



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Paloma Aparecida do Nascimento

***Avaliação da associação do polimorfismo
rs142548867 (EEFSEC), rs574301770 (ZNF136) e
rs72821893 (KRT25) com a periodontite agressiva na
população brasileira***

Piracicaba

2018

Paloma Aparecida do Nascimento

***Avaliação da associação do polimorfismo
rs142548867 (EEFSEC), rs574301770 (ZNF136) e
rs72821893 (KRT25) com a periodontite agressiva 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 Cirurgiã Dentista.

Orientador: Prof. Dr, Renato Corrêa Viana Casarin

Co-orientador: Tiago Taiete

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELO A ALUNA PALOMA APARECIDA DO NASCIMENTO E ORIENTADA PELO PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

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

N17a Nascimento, Paloma Aparecida do, 1994-
Avaliação da associação do polimorfismo rs142548867 (EEFSEC),
rs574301770 (ZNF136) e rs72821893 (KRT25) com a periodontite agressiva na
população brasileira / Paloma Aparecida do Nascimento. – Piracicaba, SP : [s.n.],
2018.

Orientador: Renato Corrêa Viana Casarin.

Coorientador: Tiago Taiete.

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

1. Periodontite agressiva. 2. Genética. 3. Fatores de risco. I. Casarin, Renato
Corrêa Viana, 1982-. II. Taiete, Tiago, 1987-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Aggressive Periodontitis

Genetics

Risk factors

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por todo apoio e esforço ao longo desses anos, buscando sempre o melhor para minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha existência.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do magnífico reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.; ao coordenador da Graduação, Wander José da Silva.

Ao PIBIC, pela oportunidade e apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, pela orientação, oportunidade, suporte e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Tiago Taiete pela Co orientação, prontidão no desenvolvimento desse trabalho, dedicação e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Departamento de Prótese e Periodontia da UNICAMP, constituído pelos professores Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, Profa. Dra. Karina Gonzales Silverio Ruiz , Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, Profa. Dr. Altair Antoninha Del Bel Cury, Profa. Dra. Célia Maris Rizzatti Barbosa, Prof. Dr. Frederico Andrade e Silva, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques, Prof. Dr. Marcelo Ferraz Mesquita, Prof. Dr. Mauro Antonio de Arruda Nóbilo, Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani, Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão, Prof. Dr. Wander José da Silva e Prof. Dr. Wilkens Aurélio Buarque e Silva.

RESUMO

Um recente estudo do presente grupo de pesquisa conduziu uma análise do sequenciamento do exoma em famílias com histórico de periodontite agressiva (PA) (Taiete, 2017). Os resultados mostraram que a PA estava associada a três variações de nucleotídeo único (SNVs) rs142548867 no gene *EEFSEC*, rs574301770 em *ZNF136* e rs72821893 em *KRT25*. Essas variantes ainda não tinham sido descritas como associadas a PA. As variantes foram classificadas como missense, ou seja, quando a troca de uma base nitrogenada resulta na substituição do aminoácido codificado. Entretanto, não há estudos que confirmem essas alterações genéticas em uma população maior e independente. Isto é importante para determinar se esses achados são válidos para a população em geral, já que diferenças étnicas influenciam na composição genética, especialmente na população brasileira, com grande miscigenação (Andia et al. 2013). Assim, o presente estudo tem por finalidade identificar se há associação das SNVs rs142548867 no gene *EEFSEC*, rs574301770 no gene *ZNF136* e rs72821893 no gene *KRT25* com a PA em pacientes brasileiros. Os genótipos para essas SNVs foram determinados através da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) em Tempo Real, utilizando o sistema Taqman® para discriminação de alelo (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Pode-se observar que o único SNV que manteve significância estatística foi o SNV missense rs142548867 no gene *EEFSEC*. As outras duas SNVs não foram associadas a PA, e isso pode ter ocorrido devido à baixa frequência alélica mínima observada nessas SNVs.

Palavras-chave: Periodontite agressiva. Genética. Fator de risco.

ABSTRACT

A recent study from the present research group conducted an analysis of the exome sequencing in families with history of aggressive periodontitis (AP) (Taiete, 2017). The results showed that AP was associated with three single nucleotide variations (SNVs) rs142548867 in the EEFSEC gene, rs574301770 in ZNF136 and rs72821893 in KRT25. These variants had not previously been described associated with AP. The three variants were classified as missense, in other words, when the exchange of a nitrogenous base results in the substitution of the encoded amino acid. However, there are no studies confirming the new genetic changes in a larger and independent population. This is important to determine if these findings are valid for the general population, since ethnic differences significantly influence the genetic composition, especially in the Brazilian population that presents great miscegenation (Andia et al., 2013). Thus, the present study aims to identify if there is association of the SNVs rs142548867 in the EEFSEC gene, rs574301770 in the ZNF136 gene and rs72821893 in the KRT25 gene with the AP in Brazilian patients. Genotypes for these SNVs were determined using the Real Time DNA Polymerase Chain Reaction (PCR) using the Taqman® system for allele discrimination (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). It was observed that the only SNV that maintained statistical significance in the studied population was SNV missense rs142548867 in the EEFSEC gene. The other two SNVs were not associated with PA, and this may have occurred due to the low minimum allelic frequency observed for these two SNVs.

Key words: Aggressive periodontitis. Genetics. Risk factor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Delineamento	16
4.2 Seleção dos pacientes	16
4.3 Coleta das amostras	17
4.4 Extração de DNA	18
4.5 Genotipagem para detecção das variações de nucleotídeo único	18
4.6 Análise dos Resultados	19
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	28
Anexo 1 – Certificado da Iniciação Científica	28
Anexo 2 – Certificado do Comitê de ética	29
Anexo 3 – Certificado de verificação e originalidade e prevenção do plágio	30

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, desencadeada pela resposta imune-inflamatória do hospedeiro aos periodontopatógenos presentes no biofilme subgengival, caracterizada clinicamente pela destruição óssea e perda de inserção conjuntiva, que se não tratada pode levar a perda dos dentes (Armitage 1999). Existem duas formas principais de periodontite: a periodontite crônica (PC) de prevalência maior, progressão lenta e que apresenta boa resposta à descontaminação mecânica, e a periodontite agressiva (PA), forma particularmente grave de doença periodontal, que acomete indivíduos jovens sistemicamente saudáveis, e é caracterizada por início precoce, rápida progressão, agregação familiar dos casos e pobre resposta as abordagens terapêuticas (Armitage 1999; Deas e Mealey, 2010; Albandar, 2014a).

Estudos epidemiológicos apontam que a prevalência de PA pode variar de 1 a 15% da população mundial (Demmer e Papapanou, 2010), enquanto que na população brasileira a prevalência varia de 0,3% a 5,5% (Susin et al., 2014). Embora a prevalência seja relativamente baixa, esta patologia possui grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que por apresentar rápida e severa destruição dos tecidos periodontais, frequentemente leva à múltiplas perdas dentais de maneira precoce (Albandar, 2014b).

A etiopatogenia da PA ainda não é completamente compreendida, embora acredita-se que a susceptibilidade dos indivíduos à periodontite 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 patogênese dessa condição é reforçada por sua característica de forte agregação familiar, ou seja, a tendência dos casos de se desenvolverem em uma mesma família (Laine et al., 2012). 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. 2007a; Nibali et al., 2013b; Vieira e Albandar, 2014).

Tradicionalmente, as pesquisas genéticas na periodontia focaram na identificação de alterações genéticas específicas, principalmente de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), como fatores de risco para a periodontite (Schaefer et al., 2010; Laine et al., 2012). Na última década abordagens amplas e livres de hipótese, como o sequenciamento do genoma e ou do exoma começaram a ser empregadas para o estudo das características genéticas das periodontites, sugerindo novas associações entre alterações genéticas com as periodontites (Schaefer et al., 2010; Taiete, 2017). Contudo, há a necessidade de expandir os achados desses estudos de larga escala em uma população maior e independente através da abordagem gene-candidato, porém isso ainda não foi realizado (Loos et al., 2015). Além disso, a evidência atual indica que a PA e a PC são poligênicas, a exemplo de outras doenças complexas, com o envolvimento de múltiplos genes de pequeno efeito (geralmente mais de 100 genes para doenças complexas) (Laine et al., 2012; Vieira e Albandar, 2014). Esses fatos resultam que, a despeito dos esforços, os fatores genéticos que contribuem para a patogênese das doenças periodontais, especialmente da PA, ainda não estão totalmente definidos (Laine et al., 2012).

Um recente estudo do presente grupo de pesquisa conduziu uma análise do sequenciamento do exoma em famílias com histórico de PA (Taiete et al., 2017). Os resultados mostraram que a PA estava associada a três variações de nucleotídeo único (SNVs) rs142548867 no gene *EEFSEC*, rs574301770 em *ZNF136* e rs72821893 em *KRT25*. Essas variantes até então não tinham sido descritas como associadas a PA. As três variantes foram classificadas como missense, ou seja, quando a troca de uma base nitrogenada resulta na substituição do aminoácido codificado. Essas variantes foram classificadas como deletérias para a função proteica pelo algoritmo de predição SIFT, enquanto as alterações nos genes *EEFSEC* e *ZNF136* foram preditas como possivelmente prejudiciais pelo algoritmo Polyphen (Taiete et al., 2017).

Entretanto, como ressaltado acima não há estudos que confirmem essas novas alterações genéticas, que foram associadas à PA após a análise do exoma, em uma população maior e independente. Isto é importante para determinar se esses achados são válidos para a população em geral, uma vez que diferenças étnicas entre os indivíduos influenciam de maneira significativa a composição genética,

especialmente na população brasileira que apresenta grande miscigenação (Andia et al., 2013).

Assim, diante do exposto, o presente estudo terá por finalidade identificar se há associação das SNVs rs142548867 no gene *EEFSEC*, rs574301770 no gene *ZNF136* e rs72821893 no gene *KRT25* com a PA em pacientes da população brasileira.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite agressiva (PA) tem grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos por esta patologia. Possui início precoce rápida e severa progressão, pobre resposta as abordagens terapêuticas e é associada a altas taxas de perda dentária. De patogênese complexa, o início e progressão da doença e a resposta ao tratamento são determinadas pela microbiota, resposta imune-inflamatória do hospedeiro e pelas diferentes abordagens terapêuticas adotadas. Contudo, nenhum desses fatores está totalmente elucidado na literatura. Dessa forma, foram avaliados estudos que focaram entender fatores etiológico, terapêuticos e preventivos dessa doença.

No primeiro estudo (Casarin 2010) foi comparado os padrões microbianos e inflamatórios no fluido gengival crevicular de pacientes com periodontite generalizada agressiva e crônica (40 indivíduos PA e 28 indivíduos PC). Na comparação das concentrações subgengivais de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg), foi observado maior quantidade e frequência de Aa em PA, associado a menor concentração de IgG contra essa espécie e menor IL-10 subgengival, indicando uma possível combinação de fatores associados à essa doença. Portanto, pode-se concluir que em relação a periodontite crônica, os pacientes com periodontite agressiva generalizada apresentam um desequilíbrio na resposta do hospedeiro, com níveis reduzidos de interleucina-10 e IgG e aumento dos patógenos periodontais. (Casarin et al., 2010).

No segundo estudo (Monteiro 2015) foi avaliado a presença de Aa, bem como de Pg, na saliva e no ambiente subgengival de crianças de 6-12 anos com pais portadores de PA comparado a crianças de pais saudáveis periodontalmente. Pode-se notar uma maior prevalência e concentração de Aa na saliva de crianças filhos de PA, com 16x maior chance de infecção na infância quando um dos pais é portador dessa espécie. No ambiente subgengival, pode-se notar também maior concentração desta, associado à maior acúmulo de biofilme e sangramento gengival. Essa informação é essencial para abordagens preventivas precoces, uma vez que há uma clara relação familiar na ocorrência da PA. (Monteiro et al., 2015).

No terceiro estudo (Taiete 2017) foi realizado uma análise exômica com um protocolo de filtragem familiar, confirmado em estudo populacional, em núcleos familiares com PA. Após a análise do exame e validação por PCR-real time, análise funcional e in silico, foi possível identificar o indel no gene GPRC6A (p.Tyr775LeufsTer776) com a PA, que apresentou maior frequência na população afetada indicando um novo foco para avaliar a ocorrência da mesma. Entretanto, alterações genéticas podem afetar o funcionamento dos sistemas de proteção e homeostase, levando a ocorrência da doença (Taiete et al., 2017a).

No quarto estudo (Taiete 2017) foi avaliado o transcriptoma de tecidos saudáveis, sem contato com biofilme bacteriano, de sujeitos PA, comparando-os à periodontite crônica (PC) e saúde periodontal. Observou-se diversos genes e vias diferencialmente expressos entre as condições, dentre as quais a maior expressão de receptores de células Natural Killers e genes relacionados ao sistema imune (KIR2DL4, IL6 e SELE) estavam super-expressos na PA comparado à saúde e PC, indicando alterações constitutivas nessa população. De certa forma, essas avaliações poderiam indicar o caminho pelo qual a PA ocorre, embora não considerem o fator etiológico primário – biofilme (Taiete et al., 2017b).

No quinto estudo (Taiete 2018), avaliou-se 200 indivíduos brasileiros portadores de PA quanto presença de polimorfismos genéticos dos genes rs153741 (GLT6D1), rs6667202 (IL10) e rs1333048 (ANRIL), polimorfismos já descritos em outras populações também afetadas pela PA. Foi observado que o alelo raro C do gene IL-10 apresentou menor frequência (23,5%) na população PA comparando com sujeitos com periodontite crônica (n=190; 30,3%), indicando um caráter protetor desse polimorfismo para a ocorrência da PA. Contudo, abordagens mais amplas poderiam indicar novos polimorfismos relacionados a essa doença (Taiete et al., 2018c).

Pode-se concluir que, a etiopatogenia da Periodontite Agressiva ainda não é completamente compreendida. A forte agregação familiar, ou seja, a tendência dos casos de se desenvolver em uma mesma família, indica que fatores genéticos desempenham um importante papel na sua patogênese (Loos et al., 2015). De fato, suspeita-se que os fatores genéticos possam ser responsáveis por aproximadamente 50% da variabilidade nos parâmetros clínicos das doenças periodontais, além de estarem associados à presença de microrganismos específicos e maior produção de

marcadores inflamatórios (Nibali et al. 2007a; Nibali et al., 2013b; Vieira e Albandar, 2014).

Nas últimas décadas, as pesquisas genéticas na periodontia focaram na identificação de alterações genéticas específicas, principalmente de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), como fatores de risco para a periodontite (Schaefer et al., 2010; Loos et al., 2015). Apesar desses esforços, os fatores genéticos que contribuem para a patogênese das periodontites, especialmente da PA, ainda não estão totalmente definidos (Loos et al., 2015). Nesse sentido, a evidência atual indica que a PA e a PC são poligênicas, a exemplo de outras doenças complexas, com o envolvimento de múltiplos genes de pequeno efeito (geralmente >100 para doenças complexas) (Vieira e Albandar, 2014; Loos et al., 2015).

Assim, em vista do exposto, embora diversos estudos tenham direcionado seus esforços para avaliar os aspectos etiopatogênicos e o padrão de resposta às terapias periodontais, a PA ainda não apresenta definições claras a respeito desses fatores, e nem mesmo terapias estabelecidas que promovam melhorias previsíveis ao indivíduo. Além disso, há a necessidade de se integrar os novos conhecimentos, gerados pelas técnicas de última geração, dos fatores genéticos, microbiológicos e imunológicos envolvidos em sua patogênese com a resposta aos tratamentos atualmente empregados (Garcia et al., 2013). Esse conhecimento visa obter a instituição de terapias individualizadas às necessidades específicas de cada paciente. De uma perspectiva científica, essas análises levarão a um melhor entendimento de sua etiologia e patogênese, permitindo uma melhora do manejo clínico do tratamento e, conseqüentemente, da prevenção da periodontite agressiva.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo será investigar a existência de associação entre periodontite agressiva em uma população brasileira e as SNVs rs142548867 (*EEFSEC*), rs574301770 (*ZNF136*) e rs72821893 (*KRT25*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Foi delineado um estudo laboratorial para avaliar a associação de alterações genéticas (rs142548867, rs574301770 e rs72821893) e à periodontite agressiva em pacientes de uma população brasileira.

4.2 Seleção dos 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, com a aprovação sob o número 1.703.760. Após aprovação pelo CEP foram selecionados pacientes diagnosticados com periodontite agressiva generalizada e indivíduos sem histórico de periodontite que procurarem 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:

Periodontite Agressiva Generalizada (n=200): presença de bolsas periodontais verdadeiras e perda óssea radiográfica em pacientes com até 35 anos de idade; presença de pelo menos 8 dentes com profundidade de sondagem (PS) \geq 5 mm (dentre os quais dois dentes devem apresentar PS \geq 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. 2016a);

Ausência de histórico de periodontite (n=200): ausência de PS $>$ 4 mm, ausência de perda de inserção interproximal e ausência de sangramento marginal em pelo menos 90% dos sítios, mínimo de 20 dentes na cavidade oral (Jonsson et al. 2011);

Crítérios de Exclusão: Para todos os grupos os critérios de exclusão serão: 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 subgingival nos 6 meses anteriores ao estudo; hábito tabagista, gravidez ou período de lactação.

O tamanho amostral foi calculado com o auxílio do Software Quanto (USC Biostats), que leva em consideração a prevalência da doença na população de estudo e a frequência alélica mínima, que nesse caso foi de 25%.

A tabela 1, descreve os dados clínicos e demográficos dos indivíduos selecionados para a presente pesquisa.

Tabela 1 - Dados clínicos e demográficos

Características	Periodontite Agressiva	Saúde Periodontal
Idade	34.0 ± 4.6 A	30.5 ± 5.8 A
Gênero (M/F)	21 / 79 A	35.0 / 65.0 B
Etnia (Af / C)	16.5 / 83.5 A	13.8 / 86.2 A
Índice de placa	23.1±6.5 A	19.1 ± 5.4 A
Índice de sangramento	24.8±9.0 A	19.2 ± 2.3 A
Profundidade de sondagem	2.35±0.0 A	2.1 ± 0.2 A
Nível de inserção	5.44±1.0 A	4.2 ± 0.7 A

Letras diferentes indicam diferença estatística. Testes estatísticos utilizados: Kruskal Wallis / Dunn para idade; exato de Fisher para gênero e etnia; anova/Tukey para índice de placa, índice de sangramento profundidade de sondagem e nível de inserção.

Gênero (M/F) – Gênero (masculino / feminino)

Etnia (Af/C) – Etnia (afro descendente / caucasiano).

4.3 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 & Line 2000).

4.4 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. 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).

Foi realizado a padronização das reações de PCR em tempo real utilizando as sondas Taqman® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para discriminação de alelo dos SNVs rs142548867, rs574301770 e rs72821893. 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 Genotipagem para detecção das variações de nucleotídeo único

Foram estudados as SNVs rs142548867 no gene *EEFSEC*, rs574301770 no gene *ZNF136* e rs72821893 no gene *KRT25*. Os genótipos para essas SNVs foram determinados através da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) em Tempo Real, utilizando o sistema Taqman® para discriminação de alelo (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). O TaqMan PCR foi realizado num volume de 10 µL (20ng 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.

4.6 Análise dos Resultados

A distribuição dos genótipos para cada SNV foi avaliada para desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e as diferenças nas frequências genotípica e alélica de cada SNV 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.

5 RESULTADOS

As frequências dos genótipos observadas para os três SNPs avaliados nos dois grupos não foram estatisticamente diferentes daquelas esperada sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados das frequências dos alelos e genótipos são reportados na tabela 2.

Tabela 2 - Frequência dos alelos e genótipos do SNV rs142548867, rs574301770 e rs72821893

		PA (%)	SP (%)	Razão de Possibilidades PAxSP (95% CI) <i>p</i> -valor
rs142548867 (EEFSEC)				
HWE <i>p</i>-valor		0.8264	0.5205	n.s
Alelos (C / T)	C	96	99	4.3 (1.1 - 16.5) <i>p</i> = 0.04
	T	4	1	
Genótipos (CC / CT / TT)	CC	93	98.7	<i>Referência</i>
	CT	6	0.65	10.06 (1.2 - 18.7) <i>p</i> = 0.028
	TT	1	0.65	n.s
rs574301770 (ZNF136)				
HWE <i>p</i>-valor			0.704	n.s
Alelos (C / G)	C	96.5	98.0	n.s
	G	3.5	2	
Genótipos (CC / CG / GG)	CC	94	97	<i>Referência</i>
	CG	5	2	n.s
	GG	1	1	n.s
rs72821893 (KRT25)				
HWE <i>p</i>-valor			0.874	
Alelos (G / A)	G	99.0	99.5	n.s
	A	1	0.5	
Genótipos (GG / GA / AA)	GG	98.0	99.0	<i>Referência</i>
	GA	2.0	1.0	n.s
	AA	0.0	0.0	n.s

Manteve significância estatística na população estudada foi o SNV missense rs142548867 no gene *EEFSEC*. O alelo raro T foi detectado em maior

frequência em pacientes com PA quando comparados aos indivíduos SP (4%, 1% respectivamente, odds ratio 4.3, $p=0.04$). O genótipo CT foi significativamente associado a PA (odds ratio 10.06, $p=0.028$), tornando este SNV de risco para a ocorrência da doença.

6 DISCUSSÃO

A periodontite agressiva tem grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que apresenta início precoce, rápida e severa progressão, pobre resposta às abordagens terapêuticas e alta taxa de perda dentária. A susceptibilidade à essa doença é determinada por uma complexa relação entre os periodontopatógenos (desafio bacteriano) e a resposta do hospedeiro, sendo essa relação regulada por mecanismos genéticos que desempenham papel determinante na doença. No presente estudo foi avaliada a associação entre periodontite agressiva em uma população brasileira e as SNVs rs142548867 (*EEFSEC*), rs574301770 (*ZNF136*) e rs72821893 (*KRT25*), sendo que o único que apresentou relevância clínica nessa população estudada foi o *EEFSEC*.

EEFSEC é um importante fator de tradução para selenoproteínas e selenoenzimas, que são críticos para a manutenção do potencial de oxirredução, homeostase tecidual e regulação das células imune-inflamatórias (Bellinger et al. 2009; Dobosz-Bartoszek et al. 2016). Interessantemente, o estresse oxidativo parece desempenhar um importante papel na patogênese da periodontite agressiva, uma vez que a doença apresenta níveis elevados de marcadores de estresse oxidativo, quando comparado com outras doenças periodontais (Baltacioglu et al. 2014). Portanto, pode-se especular que a SNV missense observada no gene *EEFSEC* pode atuar na síntese dessa proteína, ocasionando uma diminuição ou prejudicado esse processo de síntese dessas proteínas, alterando o controle do estresse oxidativo das células imune-inflamatórias, o que por sua vez, afetaria a resposta inflamatória em pacientes com PA (Bellinger et al. 2009). Portanto, estudos futuros são necessários para explicar os mecanismos moleculares associados entre esse SNV e a PA. As outras duas SNVs, rs574301770 e rs72821893, que não foram associadas a PA pode ser devido à baixa frequência alélica mínima observada para essas duas SNVs, o que requer um número maior de voluntários para a obtenção de poder estatístico adequado para refutar ou não a associação reportada previamente.

As outras duas SNVs, rs574301770 e rs72821893 não foram associadas a PA na população estudada. Esse quadro pode ser explicado devido à baixa frequência alélica mínima observada para essas duas SNVs. No entanto, as análises dessas duas SNVs requerem um número maior de voluntários para a obtenção de poder

estatístico adequado para refutar ou não a associação reportada previamente. Isto é importante para determinar se esses achados são válidos para a população em geral, uma vez que diferenças étnicas entre os indivíduos influenciam de maneira significativa a composição genética, especialmente na população brasileira que apresenta grande miscigenação.

Em resumo, apesar da prevalência da PA ser relativamente baixa na população brasileira, esta doença possui grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que apresenta rápida e severa destruição dos tecidos periodontais e pode levar à múltiplas perdas dentais de maneira precoce. Nesse quadro, a evidência atual indica que a PA é poligênica, ou seja, apresenta o envolvimento de múltiplos genes de pequeno efeito. Como não há estudos que confirmem esses novos polimorfismos na população brasileira, e a realização dessas análises poderá resultar na identificação de novas variantes associadas a PA, ajudando a compreender melhor a patogênese dessa condição, e futuramente permitir identificar indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento dessa doença, possibilitando a implementação de abordagens preventivas (Laine et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o SNV rs142548867 no gene *EEFSEC* foi associado com a PA na população estudada, e que esta variação missense apresenta-se como um indicador de risco para a ocorrência da PA.

REFERÊNCIAS

Albandar JM. Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2014a Jun;65(1):7-12. doi: 10.1111/prd.12013.

Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014b 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.

Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol*. 2014 Oct;85(10):1432-41. doi: 10.1902/jop.2014.130654.

Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J*. 2009 Jul 29;422(1):11-22. doi: 10.1042/BJ20090219.

Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2010 Oct;45(5):635-42. doi: 10.1111/j.1600 0765.2010.01278.x

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.

Casarin RC, *Periodontite agressiva: abordagens diagnósticas, terapêuticas e preventivas [tese]*. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2017.

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.

Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:28-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00326.x.

Dobosz-Bartoszek M, Pinkerton MH, Otwinowski Z, Chakravarthy S, Söll D, Copeland PR, et al. Crystal structures of the human elongation factor eEFSec suggest a non-canonical mechanism for selenocysteine incorporation. *Nat Commun*. 2016 Oct 6;7:12941. doi: 10.1038/ncomms12941

Garcia I, Kuska R, Somerman MJ. Expanding the foundation for personalized medicine: implications and challenges for dentistry. *J Dent Res*. 2013 Jul;92(7Suppl):3S-10S. doi: 10.1177/0022034513487209.

Jönsson D, Ramberg P, Demmer RT, Kebschull M, Dahlén G, Papapanou PN. Gingival tissue transcriptomes in experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2011 Jul;38(7):599-611. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01719.x.

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

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.2015b.06.005.

Monteiro Mde F, Casati MZ, Taiete T, Vale HF, Nociti FH Jr, Sallum EA, et al. Periodontal clinical and microbiological characteristics in healthy versus generalized aggressive periodontitis families. *J Clin Periodontol*. 2015 Oct;42(10):914-21. doi: 10.1111/jcpe.12459.

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*. 2013b May;17(4):1235-42. doi:10.1007/s00784-012-0804-3.

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*. 2007a May;86(5):416-20.

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.

Susin C, Haas AN, Albandar JM. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2014 Jun;65(1):27-45. doi: 10.1111/prd.12019.

Taiete T, Casarin RCV, Silvério Ruiz KG, Nociti Júnior FH, Sallum EA, Casati MZ. Transcriptome of Healthy Gingival Tissue from Edentulous Sites in Patients with a History of Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2017b Aug 28:1-17. doi: 10.1902/jop.2017.170221.

Taiete T, Casati MZ, Martins L, Andia DC, Mofatto LS, Della Coletta R, et al. Whole-exome sequencing analysis in generalized aggressive periodontitis: a familial screening approach. *Human Gen.* 2017a (submitted).

Taiete T, Casati MZ, Stolf CS, Corrêa MG, Santamaria MP, Andere NMRB, et al. Validation of reported GLT6D1 (rs1537415), IL10 (rs6667202), and ANRIL (rs1333048) single nucleotide polymorphisms for aggressive periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2018c Jul 20. doi: 10.1002/JPER.18-0071.

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.

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.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado da Iniciação científica



Relatório Final

Associação de alterações genéticas nos genes EEFSEC, ZNF136 e KRT25 com periodontite agressiva

Versão enviada em 13/08/2018 22:12:56

 ver relatório (../arquivos/rel_final/AlunoCod_10638_1-RelFinal_2017.pdf)

— **Parecer do orientador emitido em 13/08/2018 22:33:16**

Desempenho do aluno no projeto: Aluna com ótimo comprometimento, interesse e disposição durante a realização do estudo.

Desempenho acadêmico do aluno: Aluna com excelente rendimento acadêmico, com alto nível de qualidade na execução das atividades clínicas.

— **Parecer do Assessor dado em 23/08/2018 14:46:48**

O relatório apresentado pela bolsista Paloma Aparecida do Nascimento relata as atividades desenvolvidas para execução do projeto durante a vigência da bolsa. A bolsista se dedicou ao projeto de pesquisa cumprindo o cronograma proposto.

● **Aprovado**

Anexo 2 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação de alterações genéticas em pacientes com periodontite agressiva na população brasileira", CAAE 58679416.4.0000.5418, dos pesquisadores Tiago Taiete, Camila Schmidt Stolf, Marcio Zaffalon Casati, Renato Corrêa Viana Casarin, Mônica Grazieli Correa, Mauro Pedrine Santamaria, Naira Maria Rebelatto Bechara Andere, Ricardo Della Coletta, Enilson Antônio Sallum, Francisco Humberto Nociti Júnior, Karina Gonzales Silvério e Paloma Aparecida do Nascimento, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em sua versão original 30/08/2016 e na versão emendada em 01/10/2018.

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "Evaluation of genetic alterations in aggressive periodontitis patients in the Brazilian population", CAAE 58679416.4.0000.5418, of the researcher's Tiago Taiete, Camila Schmidt Stolf, Marcio Zaffalon Casati, Renato Corrêa Viana Casarin, Mônica Grazieli Correa, Mauro Pedrine Santamaria, Naira Maria Rebelatto Bechara Andere, Ricardo Della Coletta, Enilson Antônio Sallum, Francisco Humberto Nociti Júnior, Karina Gonzales Silvério and Paloma Aparecida do Nascimento, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on 30th of August of 2016 (original version) and 01st October of 2018 (amended version).

Profa. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 3 – Certificado de verificação e originalidade e prevenção do plágio

Avaliação da associação do polimorfismo rs142548867 (EEFSEC), rs574301770 (ZNF136) e rs72821893 (KRT25) com a periodontite agressiva na população brasileira

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

