



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ARTHUR GABRIEL DE SOUZA PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIAÇÕES GENÉTICAS RS1126478
(GENE LTF) E RS4284742 (GENE SIGLEC5) EM PACIENTES
COM PERIODONTITE GRAU C NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

PIRACICABA
2022

ARTHUR GABRIEL DE SOUZA PEREIRA

**ASSOCIAÇÃO DAS VARIAÇÕES GENÉTICAS RS1126478
(GENE LTF) E RS4284742 (GENE SIGLEC5) EM PACIENTES
COM PERIODONTITE GRAU C NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

Coorientador: Doutoranda Camila Schmidt Stolf

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELO ALUNO ARTHUR GABRIEL DE SOUZA PEREIRA E ORIENTADO PELO PROF. DR. RENATO CARRÊA VIANA CASARIN.

PIRACICABA

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P414a Pereira, Arthur Gabriel de Souza, 1997-
Associação das variações genéticas rs1126478 (gene LTF) e rs4284742 (gene SIGLEC5) em pacientes com periodontite C na população brasileira / Arthur Gabriel de Souza Pereira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Renato Corrêa Viana Casarin.

Coorientador: Camila Schmidt Stolf.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polimorfismo de nucleotídeo único. 2. Doenças periodontais. 3. Genética. 4. Lactoferrina. 5. Lectinas semelhantes a imunoglobulina de ligação ao ácido siálico. I. Casarin, Renato Corrêa Viana, 1982-. II. Stolf, Camila Schmidt, 1995-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Association of genetic variations rs1126478 (LTF gene) and rs4284742 (SIGLEC5 gene) in patients with periodontitis C in the brazilian population

Palavras-chave em inglês:

Single nucleotide polymorphism

Periodontal diseases

Genetics

Lactoferrin

Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Cirurgião-Dentista

Banca examinadora:

Gabriela Martin Bonilha

Hélvis Enri de Sousa Paz

Data de entrega do trabalho definitivo: 30-11-2022

DEDICATÓRIA

Em primeiro, dedico este trabalho a Deus, que sempre me sustentou me dando forças e sabedoria para enfrentar todas as adversidades desta jornada, e que nunca me abandonou, e a também minha família que desde sempre me apoiou em todos os momentos, me auxiliando e incentivando para que eu pudesse concluir o curso de odontologia. Em especial ao meu pai que para esta conquista ser possível me entregou muitas gotas de seu suor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Estadual de Campinas por ter me permitido vivenciar experiências únicas dentro do campus de Odontologia, pelas oportunidades que foram me dadas e pelo profissional que estou me tornando.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Renato Correa Casarin por ter me convidado a participar do projeto de pesquisa e confiado em meu trabalho.

Agradeço aos meus colegas de iniciação científica, em especial minha coorientadora doutoranda Camila Stolf, que juntos conseguimos coletar dados para que este trabalho pudesse ser feito.

Agradeço aos meus amigos de república, Heitor e principalmente ao Jonathan, que desde o primeiro dia de curso estive ao meu lado e, desde então, estivemos nos apoiando em todos os momentos bons e ruins dentro e fora da faculdade.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2021/01203-9 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta pesquisa.

RESUMO

A susceptibilidade dos indivíduos à periodontite estágio 3-4 Grau C (PerioC) é determinada por uma complexa relação entre os periodontopatógenos (desafio bacteriano) e a resposta do hospedeiro, sendo essa relação regulada por mecanismos genéticos. Estudos recentes em larga escala relataram a associação dos polimorfismos genéticos (SNPs) rs4284742 (SIGLEC5) (A>G) e rs1126478 (T>C), no gene LTF, com a Perio4C em populações europeias e asiáticas, porém, não há evidências publicadas sobre essa associação em brasileiros. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi investigar a frequência das variações rs1126478 (T>C) no gene LTF e rs4284742 no gene SIGLEC5 em grupos com PerioC e em indivíduos com saúde periodontal (SP), na tentativa de observar uma associação entre essas variações genéticas e a PerioC na população brasileira. Assim, o DNA genômico foi extraído e purificado de células epiteliais bucais obtidas por meio de bochecho com dextrose a 3%. Logo após, os genótipos foram identificados através de PCR real-time utilizando o sistema de sondas Taqman®. A diferença nas frequências genotípicas entre os grupos foi avaliada pelo teste de qui-quadrado. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando o nível de significância de 5%. Devido a intercorrências com a sonda adquirida para realização da genotipagem das amostras para o SNP, não foi possível a apresentação de resultados para esse SNP. Nesse estudo, os genótipos TC e CC para o SNP rs1126478 (T > C) apresentaram uma maior frequência para o grupo PerioC (40,2% e 29,65%, respectivamente) em comparação ao grupo SP (35,6% e 25,2%, respectivamente) (p=0.005). Assim, pode-se concluir que há associação entre o SNP rs1126478 no gene LTF e a PerioC na população brasileira.

Palavras-chave: Polimorfismo de nucleotídeo único. Doenças periodontais. Genética. Lactoferrina. Lectinas semelhantes a imunoglobulina de ligação ao ácido siálico.

ABSTRACT

The susceptibility of individuals to stage 3-4 Grade C periodontitis (PerioC) is determined by a complex relationship between the periodontopathogens (bacterial challenge) and the host response, this relationship being regulated by genetic mechanisms. Recent large-scale studies have reported the association of genetic polymorphisms (SNPs) rs4284742 (SIGLEC5) (A>G) and rs1126478 (T>C), in the LTF gene, with Perio4C in European and Asian populations, however, there is no published evidence about this association in Brazilians. Thus, the aim of the present study was to investigate the frequency of rs1126478 (T>C) variations in the LTF gene and rs4284742 in the SIGLEC5 gene in groups with PerioC and in individuals with periodontal health (SP), in an attempt to observe an association between these genetic variations and PerioC in the Brazilian population. Thus, genomic DNA was extracted and purified from oral epithelial cells obtained by rinsing with 3% dextrose. Soon after, the genotypes were identified through real-time PCR using the Taqman® probe system. The difference in genotypic frequencies between the groups was assessed by the chi-square test. All statistical analyzes were performed considering a significance level of 5%. Due to complications with the probe acquired to perform the genotyping of samples for the SNP, it was not possible to present results for this SNP. In this study, the TC and CC genotypes for SNP rs1126478 (T > C) showed a higher frequency for the PerioC group (40.2% and 29.65%, respectively) compared to the SP group (35.6% and 25 .2%, respectively) (p=0.005). Thus, it can be concluded that there is an association between the rs1126478 SNP in the LTF gene and PerioC in the Brazilian population.

Key words: Single nucleotide polymorphism. Periodontal diseases. Genetics. Lactoferrin. Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Polimorfismo rs4284742 no gene SIGLEC5	12
2.2 Polimorfismo rs1126478 no gene LTF	13
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Seleção de pacientes	18
4.2 Coleta das amostras	17
4.3 Extração de DNA	17
4.4 Genotipagem para detecção do polimorfismo	17
4.5 Análise dos resultados	17
5 RESULTADOS	19
5.1 Estudo da população	19
5.2 Quanto ao SNP rs4284742 no gene SIGLEC5	19
5.3 Quanto ao SNP rs1126478 no gene LTF	20
6 DISCUSSÃO	21
7 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	30
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	30
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	31
Anexo 3 – Iniciação Científica	32

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos elementos dentários em resposta a periodontopatógenos específicos presentes no biofilme subgengival, resultando na destruição progressiva dos tecidos ao redor dos dentes (cimento radicular, ligamento periodontal e tecido ósseo). Clinicamente, manifesta-se por perda de inserção conjuntiva, reabsorção óssea e no pior cenário, perda dentária.

Recentemente foi indicada uma nova abordagem classificatória para a periodontite. Nesta, a doença se divide em estágios e graus, podendo a antiga Periodontite Agressiva, forma particularmente grave da doença periodontal, que acomete indivíduos jovens sistemicamente saudáveis, e é caracterizada por início precoce, rápida progressão, agregação familiar dos casos e pobre resposta às abordagens terapêuticas, (Albadar, 2014; Armitage, 1999; Deas e Mealey, 2010) é classificada como Periodontite estágios 3 ou 4 Grau C (PerioC) (Caton et al., 2018). Já a antiga Periodontite Crônica, de prevalência maior, progressão mais lenta e que apresenta boa resposta à descontaminação mecânica, (Albadar, 2014; Armitage, 1999; Deas e Mealey, 2010) pode agora ser classificada como periodontite estágios 1, 2, 3 ou 4 Grau A (progressão lenta) ou Grau B (progressão moderada) (PerioAB) (Caton et al., 2018).

Sabe-se que o principal fator etiológico na iniciação de inflamação gengival e subsequentemente a destruição dos tecidos periodontais são biofilmes bacterianos. Porém a etiopatogenia da periodontite ainda não é completamente compreendida, embora acredite-se que a susceptibilidade dos indivíduos à essa doença é determinada por uma complexa interação entre microbiota, sistema imune e fatores comportamentais, sendo regulada por fatores genéticos (Laine et al., 2012). O papel dos fatores genéticos na progressão dessa doença é reforçado também por sua forte agregação familiar (Laine et al., 2012). Fatores genéticos regulam o sistema imunológico e variações genéticas podem tornar um sistema imunológico defeituoso e incapaz de se defender com sucesso de ataques por periodontopatógenos (Vieira e Albandar, 2000; Yang et al., 2009). Nesse sentido, outros estudos reportaram que os fatores genéticos poderiam ser responsáveis por aproximadamente 50% da variabilidade nos parâmetros clínicos da doença periodontal, além de estarem associados a presença de microrganismos específicos e maior produção de marcadores inflamatórios (Nibali et al., 2007 e 2013; Vieira e Albandar, 2000).

Tradicionalmente, as pesquisas genéticas na periodontia focaram na identificação de alterações genéticas específicas, principalmente de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), como fatores de risco para a periodontite, pois podem alterar a forma como os genes

relacionados à resposta imune do hospedeiro são expressos ou que suas proteínas são codificadas (Laine et al., 2014; Schaefer et al., 2010). Apesar desses esforços, os fatores genéticos que contribuem para a patogênese das doenças periodontais ainda não estão totalmente definidos (Laine et al., 2012). Nesse sentido, a evidência atual indica que a PerioC e a PerioAB são poligênicas, a exemplo de outras doenças complexas, com o envolvimento de múltiplos genes de pequeno efeito (Laine et al., 2012; Vieira AR e Albandar, 2000).

Alguns estudos têm sido realizados para identificar SNPs associados a doença periodontal (Loos, 2015; Laine et al., 2014). Entretanto, muitos deles mostraram variações, se não resultados contraditórios (Loos, 2015; Laine et al., 2014; Zhang et al., 2000). Até o momento, poucos genes foram devidamente identificados como suscetíveis. Alguns estudos relataram uma associação significativa ou sugestiva nos SNPs rs1126478 (gene LTF) e rs4284742 (gene SIGLEC5) com a doença.

Os resultados de estudos da relação do SNP rs1126478 com a periodontite até o momento se mostraram inconsistentes, uma vez que as consequências clínicas dessa alteração genética são dependentes da etnia da amostra analisada (Fine, 2015). IKUTA et al. (2013) não encontraram diferença significativa entre o polimorfismo rs1126478 com a periodontite PerioC e a PerioAB em população japonesa (Ikuta et al., 2013). Entretanto, a associação desse SNP foi validada em população italiana para periodontite crônica, em taiwaneses para periodontite agressiva e em afro-americanos com as classificações periodontite juvenil e agressiva, mas não em indivíduos caucasianos (Velliyagounder et al., 2003; Jordan et al., 2005; Wu et al., 2009; Zupin et al., 2017).

Munz et al. (2017) conduziram um estudo de GWAS em indivíduos com periodontite crônica e agressiva, alemães e holandeses. Foi observado que, para essas populações europeias, o SNP rs4284742 (A>G) no gene SIGLEC5 foi associado com ambos os fenótipos da periodontite. Os mesmos autores do estudo de GWAS, Munz et al. (2017), replicaram o estudo em uma amostra de pacientes turcos com periodontite agressiva, e nenhuma associação foi encontrada. Isso mostra a necessidade e a importância de se validar as associações genéticas reportadas anteriormente em populações independentes (Loos, 2015). Em uma mesma linha, Tong et al. (2019) também relataram a associação entre o SNP rs4284742 e a periodontite crônica em uma população chinesa, além de associá-lo, também aos parâmetros clínicos indicadores de doença.

Embora esses resultados possam ser diferentes devido a problemas metodológicos, diferentes perfis genéticos encontrados entre indivíduos de diferentes populações também pode ser um fator relevante nesses resultados contraditórios (Fine, 2015;

Zupin et al., 2017). Porque genótipo e frequências alélicas podem variar entre diferentes populações étnicas, um fator de risco genético para a suscetibilidade à doença em uma população pode não ser um fator de risco em outra população (Yang et al., 2014; Fine, 2015). Nesse contexto, os achados sobre SNPs significativos relacionados a uma doença devem ser extensivamente replicados e validados. Entretanto, ainda não há estudos que confirmem essa associação dos SNPs rs1126478 (gene LTF) e rs4284742 (gene SIGLEC5) com a doença periodontal na população brasileira. Diante do exposto, o presente estudo teve por finalidade identificar se há associação do SNP rs4284742 (A>G) no gene SIGLEC5 e do SNP rs1126478 (T>C) no gene LTF com a PerioC em pacientes da população do sudeste do Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SNP rs4284742 no gene SIGLEC5:

O gene SIGLEC5 codifica a proteína também conhecida como SIGLEC5, pertencente à família dos SIGLECs (sialic acid binding Ig-like lectin 5), imunoglobulinas do tipo lectinas que regulam as funções das células nos sistemas imunes inato e adaptativo por meio do reconhecimento de glicanos (receptores altamente prevalentes nas células do sistema imunológico) e sua ligação ao ácido siálico. O principal papel da proteína SIGLEC5, expressa principalmente por neutrófilos, é regular a ativação de células mieloides e prevenir a reatividade inadequada contra tecidos próprios, podendo, dessa forma, estar associada aos mecanismos que permeiam a resposta imune durante a progressão da periodontite (Avril et al., 2005; Crocker et al., 2007). Além disso, essa proteína também atua como um receptor transmembranar inibitório, pois promove o ligamento de ácidos siálicos e ligantes glicanos contendo ácido siálico, os quais são expressos nas superfícies de certos patógenos e bactérias. Discute-se que a SIGLEC5 medeia o crosstalk de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a perigos (DAMPs) durante a infecção e cicatrização de feridas (Pillai et al., 2012).

Recentemente, estudos de GWAS reportaram uma associação de polimorfismos em genes até então não associados a periodontite. Utilizando essa abordagem, Munz et al. (2017) conduziram um estudo de GWAS em indivíduos com periodontite crônica e agressiva, alemães e holandeses. Foi observado que, para essas populações europeias, o SNP rs4284742 (A > G) no gene SIGLEC5 foi associado com ambos os fenótipos da periodontite. O gene SIGLEC5 foi associado a um nível de significância de todo o genoma ($P < 5 \times 10^{-8}$) com estágio III generalizado de início precoce, periodontite grau C (Munz et al., 2017) e formas de início tardio mais moderado (Munz et al., 2019; Shungin et al., 2019).

Li et al., (2020) reportaram, através de um estudo que avaliou a relação funcional entre achados de estudos GWAS e estudos de análise de expressão gênica, que os SNPs rs12459542 para o gene SIGLEC5, rs12459542 para o gene SIGLEC14 foram associados à ocorrência da periodontite (Li et al. 2020). Vale ressaltar que todos os SNPs reportados nesse estudo estão localizados em regiões intrônicas, e que, apesar dessas regiões não codificarem uma proteína, variantes em íntrons podem alterar a atividade de um gene ou fazer com que uma proteína seja produzida no lugar errado ou na hora errada.

O estudo de Tong H et al (2019) replicaram resultados prévios de GWAS para o gene SIGLEC na população chinesa com periodontite crônica. Foi concluído que o alelo

alterado do SNP rs4284742, alelo G, foi significativamente associado a níveis elevados de sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Além disso, foi predito que cada cópia do alelo G pode aumentar o nível de perda de inserção clínica em aproximadamente 0,6 em média (Tong et al., 2019).

Vale ressaltar que o estudo, ainda não publicado, conduzido pela professora Luciana M. Shaddox, na University of Kentucky College of Dentistry, foi o primeiro trabalho a relatar a associação do SNP rs4284742 (A>G) no gene SIGLEC5, mais precisamente do Alelo G, à periodontite agressiva localizada (LAP) na população Americana. Nesse estudo foi demonstrado uma associação deste SNP com a periodontite agressiva. Sendo assim, a confirmação e reprodução desta análise na população brasileira irá resultar na melhor compreensão da patogênese da doença, e futuramente permitir a identificação de indivíduos mais susceptíveis ao seu desenvolvimento, possibilitando a implementação de abordagens preventivas (Laine et al., 2014).

2.2 SNP rs1126478 no gene LTF:

A lactoferrina, também conhecida como lactotransferrina, é uma metaloproteína multifuncional, que é membro da família transferrina (Garcia-Montoya et al., 2012). A lactoferrina humana é codificada pelo gene LTF. A lactoferrina é produzida pelas células epiteliais da mucosa e amplamente encontrada em vários fluidos secretores, como leite, saliva, lágrimas, suor e secreções nasais (Garcia-Montoya et al., 2012). Além disso, essa proteína é produzida por grânulos secundários de neutrófilos e é liberado em resposta à inflamação, sendo conhecida como “quelante de ferro metálico” com a capacidade específica de se ligar ao ferro, (Gorr e Abdolhosseini, 2011) trabalhando na defesa do hospedeiro. Além disso tem capacidade bacteriostáticas/bactericidas, modulando a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (Lengrand et al., 2005 e 2006; Arnold et al., 1977 e 1981).

Existem evidências publicadas que apontam relações entre a lactoferrina e doenças periodontais. A lactoferrina pode ser expressa pelas células da mucosa oral e tem o potencial de ação contra patógenos envolvidos na suscetibilidade da periodontite (Zupin et al., 2017). Atrelado a isso, o estudo de Yadav et al (2014) relatou que pacientes periodontais apresentam maiores níveis de lactoferrina no fluido crevicular e que essa alta concentração reduz significativamente após a terapia periodontal (Yadav et al, 2014). A quantidade de lactoferrina está fortemente associada com a quantidade de neutrófilos (PMNs) no fluido crevicular gengival de pacientes, sendo considerada um marcador para o número de neutrófilos creviculares (Wu et al., 2009).

SNPs no gene LTF vêm sendo reportados para regiões gênicas codificantes e não codificantes (Teng e Gladwell, 2006). Um estudo associou múltiplas variantes genéticas da lactoferrina com o risco de cárie dentária, uma vez que a lactoferrina pode bloquear a formação de biofilme estimulando espasmos, o que resulta em bactérias vagando e impede a formação de aglomerados de bactérias e biofilmes (Singh et al., 2002). Além da função antibacteriana, a lactoferrina também é envolvida em várias funções fisiológicas, como absorção do ferro e modulação da resposta imune, afetando assim o desenvolvimento da cárie dentária (Hao et al., 2019).

O SNP rs1126478, especificamente, vem sendo explorado na literatura mundial. A associação desse SNP com a ocorrência da periodontite foi validada em população italiana para periodontite crônica e em taiwaneses para periodontite agressiva (Wu et al, 2009; Zupin et al, 2017). Para população afro-americana, Velliyagounder et al. (2003) relataram associação do rs1126478 e a periodontite juvenil. Jordan et al. (2005), por sua vez, encontraram em outra população afro-americana a mesma relação descrita por Velliyagounder et al. (2003), mas essa relação não pode ser validada para a amostra caucasiana analisada em seu estudo.

Esse SNP é responsável pela substituição de um aminoácido Lysina por uma Arginina na posição 29 na região N-terminal da lactoferrina humana (Velliyagounder et al., 2003). Velliyagounder et al. (2003), estudo o SNP rs1126478 e a periodontite juvenil localizada, sugeriram que a lactoferrina humana pode se ligar a receptores diferentes ou ligeiramente diferentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas, uma vez que, avaliando as duas variantes da lactoferrina (com e sem a variação genética), notaram que ambas exibem atividades de ligação e liberação de ferro quase idênticas e atividades bactericidas equivalentes contra uma cepa da bactéria gram-negativa *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Quando testado contra as espécies gram-positivas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*, no entanto, a lactoferrina contendo Lys na posição 29 exibiu atividade bactericida significativamente maior do que a lactoferrina contendo Arg (derivada da variação genética), sugerindo que essas duas versões da lactoferrina são funcionalmente diferentes e que essas diferenças podem contribuir para a patogênese da periodontite juvenil localizada. Esses achados são consistentes com estudos anteriores que também indicaram que essa variação genética desempenha um papel importante na doença periodontal (Marazita et al., 1994; Michalowitz et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

Investigar existência de uma associação entre os polimorfismos de nucleotídeo único rs1126478 (T>C) no gene LTF e rs4284742 no gene SIGLEC5 (A>G) com a Periodontite Grau C na população brasileira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de pacientes

A seleção dos pacientes envolvidos no presente projeto foi realizada dentro das exigências éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, no qual foi submetido o presente projeto. Após aprovação pelo CEP foram selecionados pacientes diagnosticados com periodontite Grau C, de progressão rápida, e indivíduos periodontalmente saudáveis que buscaram tratamento na clínica de periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, ou que já estejam em tratamento na referida clínica, de acordo com os seguintes critérios de inclusão (no momento do diagnóstico) e exclusão:

Diagnóstico de Periodontite Grau C (n=199): presença de bolsas periodontais verdadeiras e perda óssea radiográfica em pacientes menores de 35 anos de idade no momento do diagnóstico da doença; presença de pelo menos 8 dentes com profundidade de sondagem (PS) ≥ 5 mm (dentre os quais dois dentes devem apresentar PS ≥ 7 mm) e sangramento à sondagem em 3 dentes não contíguos à primeiros molares e incisivos; presença de pelo menos 20 dentes na cavidade oral (Casarin et al., 2012; Taiete et al., 2016);

Diagnóstico de Saúde Periodontal (n=191): ausência de profundidade de sondagem > 4 mm com sangramento gengival.

Crítérios de Exclusão: Para todos os grupos os critérios de exclusão foi: presença de alteração sistêmica (diabetes, cardiopatia, hepatite, etc.) ou uso de medicamentos (tais como antibióticos, anti-inflamatórios de uso contínuo, fenitoína, ciclosporina) que possam influenciar na resposta ao tratamento periodontal, nos 6 meses anteriores ao estudo; realização de tratamento periodontal incluindo instrumentação subgengival nos 6 meses anteriores ao estudo; hábito tabagista, gravidez ou período de lactação.

O tamanho amostral foi baseado no estudo populacional trabalho conduzido pela professora Luciana M. Shaddox, University of Kentucky College of Dentistry, na população norte-americana. Neste, foi utilizado um N de 112 pacientes com LAP e 130 pacientes controle (saúde periodontal), sendo que para essa população foi relatada uma associação entre o Alelo G (SNP rs4284742) com a doença LAP. Ressalta-se que esse é o único estudo em população semelhante à atual, permitindo uma análise mais confiável. Além disso, temos em nosso banco de amostras de DNA de 200 indivíduos com PerioC e 200 controles saudáveis, representando o N final deste estudo.

4.2 Coleta das amostras

Os pacientes realizaram bochecho com 5 mL de dextrose a 3% durante 1 minuto. Após, a solução foi centrifugada durante 10 min à 3000 rpm para sedimentação das células epiteliais bucais, conforme descrito por Trevilatto e Line (2000).

4.3 Extração de DNA

As amostras de células epiteliais bucais foram incubadas a 55°C overnight em 1 mL de solução de lise [10mM Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, 5mM EDTA] com 10 µL proteinase K (20 mg/ ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após a incubação, as proteínas e contaminantes foram removidas pela adição de 500 µL de solução de acetato de amônio 8M e EDTA 1mM. O DNA genômico foi precipitado com 540 µL de isopropanol. Depois, o DNA foi lavado em etanol 70% e ressuspenso em 50 µL de TE pH 8.0 (10 mM Tris e 1 mM EDTA). Ao final, a quantidade de DNA purificado e sua concentração foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria Nanodrop (Thermo Scientific).

4.4 Genotipagem para detecção dos polimorfismos

Foram estudado o SNP rs4284742 no gene SIGLEC5 e o SNP rs1126478 no gene LTF. Os genótipos para esses SNPs foram determinados através da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) em Tempo Real, utilizando o sistema de sondas Taqman® para discriminação de alelo (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). O TaqMan PCR foi realizado num volume de 12 µL (3ng de DNA, 1X TaqMan master mix, 1 x mix de ensaio, 900nM de cada primer e 200nM de cada sonda) e distribuídos em 96 poços. A fluorescência da amplificação do PCR foi detectada utilizando-se StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e analisada com o software do fabricante.

4.5 Análise dos Resultados

A distribuição dos genótipos para os polimorfismos foi avaliada para desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e as diferenças nas frequências genotípica e alélica de cada polimorfismo entre os grupos foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado, com auxílio do software BioEstat 5.0. Foi considerado o nível de significância de 5% como estatisticamente significativo. Para estimar as frequências haplotípicas em cada grupo foi

utilizado o software de inferência bayesiana PHASE
(www.stat.washington.edu/stephens/software.html).

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e demográficos:

A tabela 1 indica os dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo em todos os grupos dessa pesquisa, Periodontite C (PerioC) e Saúde Periodontal, onde não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à idade e etnia e parâmetros periodontais no momento do recrutamento dos pacientes e amostragem das células epiteliais bucais. A única diferença estatística observada entre os grupos foi em relação ao gênero dos participantes; o grupo PerioC apresentou mais participantes do sexo feminino do que o grupo SP ($p \leq 0,05$).

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos das populações PerioC e Saúde Periodontal.

Características	PerioC	Saúde
Idade (média \pm desvio padrão)	34.06 \pm 4.6 A	30.7 \pm 5.8 A
Gênero (% - M/F)	21 / 79 A	35.0 / 65.0 B
Etnia (C / Af / As)	16.5 / 83.5 / 0 A	13.2 / 85.2 / 1.6 A
Índice de Placa (média \pm desvio padrão)	23.10 \pm 6.53 A	19.36 \pm 5.38 A
Índice de Sangramento (média \pm desvio padrão)	24.83 \pm 9.05 A	19.39 \pm 2.31 A
Profundidade de Sondagem (média \pm desvio padrão)	2.35 \pm 0.05 A	2.13 \pm 0.23 A
Nível Clínico de Inserção (média \pm desvio padrão)	5.44 \pm 1.04 A	4.15 \pm 0.72 A

M - Masculino; F - Feminino; C - Caucasianos; Af - Afro-Americanos; As - Asiáticos; O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para análise da idade; O teste de Fisher para análise de gênero e etnia; O teste one-way ANOVA/Tukey foi utilizado para análise de Índice de Placa, Índice de Sangramento, Profundidade de sondagem e Nível Clínico de Inserção. Letras diferentes indicam diferença estatística.

5.2 SNP rs4284742 no gene SIGLEC5:

Demos início à padronização da sonda Taqman® adquirida para realizar a genotipagem das amostras para o polimorfismo rs4284742 no gene SIGLEC5 (A > G), por meio de reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. Porém, logo nas primeiras corridas, notamos que a reação indicada para a genotipagem das amostras não estava com a amplificação adequada. Foram realizadas mudanças na padronização, a fim de obter melhores resultados e representar com fidelidade o genótipo, contudo, o mesmo não foi obtido. Entramos em contato com a empresa fornecedora, e, mesmo após suas sugestões, não houve sucesso no funcionamento da sonda. Em vista do ocorrido optamos por avaliar

somente a frequência genotípica para o SNP rs1126478 (T > C), no gene LTF, para a mesma população.

5.3 SNP rs1126478 no gene LTF:

O SNP rs1126478 (LTF) mostrou associação com PerioC quando comparado ao grupo SP. A tabela 2 mostra os resultados obtidos. No grupo PerioC, as frequências genotípicas foram 40,2% para o genótipo TC, 19,1% para TT e 29,65% para CC. Já no grupo SP, as frequências de TC, TT e CC foram de 35,6%, 34,55% e 25,13%, respectivamente. Os Genótipos TC e CC apresentaram uma maior frequência na população com PerioC, sendo, portanto, associados à ocorrência dessa doença. Já o genótipo TT foi associado à uma diminuição do risco de PerioC quando comparado ao grupo SP ($p=0.005$).

Tabela 2 - Frequência genotípica (TC/ TT/ CC) do SNP rs1126478 para o gene LTF nos grupos Periodontite C (PerioC) e Saúde Periodontal (SP).

SNP rs1126478 (T>C)		PerioC (%)	SP (%)
Genótipos (TC / TT / CC) *	TC	40,2	35,6
	TT	19,1	34,55
	CC	29,65	25,13

A frequência genotípica é apresentada em porcentagem. *Indica presença de diferença estatística entre PerioC e SP ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi a associação do SNP rs1126478 (LTF) com PerioC quando comparado ao grupo SP. Esse SNP é responsável pela troca de aminoácidos na região N-terminal na alfa hélice da lactoferrina humana, região relacionada com a função antimicrobiana dessa proteína (Velliyagounder et al., 2003; Ikuta et al., 2013). Nesse estudo os Genótipos TC e CC apresentaram uma maior frequência na população com PerioC, sendo, portanto, associados à ocorrência dessa doença. No grupo PerioC, as frequências genotípicas foram 40,2% para o genótipo TC, 19,1% para TT e 29,65% para CC. Já no grupo SP, as frequências de TC, TT e CC foram de 35,6%, 34,55% e 25,13%, respectivamente. Já o genótipo TT foi associado à uma diminuição do risco de PerioC quando comparado ao grupo SP ($p=0,005$).

A análise do DNA humano é amplamente empregada em estudos genéticos de populações, sendo assim, a realização da primeira etapa do projeto foi a coleta de amostras em pacientes diagnosticados com PerioC e daqueles com ausência de histórico de doença periodontal (grupo controle), selecionados na clínica de periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, para a análise da associação das variações genéticas rs4284742 no gene SIGLEC5 e rs1126478 no gene LTF com a doença periodontal, sabendo que células epiteliais bucais são uma fonte confiável de DNA para a amplificação por PCR de fragmentos de alta massa molecular.

Após a coleta das amostras, demos início à padronização da sonda Taqman® adquirida para realizar a genotipagem das amostras para o polimorfismo rs4284742 no gene SIGLEC5 (A > G). Porém, logo nas primeiras corridas, notamos que a reação indicada para a genotipagem das amostras não estava com a amplificação adequada.

Assim, realizamos testes com alterações, realizamos discussões e reuniões com outros pesquisadores experientes da FOP e de outras universidades com as quais o presente grupo de pesquisa tem parceria na tentativa de solucionar o problema. Porém, sem obter sucesso. Assim, procuramos a assistência da empresa que fornece os produtos da linha Taqman®, A ThermoFisher Scientific. Por fim, a empresa apontou a necessidade de envio da sonda para testagem pelos técnicos e indicou a necessidade de substituição da mesma. Assim, para esse estudo foi obtido o resultado somente para o SNP rs1126478 (LTF).

O SNP rs1126478 (LTF), já foi investigado previamente em outras populações (Velliyagounder et al., 2003; Yadav et al., 2014; Jordan et al., 2005; Wu et al., 2009; Zupin et al., 2017). ZUPIN et al. (2017) que estudou a relação entre esse SNP e a periodontite crônica em uma população do nordeste na Itália, observando uma associação entre o genótipo GG

com um maior risco de desenvolver a doença. O grupo chegou à conclusão de que o alelo G, existente quando há a troca do aminoácido lisina por arginina, apresentou maior susceptibilidade para a periodontite crônica.

Os achados do estudo na população italiana têm consistência com a análise descrita por WU et al. (2009) em pacientes taiwaneses, com ancestralidade chinesa. Enquanto o alelo G possuiu significativamente uma maior frequência nos grupos PerioC (Periodontite agressiva) e PerioAB (Periodontite crônica), o alelo A apresentou redução de risco de PerioC na população taiwanesa. A metodologia desta análise incluiu pacientes fumantes, e como hábitos tabagistas influenciam na resposta do hospedeiro ao desafio periodontal, os autores realizaram ajuste nessa variante, subdividindo em outros grupos. Mesmo no grupo não fumante, o genótipo GG mostrou-se associado a maior susceptibilidade de periodontite agressiva em taiwaneses.

A presente pesquisa considerou os alelos T e C para as amostras analisadas, sendo observado a substituição de base T>C na população brasileira. A frequência genotípica TT mais presente no grupo SP e a distribuição TC e CC no grupo periodontite Grau C. Sugerimos com esse estudo que o genótipo TC e CC foi associado a PerioC em relação ao grupo de SP, e a presença do genótipo TT mostrou-se uma diminuição do risco de PerioC quando comparado ao grupo Saudável. Todas essas associações quanto a distribuições genotípicas são justificadas a partir da existência de diferença estatística entre os grupos analisados ($p = 0,005$).

Nossos resultados basearam-se em uma população brasileira com PerioC predominantemente generalizada. Em concordância com esses resultados, porém para fenótipo de PerioC localizada, temos dados preliminares da Prof. Dra. Luciana Shaddox (University of Kentucky, College of Dentistry) que analisou a relação de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória de Toll Like Receptors (TLR) em pacientes norte-americanos. Dentre os genes estudados, LTF, IL1B, IL1B, IL6 e TLR2, o polimorfismo rs1126478 no gene LTF foi o que apresentou a associação mais relevante a manifestação de periodontite agressiva localizada ($p = 0,0006$).

Considerando que diferenças étnicas influenciam de maneira significativa a composição genética individual, a realização dessas análises na população brasileira resultou na identificação da nova variante rs1126478 no gene LTF com a PerioC na população brasileira, ajudando a compreender melhor a sua patogênese, e futuramente permitindo a identificação de indivíduos mais susceptíveis ao seu desenvolvimento, possibilitando a implementação de abordagens preventivas (Laine et al., 2014). Cabe ressaltar que a

população brasileira é altamente miscigenada, acarretando a existência de heterogeneidade genética em relação a outras populações, o que ressalta a importância de se estudar o real impacto de alterações genéticas relatadas em outras populações em nosso país (Andia et al., 2013). Além disso, estudos genéticos são dependentes de etnia, logo os resultados e interpretações variam de acordo com a amostra utilizada, (Loos, 2015; Fine, 2015; Andia et al., 2013). Dessa forma, indicamos a necessidade de mais estudos abordando a relação desse SNP com demais populações, assim como, seus parâmetros clínicos, níveis de LTF produzidos por esses pacientes, seja no fluido crevicular gengival ou no plasma sanguíneos, e seu mecanismo de ação na PerioC através de estudos de funcionalidade.

7 CONCLUSÃO

O presente projeto permitiu validar a associação entre o polimorfismo rs1126478 no gene LTF e a PerioC na população brasileira. É reforçada a influência de fatores genéticos no desenvolvimento da doença periodontal, sendo esse estudo um importante passo para uma maior elucidação da etiopatogenia da periodontite, assim como para aprimoramento do diagnóstico e abordagens terapêuticas.

REFERÊNCIAS^{1*}

Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol* 2000. 2014 Jun;65(1):13-26. doi: 10.1111/prd.12014.

Andia DC, Letra A, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, de Souza AP. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2013 Feb;58(2):211-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.05.008.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1.

Arnold RR, Cole MF, McGhee JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. 1977 Jul 15;197(4300):263-5. doi: 10.1126/science.327545.

Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infect Immun*. 1981 May;32(2):655-60. doi: 10.1128/iai.32.2.655-660.1981.

Avril T, Freeman SD, Attrill H, Clarke RG, Crocker PR. Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *J Biol Chem*. 2005 May 20;280(20):19843-51. doi: 10.1074/jbc.M502041200.

Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol*. 2012 Aug;83(8):988-98. doi: 10.1902/jop.2012.110513.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8. doi: 10.1111/jcpe.12935.

Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):255-66. doi: 10.1038/nri2056.

Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:154-66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00334.x.

^{1*} De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Fine DH. Lactoferrin: A Roadmap to the Borderland between Caries and Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2015 Jun;94(6):768-76. doi: 10.1177/0022034515577413.

García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):226-36. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018.

Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:126-41. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01664.x.

Hao L, Shan Q, Wei J, Ma F, Sun P. Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications. *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(2):139-144. doi: 10.2174/1389203719666180514150921.

Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, Kido J, Nagata T. Gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*. 2015 Jan;103(1):66-74. doi: 10.1007/s10266-013-0139-9.

Jordan WJ, Eskdale J, Lennon GP, Pestoff R, Wu L, Fine DH, Gallagher G. A non-conservative, coding single-nucleotide polymorphism in the N-terminal region of lactoferrin is associated with aggressive periodontitis in an African-American, but not a Caucasian population. *Genes Immun*. 2005 Oct;6(7):632-5. doi: 10.1038/sj.gene.6364239.

Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012 Feb;58(1):37-68. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00415.x.

Laine M, Jepsen S, Loos BG. Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health Rep*. 2014;1:272-78.

Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Nov;62(22):2549-59. doi: 10.1007/s00018-005-5370-2.

Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol*. 2006 Jun;84(3):282-90. doi: 10.1139/o06-045.

Li W, Zheng Q, Meng H, Chen D. Integration of genome-wide association study and expression quantitative trait loci data identifies AIM2 as a risk gene of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2020 May;47(5):583-593. doi: 10.1111/jcpe.13268.

Loos BG, Papantonopoulos G, Jepsen S, Laine ML. What is the Contribution of Genetics to Periodontal Risk? *Dent Clin North Am.* 2015 Oct;59(4):761-80. doi: 10.1016/j.cden.2015.06.005.

Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1994 Jun;65(6):623-30. doi: 10.1902/jop.1994.65.6.623.

Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000 Nov;71(11):1699-707. doi: 10.1902/jop.2000.71.11.1699.

Munz M, Willenborg C, Richter GM, Jockel-Schneider Y, Graetz C, Staufienbiel I et al. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. *Hum Mol Gen.* 2017;26(13):2577-88. doi: 10.1093/hmg/ddx151.

Munz M, Richter GM, Loos BG, Jepsen S, Divaris K, Offenbacher S, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of aggressive and chronic periodontitis identifies two novel risk loci. *Eur J Hum Genet.* 2019 Jan;27(1):102-113. doi: 10.1038/s41431-018-0265-5.

Nibali L, Ready DR, Parkar M, Brett PM, Wilson M, Tonetti MS, et al. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):416-20. doi: 10.1177/154405910708600505.

Nibali L, Pelekos G, D'Aiuto F, Chaudhary N, Habeeb R, Ready D, et al. Influence of IL-6 haplotypes on clinical and inflammatory response in aggressive periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2013 May;17(4):1235-42. doi: 10.1007/s00784-012-0804-3.

Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:357-92. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075018.

Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, et al. A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet.* 2010 Feb 1;19(3):553-62. doi: 10.1093/hmg/ddp508.

Shungin D, Haworth S, Divaris K, Agler CS, Kamatani Y, Keun Lee M, et al. Genome-wide analysis of dental caries and periodontitis combining clinical and self-reported data. *Nat Commun.* 2019 Jun 24;10(1):2773. doi: 10.1038/s41467-019-10630-1.

Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 2002 May 30;417(6888):552-5. doi: 10.1038/417552a.

Taiete T, Casati MZ, Ribeiro Édel P, Sallum EA, Nociti Júnior FH, Casarin RC. Amoxicillin/metronidazole associated with nonsurgical therapy did not promote additional benefits in immunologic parameters in generalized aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Quintessence Int.* 2016 Apr;47(4):281-92. doi: 10.3290/j.qi.a34723. PMID: 26345106.

Teng CT, Gladwell W. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human lactoferrin gene. *Biochem Cell Biol.* 2006 Jun;84(3):381-4. doi: 10.1139/o06-035.

Tong H, Wei Z, Yin J, Zhang B, Zhang T, Deng C, et al. Genetic susceptibility of common polymorphisms in NIN and SIGLEC5 to chronic periodontitis. *Sci Rep.* 2019 Feb 14;9(1):2088. doi: 10.1038/s41598-019-38632-5.

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000 Jun;18(1):6-9.

Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, et al. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6141-7. doi: 10.1128/IAI.71.11.6141-6147.2003.

Vieira AR, Albandar JM. Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2014 Jun;65(1):92-106. doi: 10.1111/prd.12021.

Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang YH, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *J Periodontal Res.* 2009 Jun;44(3):418-24. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01120.x.

Yadav N, Lamba AK, Thakur A, Faraz F, Tandon S, Pahwa P. Effect of periodontal therapy on lactoferrin levels in gingival crevicular fluid. *Aust Dent J.* 2014 Sep;59(3):314-20. doi: 10.1111/adj.12203.

Yang IV, Wade CM, Kang HM, Alper S, Rutledge H, Lackford B, et al. Identification of novel genes that mediate innate immunity using inbred mice. *Genetics.* 2009 Dec;183(4):1535-44. doi: 10.1534/genetics.109.107540.

Zhang J, Sun X, Xiao L, Xie C, Xuan D, Luo G. Gene polymorphisms and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2011 Jun;56(1):102-24. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00371.x.

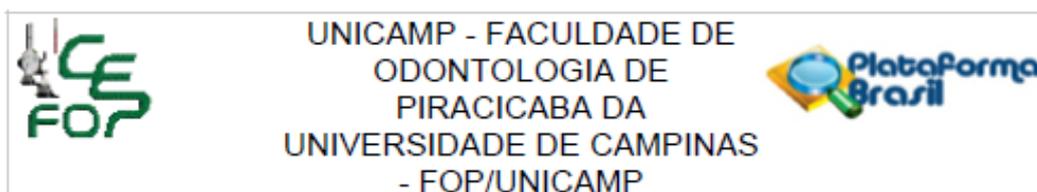
Zupin L, Robino A, Navarra CO, Pirastu N, Di Lenarda R, Gasparini P, et al. LTF and DEFB1 polymorphisms are associated with susceptibility toward chronic periodontitis development. *Oral Dis.* 2017 Oct;23(7):1001-8. doi: 10.1111/odi.12689.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio



Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Associação dos polimorfismos genéticos rs4284742 (gene SIGLEC5) e rs1800872 (gene IL10) com a periodontite na população brasileira

Pesquisador: Camila Schmidt Stolf

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 51534921.0.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.739.821

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E1) AO PROTOCOLO originalmente aprovado em 30/11/2021 para alteração na metodologia e extensão do cronograma de realização da pesquisa. O parecer foi atualizado de acordo com a documentação apresentada. A solicitação está detalhadamente descrita ao final do parecer.

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui CAMILA SCHMIDT STOLF (Cirurgiã Dentista, Doutoranda no PPG Clínica Odontológica, área de Periodontia da FOP/UNICAMP, Pesquisadora responsável, Co-orientadora), ARTHUR GABRIEL DE SOUZA PEREIRA (Graduando no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Orientando), BRUNA CONSOLARO DE ALMEIDA (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Orientanda), RENATO CORRÊA VIANA (Cirurgião Dentista, Docente da área de Periodontia da FOP-UNICAMP, Orientador), o que é confirmado na

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 04 de Novembro de 2022

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Límela 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião CEP: 13.414-903
UF: SP Município: PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br

Anexo 3 – Iniciação Científica



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **ARTHUR GABRIEL DE SOUZA PEREIRA** recebe/recebeu auxílio da **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO**, na(s) categoria(s):

Bolsa no País - Regular - Iniciação Científica

Processo: 2021/01203-9

Título: Associação da variação genética rs4284742 no gene SIGLEC5 com a periodontite na população brasileira

Instituição: FAC ODONTOLOGIA PIRACICABA/UNICAMP

Período: 01/04/2021 a 31/03/2022

Orientador Prof(a). Dr(a): RENATO CORREA VIANA CASARIN

As bolsas outorgadas pela FAPESP são desenvolvidas em regime de dedicação exclusiva e não correspondem a qualquer espécie de emprego ou vínculo empregatício, eis que não configuram contrato de trabalho e, em consequência, não objetivam pagamento de salários.

São Paulo, 21 de Novembro de 2022.



Flávio Cardoso da Silva
Assessor