher bone density is associated with the “b” allele of the VDR gene¹⁴.

The genotype and allele frequencies of *TaqI* VDR found in this study with a group formed by PD patients versus the healthy individuals were similar to the findings presented by Henning et al (1999)⁸ where, in a cross-sectional study, the “t” allele in the *TaqI* RFLP of the VDR gene showed to be more common in patients with localized "aggressive periodontitis" (EOP). Also Sun et al (2002)²⁵ studying patients with EOP showed that the frequencies of “Tt” genotype and “t” allele were significantly higher in EOP patients. In chronic periodontitis, we found that patients with some form of the allele “t” (“Tt” or “tt”) were 2.4 times more susceptible to the disease than patients with lack of this allele.

The genotype and allele frequencies of *TaqI* VDR found in the our results were different when compared to other VDR studies evaluated in different populations. Other authors⁶ reported a frequency $\cong$ 40% in “TT” genotype and 20% in “tt” genotype and Zhao et al (1997)²⁷, who studied a Chinese population, reported a high frequency of “T” allele (95%) and low frequency of patients with “t” allele (5%), indicating that different populations may be the reason for different frequencies.

Similar to our study, some authors²⁸ did not find significant differences in the distribution of VDR *BsmI* between groups of patients with PD and control, however, our results differ from their in relation to the frequencies of the genotypes, where we found a higher frequency for the “b” allele. Another study²⁹ with Brazilian population showed a significant correlation between the VDR *BsmI* genotype and Bone Mineral Density (BMD) in health Brazilian premenopausal females, where the genotype frequency of the VDR *BsmI* was similar to our data. Moreover, the ethnic frequencies in the two studies were

similar, comprising 77.0% of Caucasians in the total studied individuals (Table 1). Our data showed that patients presenting “TB” haplotype or “TB/tb” haplotype genotype were more susceptible to periodontal disease than the others. This is the first study that analyzed the haplotype formed by the SNPs VDR *TaqI* and VDR *BsmI* and periodontal disease. Others have been showed the association between periodontal disease and VDR *BsmI* and immunoglobulin-Fcγ receptor²⁸ or VDR *TaqI* and VDR *ApaI*⁶. Others³⁰ have found no association between bone loss and polymorphisms of the *BsmI*, *ApaI* or *TaqI* markers.

In conclusion, the present study showed that *TaqI* SNP of the VDR gene and the haplotypes “TB” and “TB/tb” were associated with clinical attachment loss in chronic periodontal disease in the studied population. Analysis of the VDR genotype could be a useful risk marker for predict susceptibility to periodontal disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FAPESP grants 00/04487-1 and 01/13998-2

REFERENCES

1. Jeffcoat MK, Chesnut CH. Systemic osteoporosis and oral bone loss: Evidence shows increased risk factors. *J Am Dent Assoc* 1993;124:49-56.
2. Mohammad AR, Jones JD, Brunsvold MA. Osteoporosis and periodontal disease: A review. *J Calif Dent Assoc* 1994;22(3):69-75.

3. Schenkein HÁ, Van Dyke TE. Early-onset periodontitis: Systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol 2000* 1994;6:7-25.
4. Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleucine-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24(1):72-77.
5. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr. RB, Line SRP. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29(7):587-91.
6. 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;74:161-167.
7. Trevilatto P, Scarel-Caminaga R, De Brito R, De Souza A, Line S. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003;30(5):438-442.
8. Hennig BJW, Parkhill JM, Chapple ILC, Heasman PA, John JT. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases *J Periodontol* 1999;70:1032-1038.

9. Hart TC. Genetic Risk Factors for Early-Onset Periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:355-366.
10. Gross C, Eccleshall TR, Feldman D. Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press; 1996:917-933.
11. Grant SFA, Ralston SH. Genes and osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 1997;8:232-236.
12. Morrison N. Vitamin D receptor gene variants and osteoporosis: a contributor to the polygenic control of bone density. In: Feldman D, ed. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 1997:713-731.
13. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992;89:6665-6669.
14. Morrison NA, Cheng JQ, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367:284-287.
15. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:233-9
16. Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR. Amplification of large DNA fragment. *J Forensic odontostomatol* 2000;18(1):6-9.

17. Sanguinetti CJ, Dias EN, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17:915-919.
18. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics* 1995;59:97-105.
19. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL-1 genotypes in European Caucasians with generalized early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:430-436.
20. Schneider, S; Roessli, D; Excoffier, L. ARLEQUIN ver. 2000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
21. Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, et al. the role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67(Suppl.):1076-1084.
22. Ronderos M, Jacobs DR, Himes JH, Pihlstrom BL. Associations of periodontal diseases with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: Cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol* 2000;27:778-786.
23. Krall EA, Garcia RI, Dawson-Hughes B. Increased risk of tooth loss is related to bone loss at the whole body, hip, and spine. *Calcif Tissue Int* 1996;59:433-437.

24. Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992;13:719-764.
25. Sun JL, Meng HX, Cao CF, Tachi Y, Shinohara M, Ueda M, Imai H, Ohura K. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodont Res* 2002;37:263-267.
26. Weyant RJ, Pearlstein ME, Anthony PC, Forrest K, Pouran F., Cauley JA. The Association Between Osteopenia and Periodontal Attachment Loss in Older Women. *J Periodontol* 1999;70:982-991.
27. Zhao J, Zhou X, Meng X et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in China. *Chin Med J* 1997;110:366-371.
28. Yoshihara A, Sugita N, Yamamoto K, Kobayashi T, Miyazaki H, Yoshie H. Analysis of vitamin D and Fcy receptor polymorphism in Japanese patients with generalized early-onset periodontitis. *J Dent Res* 2001;80(12):2051-2054.
29. Lazaretti-Castro M, Duarte de Oliveira MA, Russo EMK, Vieira JGH. Vitamin D receptor alleles and bone mineral density in a normal premenopausal Brazilian female population. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:929-932.
30. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Arlot ME, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss and bone

mass in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res*
1996;11:827-834.

TABLES

Table 1. Baseline clinical parameters of the subject population.

	Healthy (n=44)	PD ^b (n=69)	Total (n=113)
<i>Age (years)</i>			
Mean ($\pm$ SD ^a)	43.7(14.1)	41.0(12.5)	42.2(9.9)
<i>Gender %</i>			
Female	30(68.2)	57(82.6)	87(77.0)
Male	14(31.8)	12(17.4)	26(23.0)
<i>Ethnic Group %</i>			
Caucasoid	37(84.1)	50(72.4)	87(77.0)
Afro-American	3(6.8)	10(14.5)	13(11.5)
Mulatto	3(6.8)	9(13.1)	12(10.6)
Japanese	1(2.3)	0	1(0.9)

^a Standard Deviation; ^b Periodontal Disease;

Table 2 - Distribution of the VDR single nucleotide polymorphisms (SNP) TaqI site and Bsm I site alleles and genotypes among the patients of the control and patients with periodontal disease (PD).

SNP ^a	Control	PD ^b	Chi-squared	Odds Ratio
TaqI				
<i>Allele n(%)</i>	n = 88	n = 138		
T	62 (70.4)	87 (63.0)	$\chi^2 = 1.31$	
t	26 (29.6)	51 (37.0)	$p = 0.316$	
<i>Genotype n(%)</i>	n = 44	N = 69		
TT	24 (54.5)	23 (33.3)		(TT vs Tt+tt)
Tt	14 (31.8)	41 (59.4)	$\chi^2 = 8.23$	OR = 2.4 $p=0.041$
tt	6 (13.7)	5 (7.3)	$p = 0.016$	IC 95% = 1.10< μ <5.21
BsmI				
<i>Allele n(%)</i>	n = 88	n = 138		
B	34 (38.6)	63 (46.6)	$\chi^2 = 1.08$	
b	54 (61.4)	75 (43.4)	$p = 0.367$	
<i>Genotype n(%)</i>	n = 44	N = 69		
BB	8 (18.2)	10 (14.5)		
Bb	18 (40.9)	43 (62.3)	$\chi^2 = 5.315$	
bb	18 (40.9)	16 (23.2)	$p = 0.07$	

^aSingle-Nucleotide Polymorphism; ^bPeriodontal Disease

Table 3 – Frequency of the haplotypes of the VDR gene in Control and with Periodontal Disease.

Haplotypes	Control (n=44)	PD ^a (n=69)
TaqI BsmI	n (%)	n (%)
TB	24 (27.3)	50 (36.3)
Tb	38 (43.2)	36 (26.1)
TB	12 (13.6)	14 (10.1)
Tb	14 (15.9)	38 (27.5)
Chi-squared	p = 0.02	
Haplotypes		
Tb	38 (43.2)	36 (26.1)
TB	24 (27.3)	50 (36.3)
Odds Ratio	2.19 (95% CI = 1.12 – 4.28)	

^a Periodontal Disease

Table 4 – Genotype frequencies of putative VDR haplotypes in Control and with Periodontal Disease (PD).
n=113

Genotypes	Control (n=44)	PD ^a (n=69)
TaqI BsmI/TaqI BsmI	n (%)	n (%)
TB/tB	1 (2.3)	4 (5.8)
TB/tb	10 (22.7)	34 (49.3)
TB/Tb	7 (15.9)	10 (14.5)
Tb/Tb	14 (31.8)	11 (15.9)
Tb/tb	3 (6.8)	4 (5.8)
TB/tB	5 (11.4)	5 (7.2)
TB/TB	3 (6.8)	1 (1.5)
TB/tb	1 (2.3)	0 (0.0)
<i>p</i> value (CLUMP)	0.05	
Genotype		
Tb/Tb	14 (31.8)	11 (15.9)
TB/tb	10 (22.7)	34 (49.3)
<i>p</i> Value (Chi-squared)	0.00	
Odds Ratio	4.32 (95% CI = 1.50 – 12.47)	

^a Periodontal Disease

ARTIGO 2: Journal of Dental Research - Submitted

Title: “Relationship Between HLA-DRB1 Gene Polymorphism and Periodontitis”

R.B.Brito Jr.¹, P.C.Trevilatto², R.M.Scarel-Caminaga³, A.P. Souza³, S.P. Barros^{1*}.

¹Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil; ²School of Dentistry Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil; ³University of the Sacred Heart, Bauru, SP, Brazil; *Corresponding Author.

Address (corresponding author):

Silvana Pereira Barros

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP Departamento de Morfologia

Av. Limeira, 901 CEP: 13414-018 Piracicaba – SP Brazil

Telephone number: +55(019) 3412-5381

Fax number: +55 (019) 3412-5218

Email: sbarros@fop.unicamp.br

- 1) **SHORT TITLE:** HLA-DRB1 and periodontitis
- 2) **KEY WORDS:** HLA, PCR-RFLP, periodontal disease, polymorphism.
- 3) **NUMBER OF WORDS IN THE ABSTRACT:** 149
- 4) **NUMBER OF WORDS IN THE ABSTRACT AND TEXT:** 2362
- 5) **NUMBER OF TABLES:** 2
- 6) **NUMBER OF CITED REFERENCES:** 23

ABSTRACT

Periodontitis is a disease caused by interactions among some factors. It is therefore, of interest to investigate the nature of host factors since they reveal important information regarding the periodontal disease (PD). The susceptibility of some infectious diseases with immune aspects may have genetic association with HLA. The aim of this study was to determine whether PD is associated with a polymorphism in the HLA-DRB1 gene. DNA was extracted from buccal epithelial cells of 87 unrelated adult individuals: 37 healthy individuals (control group), 24 patients with moderate periodontitis and 26 with severe periodontitis. The HLA polymorphism was analyzed by PCR/RFLP (*Hph*I). Significant differences in the allele ($p=0.004$) and genotype ($p=0.004$) frequencies of the polymorphism were found between control and groups with periodontal disease. Such findings suggest that the RFLP (*Hph*I) of the HLA-DRB1 gene can be useful as a marker of susceptibility to PD in the population studied.

INTRODUCTION

Risk factors for periodontitis have been extensively reviewed and related to a variety of factors such as specific bacterial pathogens, environmental factors and some individuals aspects (Genco *et al.*, 1996). In addition, genetic factors based on polymorphisms and inflammatory responses have been recently identified (Kornman *et al.*, 1997). Periodontal diseases (PD) are among the most common human chronic diseases and affect roughly one third of adults (Dini *et al.*, 1994). Although advanced periodontal destruction affects only one in eight persons, its prevalence increases to over one third among older individuals (55 to 65 years of age) (Dini *et al.*, 1994).

Different individuals show considerable differences in the susceptibility to and in the severity of PD (Page, 1999) since a number of host factors may modulate PD initiation and progression, influencing inflammatory and immunological responses, and others (Williams, 1990). Many of these variables are genetically determined, and therefore it is not unreasonable to infer that host genotype may influence susceptibility to periodontitis. There are indications that more than half of the increased susceptibility to PD may depend on genetic factors (Page, 1999).

Genetic polymorphisms in genes that encode mediators of inflammation, like interleukin-2 (Scarel-Caminaga *et al.*, 2002), interleukin -6 (Trevilatto *et al.*, 2003) and HLA (Hodge *et al.*, 1999) have been shown to interfere in the occurrence and severity of PD.

The susceptibility to certain diseases involving the immune response, such as PD, has been investigated in relation to distinct HLA types (Hodge *et al.*, 1999; Ohyama *et al.*, 1996; Bonfil *et al.*, 1999). Since the major histocompatibility complex (MHC) plays a

critical role in the immune system, this should have profound effect on immunogenetic susceptibility to various diseases which are influenced by immune reactions (Tiwari *et al.*, 1985). Differences in HLA molecules, result in individual differences in immune reactions with a variable degree of responsiveness (Tiwari, 1985), such characteristics have been used to diagnose a number of immune diseases such as rheumatoid arthritis (Constantin *et al.*, 2002).

Given the immuno-inflammatory aspect of periodontitis, HLA is thought to play a critical role in the installation and progress of the disease. Therefore, this study aimed to investigate the association of a polymorphism of the HLA-DRB1 gene with periodontal disease.

MATERIAL AND METHODS

Subject Selection

87 adult caucasian subjects from Southeastern region of Brazil, were unrelated, non smoking, >25 years of age (mean age 42.2), were studied from the patient pool at the Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba – UNICAMP (approved by the Ethical Committee in Research at FOP/UNICAMP). The baseline clinical parameters for the subject population are presented in table 1. The criteria of exclusion and diagnosis were described elsewhere (Scarel-Caminga *et al.*, 2002). Subjects were divided into the following categories according to PD severity: 37 healthy individuals (control group), with no signs of disease, 24 subjects with moderate periodontitis and 26 patients with severe periodontitis.

Sampling

DNA was obtained from epithelial buccal cells and the extraction process was performed as described by Trevilatto *et al.*(2000).

PCR/RFLP (Polymorphism in the second exon of the HLA DRB1 gene)

The following primers were used (M-Ota *et al.*, 1992):

5'-TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG -3' (*foward*)

5'-CCGCTGCACTGTGAAGCTCT - 3' (*reverse*).

Amplification reactions were carried out with genomic DNA (500 ng) in a total volume of 50 μ L, containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 μ M of each primer, 200 μ M each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2.5 mM MgCl₂, and 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), with the following cycling conditions: denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 59°C for 45 s, 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 7 minutes. The products were digested with 3 U *per* 25 μ L reaction of *HphI* at 37°C O/N to detect allele 1 (261 bp), allele 2 (145 bp, 109 bp and 7 bp), allele 3 (254 bp and 7 bp) and allele 4 (145 bp and 116 bp).

Electrophoresis Gel

Restriction products were visualized by electrophoresis on vertical 10% nondenaturing polyacrylamide gels in 1X TBE (89 mM Tris-Borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), followed by silver staining (Bio-Rad Silver Stain Kit).

Statistical Methods

The distribution of genotype and allele frequencies in the PD patients and control group was compared using standard χ^2 test. The risk associated with individual alleles and genotypes was calculated as the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals.

RESULTS

Around twenty-two percent (21.8%) of the 87 individuals studied were homozygous for the allele 1; 56.3% had the genotype 1/2; 19.6% were homozygous for the allele 2, and only 2.3% had the 2/3 genotype. No individual presented the allele 4.

The frequency of the alleles and genotypes are shown in table 2. There was a highly significant difference among the three groups ($p=0.004$), showing that the allele 2 was associated with periodontal disease in the study population. There was significant difference in the genotype distribution between healthy control and periodontitis patients ($p=0.004$) showing that the genotype 2/2 was associated with the disease.

Analysis of the allele distribution indicated that individuals who presented allele 2 were at least three times more susceptible (healthy vs moderate + severe) to PD than individuals who showed to lack such allele (OR = 3.2; 95% CI = 1.7-6.1). Besides, these individuals showed the development of the severe form of PD in a ratio of 2:1 when compared to the other two groups (healthy + moderate vs severe - OR= 2.3; 95% CI = 1.2 – 4.5).

Individuals with the genotype 2/2 seem to be approximately 7.5 times more susceptible to develop periodontal disease (healthy vs moderate + severe) than individuals with 1/1, 1/2 and 2/3 genotypes (OR = 7.5; 95% CI = 1.6 – 35.2). And these individuals (2/2) demonstrated to be 3.5 times more susceptible to the severe form of PD than the others (healthy + moderate vs severe - OR = 3.5; 95% CI = 1.1 – 10.5).

DISCUSSION

Genetic polymorphisms may be retained in the population and confer advantage to the individual by providing greater flexibility in regulation of homeostasis, as well as to offer a protective element against some immune-mediated diseases, however, such advantage may

be counter-balanced by an increased susceptibility to certain diseases such as those involving tissue inflammation (Daser *et al.*, 1996).

In our study, we found a significant difference in the genotype and allele frequency of HLA-DRB1 (*Hph I*) gene among the healthy group and the groups with periodontitis in the genotype and allele frequency. Our results indicate that the allele 2 predisposes the patients to a greater susceptibility and severity to PD, so that such allele was highly represented in the moderate and in the severe groups. The HLA-DR expression in patients with periodontitis was investigated in a few studies and it has been suggested that some specific alleles, which increase the expression of such antigen, may predispose the patients to the development of PD (Katz *et al.*, 1987). Some other reports found a significant higher level of HLA-DR in patients with PD than in healthy patients (Firatli *et al.*, 1996; Gargiulo *et al.*, 1985). These observations are consistent since some HLA-DRB1 genotypes might have an accelerated T cell response to certain pathogenic bacteria in hyper-immune reactions, thus increasing susceptibility to PD (Takashiba *et al.*, 1999). However, our data demonstrated that the allele 1 of the HLA-DRB1 (*Hph I*) was present in the majority of the patients of the healthy group, suggesting that such allele may have a protective role in the PD manifestation. Some authors emphasized that different mechanisms may operate in different HLA disease associations (Firatli *et al.*, 1996). It has been also suggested that an increase in the expression of HLA-DR molecules, in periodontitis patients, might be utilized as one of the diagnostic criteria for determination of disease (Gargiulo *et al.*, 1985). HLA-DR was also highly present in patients with rheumatoid arthritis, an inflammatory disease that in relation to the presence of persistent inflammation is similar to periodontitis (Gargiulo *et al.*, 1985). Regarding to the genotype analysis we found that patients that were homozygous to allele 2, presented a high relative risk (OR= 7.5) of periodontitis

development and an odds ratio equal to 3.5 favoring the development of the severe form of PD. Specifics genotypes for HLA-DRB1 were investigated in PD patients, however, none of the studied genotypes correlated significantly with the disease in this study (Ohyama *et al.*, 1996) however, Bonfil *et al.* (1999) detected some genotypes in severe forms of periodontal disease and in rapidly progressive periodontitis.

There have been reports associating PD and other types of HLA (Hodge *et al.*, 1999; Ohyama *et al.*, 1996; Takashiba *et al.*, 1994). Intronic HLA-DQ gene variations have been considered useful gene markers for a subpopulation of early-onset periodontitis and may affect immune reactions such as antigen recognition (Takashiba *et al.*, 1994). It has been also suggested that the DQB1 molecule plays a crucial role in the pathogenesis of PD (Ohyama *et al.*, 1996). Thus, the susceptibility to PD might be determined by the binding ability between the peptide and HLA-DQ antigens (Ohyama *et al.*, 1996). Polymorphisms in HLA-DQB1 gene in Caucasians have been studied where no association with PD was found what was interpreted as a racial genetic variation in HLA allelic frequencies (Hodge *et al.*, 1999) and a natural selection in different racial groups or a linkage disequilibrium between the disease and different alleles of the HLA complex (Hodge *et al.*, 1999).

Due to the high frequency of periodontal disease in the population, the identification of genetic risk factors for this disease may have a great impact on the diagnosis and delivery of dental care (Hart, 1996). If genetic polymorphisms do interfere to the disease processes and, since polymorphisms are by definition widespread in the population, the investigation of such aspects is likely to make significant contributions to the development of novel strategies in the diagnosis, treatment and prevention of common disorders such as periodontal disease and, we propose that our findings on HLA-DRB1 gene may be used as

a marker to the susceptibility and severity to periodontal disease in the population evaluated contributing to the understanding of genetic basis for PD.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by FAPESP grants: 00/04487-1 and 01/13998-2.

REFERENCES

- Bonfil JJ, Dillier FL, Mercier P, et al (1999). A “case control” study on the role of HLA-DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology (PCR.SSO). *J Clin Periodontol* 26(2):77-84.
- Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, et al. (2002) A Collagenase-1 (MMP-1) and HLA-DRB1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal study. *J Rheumatol* 29:15-20.
- Daser A, Mitchison H, Mitchison A, Muller B (1996). Non-classical-MHC genetics of immunological disease in man and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. *Cytokine* 8:593-597.
- Dini EL, Guimarães LO (1994). Periodontal conditions and treatment needs (CPITN) in a worker population in Araraquara, SP, Brazil. *Int Dent J* 44(4):309-311.
- Firatli E, Kantarci A, Cebeci I, et al (1996). Association between HLA antigens and early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 26(6):563-566.
- Gargiulo AV, Toto PD, Robinson JA, Gargiulo AW (1985). Latex slide agglutination vs. ELISA system. Rheumatoid factor detection in inflamed human gingival. *J Periodontal Res* 20(1):31-4.

- Genco RJ (1996). Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 67:1041-1049.
- Hart TC (1996). Genetic Risk factors for Early-Onset Periodontitis. *J Periodontol* 67:355-366.
- Hart TC, Hart PS, Michalec MD, et al (2000). Localization of a gene for prepubertal periodontitis to chromosome 11q14 and identification of a cathepsin C gene mutation. *J Med Genet* 37:95-101.
- Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF (1999). No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. *Tissue Antigens* 54(2):205-207.
- Hugoson A, Jordan T (1992). Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease. *Commun Dent Oral Epidemiol* 10:187-92.
- Katz J, Coultshin J, Benouer R, Brautbar C (1987). Human Leucocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 58(9):607-410.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al (1997). The interleucine-1 genotype as a severity factor in a dult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24(1):72-77.
- M-Ota T, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H (1992). HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 39(4):187-202.
- Ohyama H, Takashiba S, Oyaizu K (1996). HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *J Periodontol* 67(9):888-94.
- Page R (1999). Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodont Res* 34(7):331-339.

- Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito Jr. RB, Line SRP (2002). Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 29(7):587-91.
- Takashiba S, Noji S, Nishimura E (1994). Unique intronic variations of HLA-DQB gene in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 65(5):379-86.
- Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y (1999). HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 34(7):374-378.
- Tiwari JL, Terasaki PI (1985). HLA and Disease Association. New York: Spring-Verlag.
- Trevilatto PC, Brito Jr RB; Scarel-Caminaga RM, Souza AP, Line SRP (2003). Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* (in press).
- Trevilatto PC, Line SRP (2000). Use of Buccal Epithelial Cells for PCR Amplification of large DNA Fragments. *J Forensic Odontostomatol* 18(1):6-9.
- Williams RC (1990). Periodontal disease. *N Engl J Med* 332:373-382.

TABLES

Table 1. Baseline clinical parameters of the subject caucasian population.

	Healthy (n=37)	Moderate (n=24)	Severe (n=26)	Total (n=87)
<i>Age (years)</i> Mean ($\pm$ SD)	43.7(14.1)	37.9(20.5)	44.2(4.5)	42.2(9.9)
<i>Gender (%)</i>				
<i>Female</i>	26(70.2)	18(75.0)	22(84.6)	66(75.8)
<i>Male</i>	11(29.8)	6(25.0)	4(15.4)	21(24.2)

Table 2 – Distribution of the HLA-DRB1 alleles and genotypes among the patients of the healthy group (H), and the groups with periodontitis moderate (M) e severe (T).

	Genotype				Odds ratio	
	n=87				1/1+1/2 vs (2/2)	
n(%)	1/1	1/2	2/2	2/3	H vs (M+S)	(H+M) vs S
Healthy	15(78.8)	19(38.7)	2(11.7)	1(50.0)	susceptibility	severity
Moderate	2(10.6)	16(32.6)	6(35.3)	0(0.0)	OR=7.5	OR=3.5
Severe	2(10.6)	14(28.7)	9(53.0)	1(50.0)	(95%IC=1.6-35.2)	(95%IC=1.1-10.5)
$\chi^2=18.13/p=0.004$						
	Alleles			Odds ratio		
	n=174			1 vs 2		
n(%)	1	2	3	H vs (M+S)	(H+M) vs S	
Healthy	49(56.3)	24(28.2)	1(50.0)	susceptibility	severity	
Moderate	20(23.0)	28(33.0)	0(0.0)	OR=3.3	OR=2.4	
Severe	18(20.7)	33(38.8)	1(50.0)	(95%IC=1.8-6.4)	(95%IC=1.2-4.7)	
$\chi^2=15.10/p=0.004$						



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Associação entre polimorfismos nos genes dos receptores de CD 14 e da vitamina D (VDR) e gravidade da doença periodontal em adultos e em famílias com periodontite de início precoce", sob o protocolo nº 43-A/2000, do(a) Pesquisador(a) **Rui Barbosa de Brito Junior**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Silvana Pereira Barros**, e Co-Orientador Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 04 de julho de 2000

We certify that the research project with title "Polymorphisms in the CD 14 receptor and vitamin D receptor gene (VDR) and the severity of the periodontal disease in and members of families with early-onset periodontitis (EOP)", protocol nº 43-A/2000, by Researcher **Rui Barbosa de Brito Junior**, responsibility by Prof. Dr. **Silvana Pereira Barros**, and Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP

Piracicaba, SP, Brazil, July 04 2000

Antonio Bento Alves de Moraes
Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP