

# ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO rs1126478 NO GENE *LTF* COM A PERIODONTITE AGRESSIVA (PerioC) NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

**Palavras-Chave:** POLIMORFISMO GENÉTICO, PERIODONTITE, LACTOFERRINA

**Autores:** Bruna Consolaro de Almeida<sup>1</sup>, Camila Schmidt Stolf<sup>1</sup>, Karina Gonzales Silvério Ruiz<sup>1</sup>, Márcio Zaffalon Casati<sup>1</sup>, Enilson Antonio Sallum<sup>1</sup>, Renato Corrêa Viana Casarin<sup>1</sup>.

## Instituição:

1. Departamento de Prótese e Periodontia- Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil.

---

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial e patogênese complexa, cujo desenvolvimento é resultado do desequilíbrio da relação entre microbiota, fatores imunológicos, ambientais e comportamentais do hospedeiro, sendo este processo regulado por fatores genéticos [1, 2, 3, 4]. Clinicamente, manifesta-se por perda de inserção conjuntiva, reabsorção óssea e, no pior cenário, perda dentária [1].

A periodontite Grau C (PerioC), embora menos prevalente na população [5], apresenta importante impacto na qualidade de vida dos pacientes devido a sua severidade. Casos de rápida progressão, manifestação em idade precoce, acometimento de pacientes jovens e saudáveis clinicamente, histórico de agregação familiar e prognóstico desfavorável aos tratamentos convencionais diferem a entidade Perio4C da Perio AB [6, 7, 8]. Essas características potencializam o conceito de influência de fatores genéticos na susceptibilidade da doença periodontal.

Dada a relevância genética na periodontite, Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs) tem sido alvo de pesquisas na área. SNPs são considerados marcadores moleculares capazes de determinar predisposições a certas doenças, principalmente para a PerioC, devido a seu fenótipo mais forte [2, 3].

Um dos genes de interesse da literatura é o *LTF*, responsável pela expressão de lactoferrina (LT), uma glicoproteína multifuncional presente em fluídos como saliva e leite. Dentre suas funções, destaca-se a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória e imunorregulatória [9]. O polimorfismo rs1126478, localizado no gene *LTF*, é responsável pela troca de aminoácidos na região do terminal N região alfa hélice da lactoferrina humana, região relacionada com a função antimicrobiana [10].

Estudos tem buscado encontrar associações entre SNPs no gene da lactoferrina e doenças bucais como cárie dental e periodontite [11]. Entretanto, os resultados da relação do rs1126478 com a periodontite são variáveis e controversos, uma vez que as consequências clínicas dessa alteração são dependentes da etnia da amostra analisada [11]. IKUTA et al. (2013) não encontraram diferença significativa entre o polimorfismo rs1126478 com a periodontite crônica ou agressiva em população japonesa [10]. Entretanto, a associação desse SNP foi validada em população taiwanesa para periodontite agressiva e em afro-americanos com as classificações periodontite juvenil e agressiva, mas não em indivíduos caucasianos [9, 12, 12].

Na população brasileira, ainda não há estudos que validem a associação entre o polimorfismo rs1126478 e a periodontite, seja esta perioAB ou PerioC. Considerando que o Brasil é constituído por uma população geneticamente heterogênea e que a ancestralidade influencia diretamente no genótipo do indivíduo, é ressaltada a importância de validar, em uma amostra brasileira, alterações genéticas previamente descritas em outras populações [14].

Por fim, um cenário com fatores genéticos elucidados permitiria uma melhor compreensão da etiopatogenia da periodontite, assim como a identificação de pacientes mais susceptíveis à essa doença, principalmente para a PerioC. Assim, novos protocolos de tratamento poderiam ser instituídos, possibilitando um diagnóstico e uma abordagem clínica precoce, de modo a reduzir os defeitos funcionais e estéticos que acometem os pacientes afetados [3].

Diante do exposto, o presente estudo tem por finalidade identificar a presença de associação entre polimorfismo de nucleotídeo único rs1126478 (T>C) no gene *LTF* em pacientes com Periodontite Grau C na população brasileira.

## METODOLOGIA

Para a investigação da relação proposta, foram selecionados pacientes para dois grupos distintos: doença (PerioC) e saúde periodontal (SP) para coleta de saliva, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Os pacientes incluídos realizaram bochecho com 5mL de dextrose a 3% durante 1 minuto, sendo adicionado 3mL de TNE com álcool para permitir conservação dessas amostras em laboratório.

Os critérios de inclusão utilizados para pesquisa foram baseados nos seguintes diagnósticos:

**Diagnóstico de Periodontite Grau C (n=199):** presença de bolsas periodontais verdadeiras e perda óssea radiográfica em pacientes maiores de 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 [15, 16];

**Diagnóstico de Saúde Periodontal (n=191):** Índice de sangramento gengival – IG, e sangramento a sondagem – SS < 10%, nível de inserção clínica – NIC  $\leq$  3mm [6];

**Critérios de Exclusão para os dois grupos:** 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; hábito tabagista, gravidez ou período de lactação.

### 1. Extração de DNA

No laboratório, para a obtenção das células epiteliais, foi adicionado água destilada para que as amostras atingissem o mesmo volume. Posteriormente, foi instituído o protocolo de extração descrito por TREVILATTO & LINE (2000) [17]. Foi observado a formação de um pellet de células sedimentadas no fundo dos tubos e repetido a centrifugação e descarte do sobrenadante. Em sequência foi acrescentado 1mL de solução de lise (10mM Tris pH 8.0, 0.5% SDS, 5mM EDTA) aos tubos e todo o conteúdo foi homogeneizado, para permitir a exposição do DNA das células. A próxima etapa consistiu em adicionar 10  $\mu$ L proteinase K (20 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a esta mistura e incubar overnight a 55°C em movimentação leve.

### 2. Purificação do DNA

No dia seguinte à incubação das células bucais, as proteínas e contaminantes foram removidos da amostra pela adição de 470  $\mu$ L de solução de acetato de amônio 8M e EDTA 1mM e encaminhados para centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi dividido em eppendorfs estéreis duplicados, adicionado 540  $\mu$ L de isopropanol para a precipitação do DNA genômico e, posteriormente, repetido a centrifugação.

Foi realizada adição de 1mL de etanol 70% gelado para lavagem do DNA, seguido de movimentação suave com uso da pipeta até a soltura do pellet de DNA. Posteriormente, foi transferido cuidadosamente esse conteúdo para o outro tubo da dupla. Após a última centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, o etanol foi descartado e foi mantido os tubos abertos para sua evaporação total dos tubos. Por fim, o DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE pH 8.0 (10 mM Tris e 1 mM EDTA) e armazenado a freezer a -20°C.

Após a extração e purificação do DNA, a qualidade e a concentração do material genético foram avaliadas através da mensuração de 1 µL de amostra no equipamento de espectrofotometria Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) para que fosse possível diluir as amostras à uma concentração padrão de 10ng/mL. As próximas etapas do projeto contemplaram a genotipagem do polimorfismo genético rs1126478 no gene *LTF* através de ciclos de Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR), que irão amplificar fragmentos específicos do DNA das amostras obtidas para a análise da distribuição de genótipos e frequência alélica na população do estudo.

### 3. Padronização da sonda Taqman

A análise do polimorfismo genético rs1126478 no gene *LTF*, assim como qualquer análise de SNPs, preconiza a padronização de primers específicos para a região de interesse do DNA do estudo. Para essa padronização foram realizadas Reações em Cadeia da DNA Polimerase em tempo real (rt-PCR), utilizando o sistema de sondas Taqman® para discriminação de alelos (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e o aparelho LightCycler 480 (Roche), conforme ilustrado pela figura 1. As reações foram realizadas em um volume total de 10 µL por poço (1 µL de DNA a 10 ng/mL, 5 µL de 2X TaqMan master mix, 0,5 µL de 20X Assay Working Stock (sonda TaqMan para determinação do SNP rs1126478 e 4,5 µL de Nuclease Free Water), distribuídos em uma placa de 96 poços. Como padronização das especificações da corrida de rt-PCR, seguimos a recomendação do fabricante. A fluorescência da amplificação do PCR foi detectada utilizando StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e analisada com o software do fabricante.

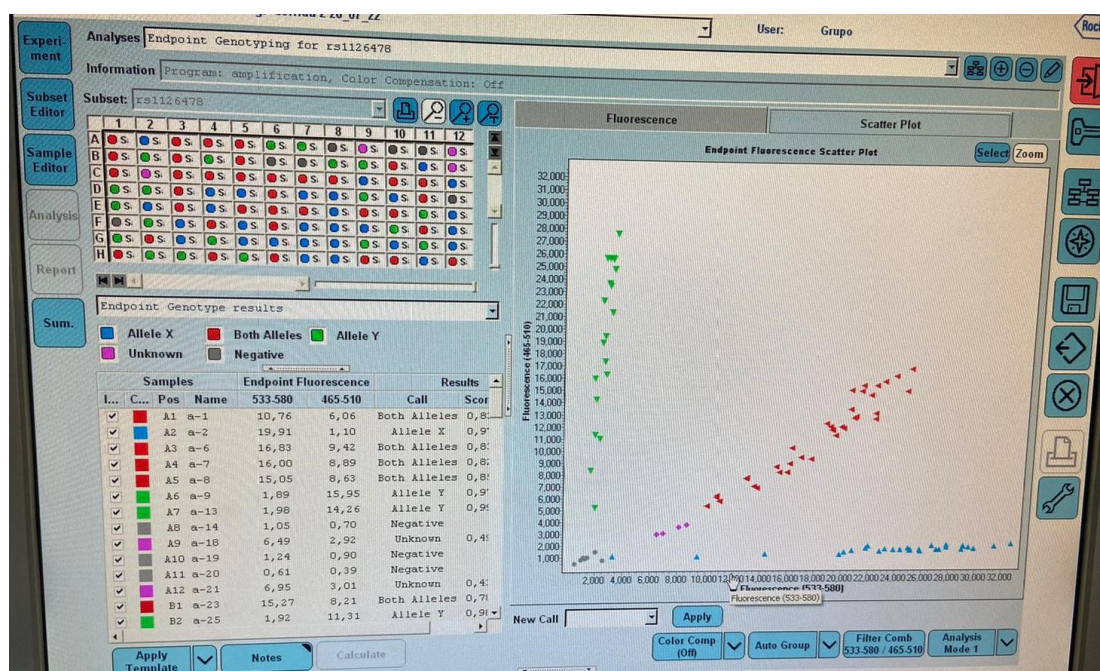


Imagem 1. Exemplo de discriminação alélica resultante de uma das corridas de rt-PCR para o grupo PerioC.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 indica os dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo em ambos grupos, PerioC e SP.

Características	PerioC	Saúde
Idade (média ± desvio padrão)	44.86 ± 10.29	28.7 ± 5.12
Gênero (% - M/F)	31 / 69	38 / 62
Etnia (% - C / Af / As)	56 / 44 / 0	67.6 / 29.2 / 0.3
Índice de Placa (média ± desvio padrão)	23.10 ± 6.53	19.36 ± 5.38
Índice de Sangramento (média ± desvio padrão)	24.83 ± 9.05	19.39 ± 2.31
Profundidade de Sondagem (média ± desvio padrão)	2.35 ± 0.05	2.13 ± 0.23
Nível Clínico de Inserção (média ± desvio padrão)	5.44 ± 1.04	4.15 ± 0.72

**Tabela 1.** Dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo.

Segundo o fabricante da sonda, ThermoFisher Scientific, o SNP abordado nessa pesquisa não apresenta frequência alélica considerável para todos alelos, ou seja, não tem comportamento polialélico. Dessa forma, para as amostras dessa pesquisa foram considerados os alelos T (eixo Y) e C (eixo X), cuja frequência observada em outros estudos foi maior.

A tabela 2 apresenta a distribuição das frequências alélicas (T/C) e genóticas (TC/ TT/ CC) encontrada nas amostras de DNA coletadas a partir da saliva dos grupos PerioC (periodontite Grau C) e SP (saúde periodontal). A análise estatística aplicada foi o teste qui-quadrado, sendo adotado o nível de significância de 5% para o estudo ( $p \leq 0,05$ ). A distribuição dos alelos T e C para a variação rs1126478 no gene *LTF* apresentou diferença estatística significativa ( $p=0,008$ ) entre as populações PerioC e SP. A distribuição dos genótipos TC, TT e CC também se revelou diferente entre os grupos analisados ( $p=0,005$ ).

O polimorfismo estudado apresenta uma substituição de base T>C no genótipo do indivíduo. Considerando a maior frequência do alelo T na amostra SP, do alelo C na amostra com PerioC e a correlação com os respectivos genótipos nessas populações, podemos sugerir uma associação entre esses dados e periodontite Grau C na população brasileira.

Nas amostras estudadas, o alelo C parece estar mais associado com a susceptibilidade à PerioC, assim como o alelo T sugere uma certa proteção ao indivíduo (saúde periodontal). Apesar da associação encontrada, recomendamos a realização de mais estudos para identificar como o polimorfismo rs1126478 (T>C) no gene *LTF* gera maior probabilidade de desenvolvimento de PerioC na população.

SNP rs1126478 (T>C)		PerioC (%)	SP (%)
Alelos (T / C)*	T	44,07	54,95
	C	55,93	45,05
Genótipos (TC / TT / CC)*	TC	40,2	35,60
	TT	19,10	34,55
	CC	29,65	25,13

**Tabela 2.** Frequência alélica (C/T) e genótipica (TC/ TT/ CC) do SNP rs1126478 para o gene *LTF* nas populações PerioC e SP. \*Apresenta diferença estatística entre PerioC e SP ( $p \leq 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

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

## BIBLIOGRAFIA

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17038.
2. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012; 58(1):37-68.
3. Laine M, Jepsen S, Loos BG. Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health*. 2014; Rep. 1:272-278.
4. Loos BG, Papantonopoulos G, Jepsen S, Laine ML. What is the contribution of genetics to periodontal risk? *Dent Clin North Am*. 2015; 59(4):761-780.
5. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53:28-44.
6. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45 Suppl 20:S1-S8.
7. Albandar JM. Aggressive periodontitis: Case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014; 65(1):13-26.
8. Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol 2000*. 2010; 53:154-166.
9. Vellyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, Fine DH. 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
10. Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, Kido J, Nagata T. Gene polymorphism of  $\beta$ -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology*. 2015 Jan; 103(1):66-74.
11. Fine DH. Lactoferrin: A Roadmap to the Borderland between Caries and Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2015 Jun; 94(6):768-76.
12. Jordan WJ, Eskdale J, Lennon GP et al. 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; 6:632–635.
13. Wu, Y.-M., Juo, S.-H., Ho, Y.-P., Ho, K.-Y., Yang, Y.-H., & Tsai, C.-C. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *Journal of Periodontal Research*. 2009; 44(3), 418–424.
14. 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; 58(2):211-217.
15. 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; 83:988-998.
16. Taiete T, Casati MZ, Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti Junior 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; 47, 281–292.
17. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large dna fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000; 18(1):6-9.