



Polimorfismos genéticos da interleucina-1 e o risco de periodontite periapical crônica numa população de Antioquia, Colômbia

IL-1 gene polymorphisms and the risk of chronic periapical periodontitis in a population from Antioquia, Colombia

Lina María Salazar-Pelaéz^[a], Rafael O. Fernández Grisales^[b], Oscar Eduardo Zulúaga Yepes^[c],
Katiana Osorno Vargas^[c], Diego Tobón Calle^[b]

^[a] M.Sc., doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e pesquisadora do Grupo de Ciências Básicas da Universidad CES, Medellín - Colômbia, e-mail: lmsalazar@ces.edu.co

^[b] DDS, professor da Faculdade de Odontologia e pesquisador do Grupo de Ciências Básicas Odontológicas da Universidad CES, Medellín - Colômbia.

^[c] DDS, formado na Universidad CES, Medellín - Colômbia.

Resumo

Objetivo: Determinar a frequência de polimorfismos bialélicos em *IL-1A* (rs1800587, posição -889) e *IL-1B* (rs1143634, posição +3954) numa amostra de indivíduos da região de Antioquia, Colômbia, com diagnóstico de periodontite periapical crônica ou periápice saudável; avaliando sua possível associação, junto com o hábito de fumar, no desenvolvimento de periodontite perirradicular. **Materiais e métodos:** A amostra incluída neste estudo consistiu em 54 indivíduos da região de Antioquia, Colômbia com diagnóstico clínico e imaginológico de periodontite periapical crônica (n = 27) ou com periápice saudável (n = 27). O genótipo dos indivíduos foi determinado utilizando-se análises dos polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), após realizada a extração do DNA da mucosa oral. **Resultados:** Foi encontrada uma associação, embora não estatisticamente significativa, entre o efeito combinado de fumar e apresentar pelo menos um alelo mutante em *IL-1B* (rs1143634, posição +3954, C/T), com o desenvolvimento de periodontite periapical (OR = 4,8; 0,2 - 99,1). Isto mesmo ocorreu com as variáveis de fumar (OR = 3,7; 0,5 - 29,2), ou apresentar pelo menos um alelo mutante em *IL-1A* (rs1800587, posição -889, C/T) (OR = 3,2; 0,5 - 19,0). **Conclusão:** A presença de polimorfismos genéticos bialélicos em IL-1 parece constituir, junto com o hábito

de fumar, fatores de risco para o desenvolvimento de periodontite apical crônica após o desenvolvimento de necrose pulpar.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Citocinas. Polimorfismos de nucleotídeo único.

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine the frequency of biallelic polymorphisms in IL-1A (rs1800587, position -889) and IL-1B (rs1143634, position +3954) in a sample of individuals from Antioquia department, diagnosed with chronic periapical periodontitis or healthy periapex, evaluating their possible association, together with tobacco habits, in the development of periradicular periodontitis. **Material and methods:** The sample consisted of 54 individuals with a clinical and imagenologic diagnosis of chronic periapical periodontitis (n = 27) or healthy periapex (n = 27). The genotype of individuals was determined by using restriction fragment length polymorphism (RFLPs), after the DNA extraction from buccal mucosa. **Results:** Association was found, although not statistically significant, between the combined effect of smoking and having at least one mutated allele in IL-1B (+3954 position, C/T), with the development of periapical periodontitis (OR = 4.8, 0.2 - 99.1). Also, smoking (OR = 3.7, 0.5 - 29.2), or having at least one mutated allele in IL-1A (rs1800587, position -889, C/T) (OR = 3.2, 0.5 - 19.0), were associated with periapical periodontitis development, even though with p values greater than 0.05. **Conclusion:** The presence of biallelic genetic polymorphisms in IL-1 appears to be, along with smoking, risk factors for chronic apical periodontitis after the development of dental pulp necrosis.

Keywords: Periapical periodontitis. Cytokines. Single nucleotide polymorphisms.

Introdução

A periodontite periapical, uma sequela comum após a colonização microbiana da polpa, ocorre como uma resposta do hospedeiro à progressão dos microrganismos desde os sistemas de condutos radiculares ao tecido perirradicular, o que pode levar a processos de remodelação tissular patológica, cujo resultado final, frequentemente, é a reabsorção óssea desse tecido (1-3). Tais mudanças patológicas se iniciam logo após o desenvolvimento da necrose pulpar, como resultado de um processo de cárie ou trauma, e depois da colonização do sistema de canais radiculares por microrganismos provenientes da cavidade oral, principalmente bactérias, por meio do estabelecimento de comunidades tipo biofilme (3). No entanto, o curso desse processo patológico e a resposta clínica ao tratamento diferem entre pacientes, pois existe uma variabilidade individual na resposta inflamatória diante do desafio microbiológico, a qual é determinada por fatores genéticos ou por sua interação com fatores ambientais, como aqueles relacionados com os hábitos do indivíduo, por exemplo, fumar (4).

O processo inflamatório periapical ativo se caracteriza por um infiltrado celular com predomínio

de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T (principalmente CD4+), linfócitos B e células plasmáticas (5-8). Em conjunto, essas células produzem diversos tipos de moléculas que regulam a resposta imune do hospedeiro. As citocinas, por exemplo, são moléculas de sinalização com estrutura peptídica e características pleiotrópicas, as quais agem como mediadores e moduladores da resposta inflamatória e imune, além de cumprir papéis-chave na patogênese de doenças inflamatórias (9, 10).

A interleucina-1 (IL-1), uma citocina funcional que é a principal mediadora da resposta inflamatória, contribui na patogênese de diversas doenças crônicas caracterizadas por processos de reabsorção óssea, como a periodontite, peri-implantite e periodontite apical, ao estimular a atividade osteoclástica (1, 11-22). Essa citocina é secretada principalmente por macrófagos e células endoteliais, em resposta a antígenos bacterianos, e sua síntese é determinada pelos genes *IL-1A*, *IL-1B* e *IL-1RA*, os quais codificam para as isoformas alfa (IL-1 α), beta (IL-1 β) e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), respectivamente (9, 13).

Os genes *IL-1A* e *IL-1B*, se encontram localizados no braço longo do cromossomo dois e são considerados genes polimórficos (23-26). Isso significa que,

em mais de 1% dos indivíduos da espécie, o gene apresenta variações nas suas sequências codificantes ou reguladoras, o que poderia traduzir-se em fenótipos diferentes. Alguns polimorfismos genéticos, chamados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), constituem 90% das variações encontradas no genoma humano. Esses tipos de polimorfismos podem se apresentar na região codificante ou na região reguladora do gene, o que poderia introduzir mudanças na sequência de aminoácidos da proteína codificada ou na taxa de produção da proteína codificada.

De fato, tem sido reportado que a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no promotor de *IL-1A* (rs1800587, posição -889) e no éxon 5 de *IL-1B* (rs1143634, posição +3954), se relaciona com um incremento nos níveis de IL-1 α e IL-1 β no fluido crevicular gengival (25, 27-29). Assim, seria factível especular que a presença de tais polimorfismos poderia exacerbar a resposta inflamatória do tecido perirradicular perante o desafio microbiano, modificando o curso e a resposta ao tratamento da necrose pulpar, tal e como tem sido demonstrado por Morsani et al. (17). É assim que os polimorfismos antes mencionados poderiam ser considerados como possíveis marcadores de suscetibilidade à periodontite periapical. No entanto, a prevalência desses polimorfismos varia entre diferentes populações e o impacto que eles têm em relação às lesões perirradiculares, que no caso da população colombiana, ainda deve ser determinado. Adicionalmente, ainda não se tem estudado a interação entre tais polimorfismos e o status de fumante do paciente como fator de risco da doença.

Por esse motivo, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de polimorfismos bialélicos em *IL-1A* (rs1800587, posição -889) e *IL-1B* (rs1143634, posição +3954), numa amostra de indivíduos com periodontite periapical crônica, periápice saudável ou, avaliando sua possível associação com o hábito do tabagismo, no desenvolvimento da periodontite perirradicular.

Materiais e métodos

Amostra

Os sujeitos incluídos neste estudo (n = 54) foram recrutados na Unidade de Serviços Odontológicos da Universidad CES (Sabaneta-Colômbia), durante os meses de Fevereiro a Junho de 2011. Todos os

sujeitos aceitaram participar voluntariamente na pesquisa, depois de serem informados sobre seus objetivos e protocolo, assinando um consentimento informado aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade CES.

Incluíram-se somente aqueles pacientes com diagnóstico de necrose pulpar em um só dente e com condição perirradicular de periápice saudável ou periodontite apical crônica. O diagnóstico foi feito mediante a avaliação clínica e imagenológica, realizando provas de sensibilidade térmica e elétrica e com a obtenção de imagens por radiovi-siografia (GENDEX, KaVo Dentária GmbH; Biberach - Alemanha) e tomografia computadorizada Cone Beam (Veraviewepocs 3D Digital Imaging System; J. Morita USA, Inc.; Irvine, CA - USA). Foram excluídos aqueles pacientes com diagnóstico de abscesso periapical agudo.

Por outro lado, foi aplicado a cada paciente um questionário no qual se perguntou o seu lugar de nascimento e o de seus pais. Só foram incluídos na pesquisa aqueles pacientes que, igual a seus pais, tivessem nascido na região de Antioquia, Colômbia. Além do lugar de nascimento, também se questionou ao paciente sobre alguns antecedentes médicos e odontológicos e o hábito de fumar.

Amostragem

Foram tomadas amostras de enxágue e de cotonetes usados por cada um dos pacientes, com o objetivo de obter células da mucosa oral a partir das quais extrair o ácido desoxirribonucleico (DNA). O protocolo empregado, constituiu uma modificação dos métodos descritos por Lum e Le Marchand e Cozier et al. (30, 31).

O procedimento de obtenção das amostras aconteceu com o paciente sentado na cadeira odontológica. Dez mililitros de solução salina isotônica estéril (SSIE) foram empregados para irrigar a cavidade oral do paciente, o qual realizou um enxágue bucal vigoroso durante um minuto. O enxágue foi coletado em tubos tipo Falcon™ de 50 mL (BD Biosciences). Para a amostragem com o cotonete estéril, o paciente o esfregou no interior de sua boca, em cada uma de suas bochechas, por 30 segundos. O cotonete foi depositado no mesmo tubo que continha o enxágue bucal. A amostra foi armazenada a 4 °C até ser processada (em menos de uma semana).

Extração de DNA

A amostra foi submetida à agitação com vórtex durante cinco segundos e centrifugada a 2000 rpm durante cinco minutos, depois de retirar o cotone-te. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 10 mL de SSIA, para logo ser submetido novamente à centrifugação. Este lavado foi repetido outra vez. Logo após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi finalmente ressuspensionado em 150 µL de uma solução a 20% [w/v] da resina Chelex®-100 (Sigma-Aldrich Co, LLC; St. Louis, MO – USA), agitado com vórtex e incubado a 56 °C durante 15 minutos. Mais tarde, a amostra se homogeneizou e foi incubada a 96 °C durante dez minutos. Após permitir a sedimentação da resina e o tubo atingir a temperatura ambiente, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo novo com 10 µL de tampão Tris-Acetato-EDTA (Tampão TAE) [1X].

A concentração e o nível de contaminação proteica do DNA total extraído foram determinados por espectrofotometria medindo a absorbância no comprimento de onda de 260 nm e por meio da relação 260/280, respectivamente, empregando o equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific Inc; Wilmington, DE – USA). Para avaliar a integridade do DNA, se realizou uma eletroforese em gel de agarose

(Agarose ITM; Amresco®, Solon, Ohio – USA) ao 1%, conduzida a 8 V/cm em tampão TAE [1X]; empregando uma câmara de eletroforese Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad; Laboratories, Inc) e uma fonte de poder PowerPac™ Basic (Bio-Rad; Laboratories, Inc). Logo, o gel se coloriu com brometo de etídio (Amresco®, Solon, Ohio – USA), com uma concentração final de 5 µg/ml. A visualização desse gel ocorreu com a utilização do transiluminador EpiChem³ Darkroom (UVP BioImaging Systems; Upland, CA – USA) e o software de aquisição e análise de imagens LabWorks™ (versão 4.5).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação dos genes que codificam para as IL-1α e IL-1β humanas se realizaram num termociclador C1000TM (Bio-Rad; Laboratories, Inc.), empregando os primers relatados por Pociot et al. (25).

Na PCR para *IL-1A*, os primers amplificam um fragmento de 99 pb (Figura 1). O primer forward (5'-AAG CTT GTT CTA CCA CCT GAA CTA GG - 3') está localizado nas posições 464 a 492 do gene humano que codifica para a citocina pró-inflamatória IL-1α (GenBank acesso n. X03833.1). O primer reverse

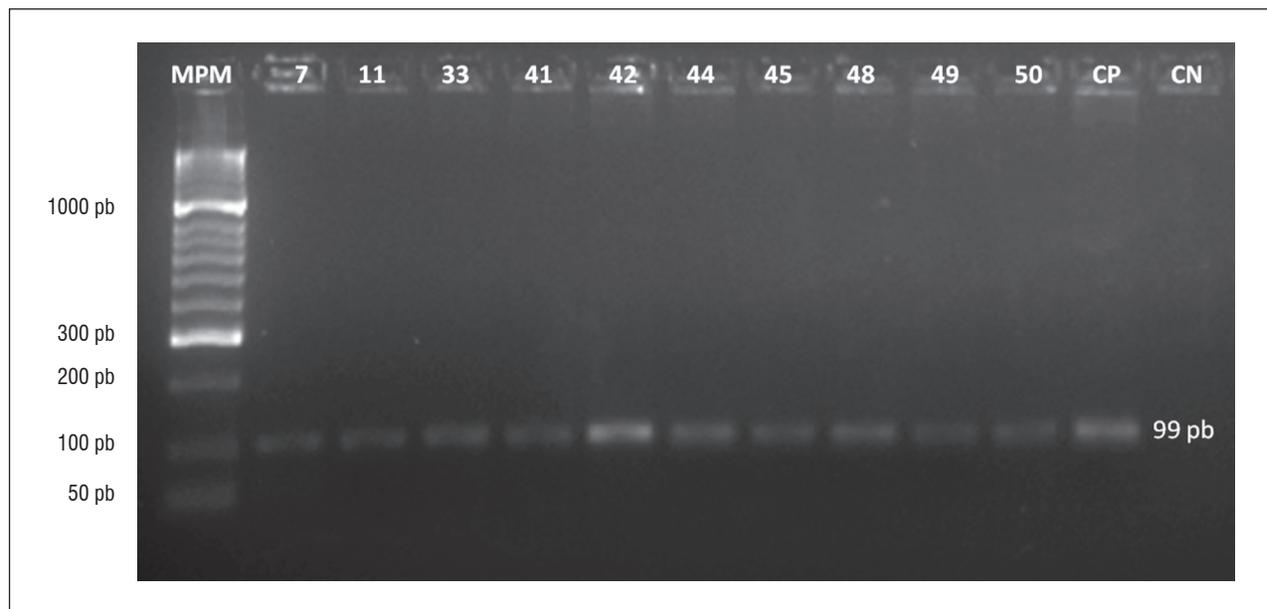


Figura 1 - Produto de amplificação da PCR para *IL-1A*. O fragmento amplificado corresponde a um fragmento de 99 pb. Os números que aparecem acima dos poços correspondem ao código designado a diferentes pacientes

Legenda: MPM = marcador de peso molecular; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

(5'- TTA CAT ATG AGC CTT CCA TG - 3') está localizado nas posições 550 a 569 do mesmo gene.

No caso da PCR para *IL-1B* os primers amplificam um fragmento de 194 pb (Figura 2) (posições +3816 a +4066). O primer forward (5'-CTC AGG TGT CCT CCA AGA AAT CAA A-3'), está localizado nas posições 269 a 293 do gene humano que codifica para a proIL-1 β – éxon cinco e íntrons quatro e cinco – (GenBank acesso n. X52430.1). O primer reverse (5'- GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG - 3') está localizado nas posições 442 a 462 do mesmo gene.

A especificidade dos primers se confirmou usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível online. O editor de alinhamento das sequências biológicas BioEdit (Ibis Biosciences; Carlsbad, CA – USA), foi empregado para estimar os tamanhos de banda esperados, assim como o correto alinhamento dos primers.

Cada mistura de reação de PCR, se realizou em um volume final de 25 μ L que continha 1X de tampão KCl, 1,5 μ M de MgCl₂, 0,2 μ M de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Taq polimerase recombinante e 1 μ L de DNA. Todos os reagentes empregados foram adquiridos com Fermentas (Fermentas Inc, Glen Burnie, MA – USA).

O perfil térmico das duas reações de amplificação consistiu em um passo inicial a 95 °C durante cinco minutos e 35 ciclos de: 94 °C, durante 30 segundos; 56 °C (para *IL-1A*) ou 53 °C (para *IL-1B*), durante 30 segundos; e 72 °C, durante 30 segundos.

Finalmente, realizou-se um passo de extensão a 72 °C durante cinco minutos.

Como controle negativo, empregou-se água livre de nucleases, estéril (Amresco®, Solon, Ohio – USA).

Os produtos de amplificação obtidos foram separados mediante electroforese em gel de agarose a 2%. A identidade de cada banda, foi inferida por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas Inc., Glen Burnie, MA – USA).

Digestão dos produtos de amplificação

Para *IL-1A*, cada mistura de reação de digestão se realizou num volume final de 23 μ L que continha: 2 μ L de tampão Tango [10X], 10 μ L do DNA amplificado e 1 μ L da enzima de restrição NcoI [10000 U/ml] (New England BioLabs Inc; Ipswich, MA – USA). A reação de digestão se realizou a 37 °C durante duas horas, enquanto a inativação foi realizada a 65 °C por 20 minutos. Os fragmentos da digestão foram analisados num gel de agarose a 4%, observando-se os seguintes perfis de restrição (5'-C/CATGG): alelo 1 (C), 83 + 16 pb; alelo 2 (T) (genótipo positivo), 99 pb; alelos mistos, 99 + 83 + 16 pb (Figura 3).

Para *IL-1B* cada mistura de reação de digestão foi realizada num volume final de 30 μ L que continha: 3 μ L de tampão 3 [10X], 0,3 μ L de albumina de soro bovino [100X], 6,5 μ L de água livre de DNases, 20 μ L do DNA amplificado e 0,2 μ L da enzima de restrição

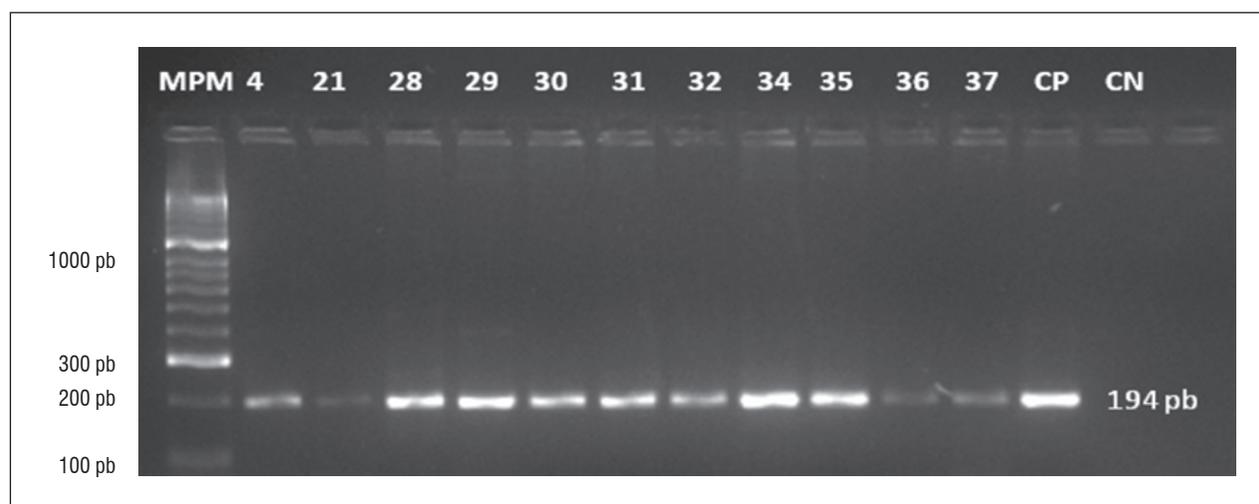


Figura 2 - Produto de amplificação da PCR para *IL-1B*. O fragmento amplificado corresponde a um fragmento de 194 pb. Os números que aparecem acima dos poços correspondem ao código designado a diferentes pacientes

Legenda: MPM = marcador de peso molecular; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

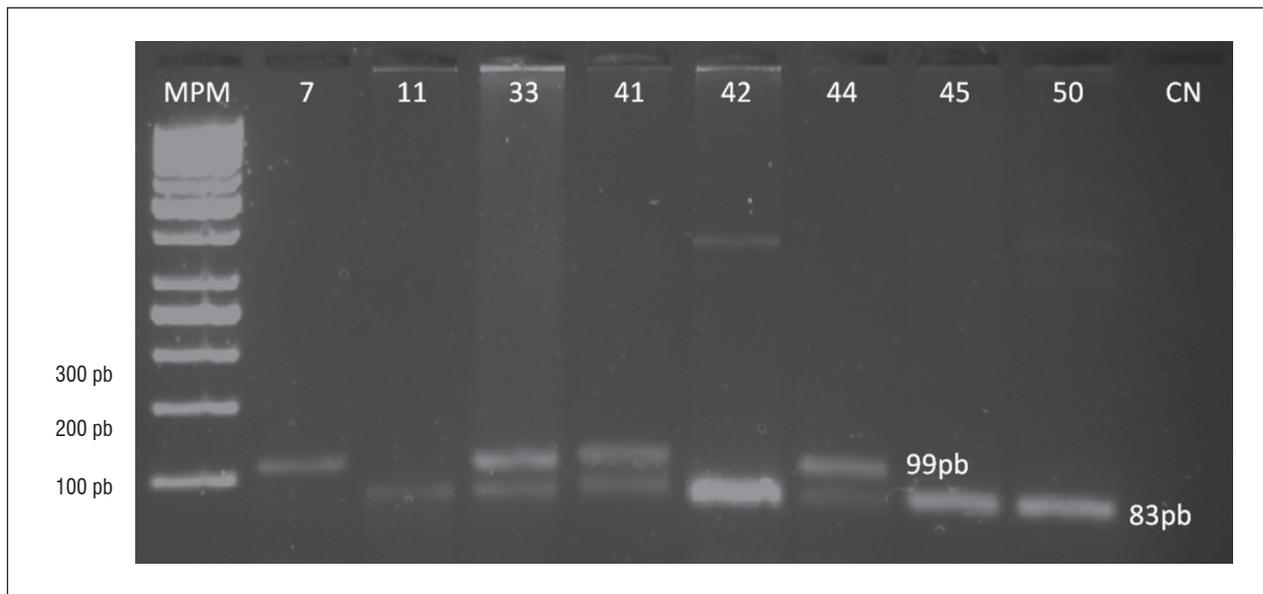


Figura 3 - Perfil de restrição do fragmento da *IL-1A*. Os indivíduos homocigotos para o alelo 1 (alelo selvagem) apresentam dois fragmentos de digestão: 83 + 16 pb. Na imagem só se observa o fragmento de 83 pb. Os indivíduos homocigotos para o alelo 2 (alelo mutante) evidenciam um único fragmento de 99 pb. Os indivíduos heterocigotos ou com alelos mistos apresentam três fragmentos de restrição: 99 + 83 + 16 pb. Os pacientes com os códigos 11, 42, 45 e 50 correspondem a indivíduos homocigotos para o alelo 1. O paciente com o código 7 corresponde a um sujeito homocigoto para o alelo 2. Os pacientes com os códigos 33, 41 e 44, possuem alelos mistos

Legenda: MPM = marcador de peso molecular; CN = controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Taq α I] [20000 U/ml] (New England BioLabs Inc.; Ipswich, MA – USA). A reação de digestão aconteceu a 65 °C durante duas horas, enquanto a inativação foi realizada a 80 °C por 20 minutos. Os fragmentos da digestão foram analisados num gel de agarose a 4%, observando-se os seguintes perfis de restrição (5'-T/CGA): alelo 1 (C), 97 + 85 + 12 pb; alelo 2 (T) (genótipo positivo), 182 + 12 pb; alelos mistos, 182 + 97 + 85 + 12 pb (Figura 4).

Análise estatística

As variáveis qualitativas foram resumidas por meio de proporções (frequências absolutas e relativas). A variável idade foi expressada como média \pm desvio padrão (DP). O teste Kolmogorov-Smirnoff, se empregou para avaliar a distribuição normal dessa variável. O teste de Qui-quadrado para independência (χ^2) se utilizou para comparar as frequências alélicas para cada polimorfismo e o status de fumante, entre o grupo de pacientes com periodontite apical crônica e aqueles com periápice saudável.

Estabeleceu-se um nível de significância estatística de 5%. As frequências de genótipo para cada polimorfismo foram comparadas com as relações de Hardy-Weinberg, empregando o programa integrado para análise de dados de genética de populações Arlequin, versão 3.5.1.3 (32). Adicionalmente, realizou-se uma análise de regressão logística (modelo enter), calculando relações de disparidade (OR) com intervalos de confiança de 95%, para estimar o risco de desenvolver periodontite apical crônica. O programa estatístico STATA 10.0 se empregou para realizar todas as análises estatísticas.

Resultados

A amostra consistiu em 54 indivíduos da região de Antioquia, Colômbia, 36 mulheres e 18 homens, com uma média de idade de $46,8 \pm 15,7$ anos. Do total de pacientes avaliados, 27 foram diagnosticados com periodontite periapical crônica, enquanto os 27 restantes apresentaram necrose pulpar com periápice saudável.

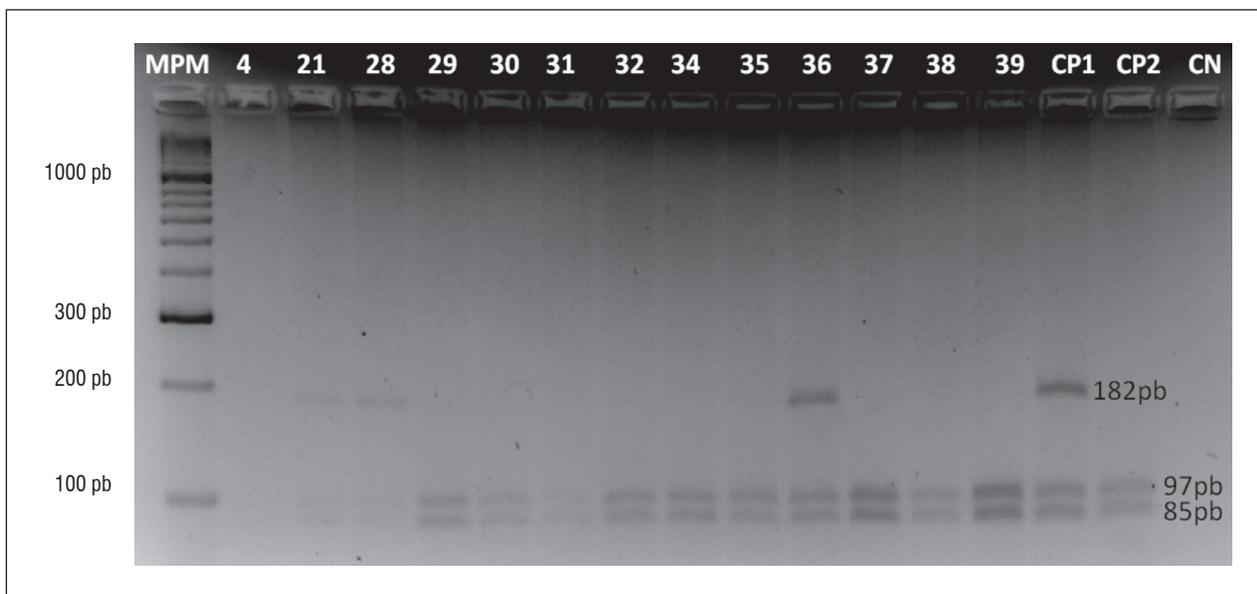


Figura 4 - Perfil de restrição do fragmento da *IL-1B*. Os indivíduos homocigotos para o alelo 1 (alelo selvagem) apresentam três fragmentos de digestão: 97 + 85 + 12 pb. Na imagem não se observa o fragmento de 12 pb. Os indivíduos homocigotos para o alelo 2 (alelo mutante) evidenciam dois fragmentos de restrição: 182 + 12 pb. Os indivíduos heterocigotos ou com alelos mistos apresentam quatro fragmentos de restrição: 192 + 97 + 85 + 12 pb. Os pacientes com os códigos 4, 29 a 35 e 37 a 39 correspondem a sujeitos homocigotos para o alelo 1. Os pacientes com os códigos 21, 28 e 36, correspondem a indivíduos com alelos mistos

Legenda: MPM = marcador de peso molecular; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quando os pacientes foram interrogados com respeito aos antecedentes odontológicos, como a presença de doença periodontal, 11,1% dos pacientes afirmou padecer de doença periodontal. Com respeito ao hábito de fumar, 11,1% dos pacientes manifestou ser fumante ativo, enquanto o 16,7% manifestou ter sido fumante ativo, embora não atualmente. Onze por cento dos pacientes se declararam fumantes passivos. Na Tabela 1, mostra-se a distribuição de gênero, doença periodontal e status de fumante nos indivíduos incluídos no estudo.

A frequência alélica e a distribuição do genótipo de todos os polimorfismos nos pacientes com periápice saudável e periodontite apical crônica são mostrados na Tabela 2. Tais frequências alélicas foram encontradas em equilíbrio Hardy-Weinberg. Não se apresentaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos polimorfismos avaliados, entre ambos os grupos de indivíduos analisados.

Em que pese aos resultados anteriores, explorou-se uma análise multivariada que empregou um modelo de regressão logística, conforme descreve a Tabela 3.

Neste modelo, os fumantes ativos que possuem pelo menos um alelo tipo 2 (alelo mutante) em *IL-1B* +3954 apresentam 4,8 vezes mais risco de sofrer periodontite apical do que aqueles indivíduos não fumantes e homocigotos para o alelo 1 (alelo selvagem). No entanto, essa associação não foi estatisticamente significativa ($p = 0,313$). Adicionalmente, os fumantes ativos, assim como aqueles que possuem pelo menos um alelo tipo 2 em *IL-1A* -889, apresentam 3,9 e 3,2 vezes mais risco, respectivamente, de desenvolverem periodontite apical após sofrerem necrose pulpar; porém, as associações também não foram estatisticamente significativas ($p = 0,191$ e $p = 0,209$, respectivamente).

Discussão

Neste estudo, encontrou-se associação, embora não estatisticamente significativa, entre o efeito combinado de fumar e apresentar pelo menos um alelo mutante em *IL-1B* (posição +3954, C/T), com o desenvolvimento de periodontite periapical (OR = 4,8;

Tabela 1 - Descrição de características demográficas, antecedentes odontológicos e hábitos de tabagismo dos indivíduos avaliados

Condição		Periápice saudável (n = 37)	Periodontite apical crônica (n = 37)	Valor p
Gênero*	Feminino	18 (66,7%)	18 (66,7%)	1,000
	Masculino	9 (33,3%)	9 (33,3%)	
Doença periodontal*	Sim	1 (3,7%)	5 (18,5%)	0,083
	Não	26 (96,3%)	22 (81,5%)	
Fumante ativo*	Sim	2 (7,4%)	4 (14,8%)	0,604
	Não atualmente	4 (14,8%)	5 (18,5%)	
	Nunca	21 (77,8%)	18 (66,7%)	
Fumante passivo*	Sim	3 (11,1%)	3 (11,1%)	1,000
	Não	24 (88,9%)	24 (88,9%)	

Legenda: * = Valores expressados como frequências absolutas e relativas (entre parênteses).

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Distribuição do polimorfismo *IL-1A* -889 e *IL-1B* +3954 entre os pacientes com periodontite apical crônica ou periápice saudável

Gene	SNP (variante)	Alelo	Periápice saudável (n = 37)	Periodontite apical crônica (n = 37)	Valor p
<i>IL-1A</i> *	- 889 (C/T)	1	14 (51,9%)	12 (44,4%)	0,689
		2	10 (37,0%)	13 (48,1%)	
		Misto	3 (11,1%)	2 (7,4%)	
<i>IL-1B</i> *	+ 3954 (C/T)	1	17 (63,0%)	14 (51,9%)	0,511
		2	1 (3,7%)	3 (11,1%)	
		Misto	9 (33,3%)	10 (37,0%)	

Legenda: * = Valores expressados como frequências absolutas e relativas (entre parênteses).

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 - Regressão logística com o modelo enter

Condição	OR (intervalo de confiança de 95%)	Valor p
Fumante ativo	3,858 (0,510 – 29,173)	0,191
Presença de pelo menos um alelo mutante em <i>IL-1A</i> -889	3,162 (0,525 – 19,023)	0,209
Presença de pelo menos um alelo mutante em <i>IL-1B</i> +3954	0,958 (0,107 – 8,536)	0,969
Presença de pelo menos um alelo mutante em <i>IL-1A</i> -889e <i>IL-1B</i> +3954	0,799 (0,058 – 11,063)	0,867
Fumante ativo e presença de pelo menos um alelo mutante em <i>IL-1A</i> -889	0,083 (0,005 – 1,310)	0,077
Fumante ativo e presença de pelo menos um alelo mutante em <i>IL-1B</i> +3954	4,764 (0,229 – 99,094)	0,313

Fonte: Dados da pesquisa.

0,2 – 99,1). O mesmo ocorreu com as variáveis fumar (OR = 3,9; 0,5 – 29,2), ou apresentar pelo menos um alelo mutante em *IL-1A* (posição –889, C/T) (OR = 3,7; 0,5 – 29,2).

Desde a perspectiva patológica, as isoformas da IL-1, junto com o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a IL-6, constituem alguns dos principais fatores estimuladores da ativação dos osteoclastos (33). Em razão disso, durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada ou persistente, é possível que exista um desequilíbrio no metabolismo ósseo a favor dos processos de reabsorção (33). As células progenitoras de osteoclastos (OCPs), assim como os osteoclastos, secretam IL-1, que é capaz de induzir ciclos de autoamplificação de maneira autócrina ou parácrina (18-21). Adicionalmente, essa citocina pode estimular a diferenciação das OCPs em osteoclastos maduros, especialmente quando estão em contato com proteínas de matriz extracelular; o mesmo que a atividade osteoclástica, logo após estimular a síntese de prostaglandina E no osso (18-22, 34).

Dado o papel da IL-1 na patogênese de diversas doenças inflamatórias, onde uma resposta exacerbada resulta em processos de reabsorção óssea patológica, e a que genótipos diferentes derivam em características fenotípicas diferentes, numerosos estudos têm sido realizados para tentar clarificar, para populações definidas, o papel de diferentes polimorfismos genéticos na resposta biológica da IL-1 (4).

Por exemplo, Kornman et al. (35) reportaram a associação entre o alelo 2 – alelo mutante – do polimorfismo bialélico na posição +3954 do gene *IL-1B* com a severidade da doença periodontal, em indivíduos não fumantes de 40 a 60 anos de idade (OR 18,9). Funcionalmente, tal genótipo se associou com um incremento de duas a quatro vezes na produção de IL-1 β (35). Tais achados, foram confirmados pelo estudo realizado por Gore et al. (36), quem, além disso, reportaram um desequilíbrio de ligação entre o alelo 2 do polimorfismo *IL-1B* +3954 e o alelo 2 (alelo mutante) do polimorfismo bialélico de *IL-1A* na posição –889, em pacientes com periodontite e controles saudáveis, sugerindo que tais polimorfismos têm um papel na suscetibilidade à periodontite do adulto. Logo, McGuire e Nunn (37) reportaram que a presença do genótipo positivo do polimorfismo *IL-1B* +3954, ou o tabagismo, se associaram de maneira significativa com a perda dentária nos pacientes com periodontite. É assim como esse genótipo incrementou o risco de perda dentária 2,7 vezes,

enquanto o tabagismo o fez 2,9 vezes (37). O efeito combinado de ambos os fatores, incrementou o risco de perda dentária 7,7 vezes (37). Os autores concluem que, conhecer o genótipo +3954 de *IL-1B* e o status de fumante do paciente, poderia ajudar ao clínico a determinar o prognóstico de sobrevivência dos dentes com afetação periodontal, além de otimizar a estratégia de tratamento (37).

Por outro lado, Siqueira et al. (38) reportaram que não existe associação entre polimorfismos bialélicos em *IL-1A* ou *IL-1B* e o desenvolvimento de periodontite apical pós-tratamento de condutos, numa população de pacientes brasileiros. No entanto, Morsani et al. (17) demonstraram que existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição de polimorfismos genéticos em *IL-1B*, entre pacientes com periodontite apical crônica (70,6 %) e os controles com periápice saudável (24,6 %), para a população estadunidense avaliada. A inconsistência dos resultados entre ambos os estudos pode ser devida a variações étnicas entre as duas amostras, pois se sabe que a frequência dos polimorfismos genéticos varia entre populações com diferentes grupos étnicos (39, 40).

Desde a perspectiva étnica, diversos autores têm demonstrado que a população de Antioquia está formada pela mestiçagem entre espanhóis, indígenas e africanos. Assim, haplogrupos do cromossomo Y mostram uma ascendência masculina 94% europeia, 5% africana e 1% indígena, enquanto os haplogrupos do DNA mitocondrial revelam uma ascendência materna 90% indígena, 8% africana e 2% europeia (41, 42). Por tal motivo, é relevante avaliar a presença de diversos polimorfismos genéticos e sua associação com diversos processos patológicos, em populações específicas.

Um problema notável para a maioria de estudos de associação entre polimorfismos de IL-1 e diversos contextos patológicos é o tamanho relativamente pequeno da amostra, tal e como foi o caso no estudo aqui apresentado (n = 54), o que limita a obtenção de conclusões robustas. Além disso, os desenhos de casos e controles adquirem relevância em estudos de associação de polimorfismos genéticos com a periodontite periapical, dado o fato de que esta é uma doença multifatorial. Neste estudo, os grupos de pacientes avaliados não tiveram a mesma distribuição de idade e outras variáveis de confusão, pelo que é totalmente factível que ambos os grupos tenham tido cargas diferentes de exposição aos fatores de risco avaliados.

A epidemiologia genética tem sido definida por Morton como “uma ciência que se ocupa da etiologia,

distribuição e controle de doenças em grupos de parentes; igual que das causas herdadas de doença nas populações” (43). Essa ciência combina os enfoques diferentes da genética de populações e a epidemiologia, para calcular o risco de desenvolver uma doença determinada em relação ao genótipo e sua interação com fatores ambientais (44, 45).

No âmbito da epidemiologia genética, evitar o fator de risco ambiental (por exemplo, o tabagismo) que interage com a suscetibilidade genética (genótipo positivo para o marcador avaliado), com tendência a determinado processo patológico, constitui um exemplo de prevenção primária; procura-se, então, reduzir a incidência e, portanto, a prevalência de uma doença na população.

Conclusão

Parece existir uma associação entre o efeito combinado de fumar e o alelo mutante do polimorfismo *IL-1B* (rs1143634, posição +3954), igual ao efeito independente de fumar e o polimorfismo genético em *IL-1A* (rs1800587, posição -889), e a periodontite periapical crônica na população de Antioquia, Colômbia. No entanto, são necessários estudos adicionais que incluam um tamanho de amostra maior e que controlem o efeito de diversas variáveis de confusão entre os grupos avaliados.

Agradecimentos

Os autores deste artigo agradecem à Direção de Pesquisa e à Faculdade de Odontologia da Universidade CES pelo financiamento deste estudo (código 2011DI02).

Declaração de conflito de interesses

Os autores manifestam que não existem conflitos de interesses para a publicação deste artigo.

Referências

- Burgener B, Ford AR, Situ H, Fayad MI, Hao JJ, Wenckus CS, et al. Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis. *J Endod.* 2010;36(8):1307-10.
- Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348-81.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007; 18(4):267-80.
- McLean MH, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):370-74.
- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-71.
- Sol MA, Tkaczuk J, Voigt JJ, Durand M, Sixou M, Maurette A, et al. Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. *Oral Microbiol. Immunol.* 1998;13(4):253-8.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod.* 1992;18(9):422-6.
- Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res.* 1989;68(5):830-4.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010. p. 267-302.
- Moran Y, Cañas M, Grimán P, Rivero M, Chiurillo M. Distribución de polimorfismos genéticos de interlequina-1 en individuos de la región centrooccidental de Venezuela. *Acta Biol Colomb.* 2009;14(1):185-94.
- Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:60-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.
- Deo V, Bhongade ML. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dent Today.* 2010; 29(9):60-2, 64-6.
- Grigoriadou ME, Koutayas S-O, Madianos PN, Strub J-R. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence Int.* 2010; 41(6):517-25.
- Bormann K-H, Stühmer C, Z'Graggen M, Kokemöller H, Rücker M, Gellrich N-C. IL-1 polymorphism and periimplantitis. A literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2010;120(6):510-20.

15. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Zwahlen M, Salvi GE. Association of the composite IL-1 genotype with peri-implantitis: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(11):1154-62.
16. Andreiotelli M, Koutayas S-O, Madianos PN, Strub J-R. Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantitis: a literature review. *Quintessence Int.* 2008;39(4):289-98.
17. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2011;37(4):455-9.
18. Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA, et al. Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1991;6(8):827-33.
19. O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest.* 1997;76(4):457-65.
20. Yao Z, Xing L, Qin C, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9917-24.
21. Boyce BF, Schwarz EM, Xing L. Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18(4):427-32.
22. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature.* 1983;306(5941):378-80.
23. D'Eustachio P, Jadidi S, Fuhlbrigge RC, Gray PW, Chaplin DD. Interleukin-1 alpha and beta genes: linkage on chromosome 2 in the mouse. *Immunogenetics.* 1987;26(6):339-43.
24. Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics.* 1994;19(2):382-84.
25. Pociot F, Mølvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992;22(6):396-402.
26. Bailly S, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Genetic polymorphism of human interleukin-1 alpha. *Eur J Immunol.* 1993;23(6):1240-5.
27. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, et al. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999;70(6):567-73.
28. Ferreira SB Jr, Trombone APF, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W Jr, Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun.* 2008;76(8):3725-34.
29. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res.* 2000;79(11):1864-9.
30. Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998;7(8):719-24.
31. Cozier YC, Palmer JR, Rosenberg L. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the Black Women's Health Study. *Ann Epidemiol.* 2004;14(2):117-22.
32. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005;1:47-50.
33. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(12):1361-6. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x.
34. Sato K, Fujii Y, Kasono K, Saji M, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of prostaglandin E2 and bone resorption by recombinant human interleukin 1 alpha in fetal mouse bones. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1986;138(2):618-24.
35. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24(1):72-7.

36. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998;25(10):781-5.
37. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol*. 1999;70(1):49-56.
38. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC. Relationship between Fcgamma receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. *J Endod*. 2009;35(9):1186-92.
39. Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol*. 2000;71(2):164-71.
40. Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol*. 2000;71(5):723-8.
41. Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al. Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103(19):7234-9.
42. Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortíz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J, et al. Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in north-west Colombia. *Am J Hum Genet*. 2000;67(5):1287-95.
43. Morton NE. Fifty years of genetic epidemiology, with special reference to Japan. *J Hum Genet*. 2006;51(4):269-77.
44. McLean MH, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):370-4.
45. Morton NE. Commentary: Growth of beanbag genetics. *Int J Epidemiol*. 2008;37(3):445-6.

Recibido: 08/12/2011

Received: 12/08/2011

Aprovado: 08/02/2012

Approved: 02/08/2012