

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Departamento de Odontologia

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO VEGF NA PERIODONTITE
CRÔNICA E AGRESSIVA**

Milena Moreira de Araújo

Belo Horizonte
2010

Milena Moreira de Araújo

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO VEGF NA PERIODONTITE
CRÔNICA E AGRESSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título em Mestre em Odontologia, área de concentração Clínicas Odontológicas – Ênfase Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Belo Horizonte

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

A663p Araújo, Milena Moreira de
Polimorfismo genético do VEGF na periodontite crônica e agressiva / Milena
Moreira de Araújo. Belo Horizonte, 2010.
54f. : il.

Orientador: Rodrigo Villamarim Soares
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Periodontite crônica. 2. Periodontite agressiva. 3. Polimorfismo (Genética).
4. Fatores de crescimento do endotélio vascular. 5. Neovascularização. I. Soares,
Rodrigo Villamarim. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.311.2

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Dedico esse trabalho aos meus pais e irmãos,
pelo apoio, incentivo e amor.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças e sabedoria, e com louvor nos lábios agradeço por mais essa vitória.

Aos meus amados: Beatriz e Moreira. Obrigada pela força, incentivo e amor incondicional.

Meus queridos irmãos: Marcelo e Mônica. O apoio de vocês foi essencial.

Ao Paulinho, pelo amor e companheirismo de todos esses anos. Pela paciência e eventuais ausências.

As amigas e queridas companheiras Anna Júlia e Iara pelo carinho e incentivo.

Ao meu orientador, professor Rodrigo Villamarim Soares, pelo apoio constante, pela competência e pela amizade.

Aos professores Elton Gonçalves Zenóbio e Adriana de Castro Amédée Péret, pelo exemplo de profissionais, pelos conhecimentos transmitidos e contribuição para minha formação profissional.

Ao professor Paulo Eduardo Alencar de Souza pelo apoio na realização desse projeto.

Ao professor Roberval de Almeida Cruz, pelo apoio e atenção.

As alunas de graduação Karine e Marina, pela grande contribuição na realização desse projeto e sobre tudo pela amizade.

Aos meus queridos colegas de mestrado: Amaro, Ana Cristina, Ângela, Cláudia, Deícola, Juliana, Kênia, Pollyanna, Rildo e Yuri, pela ajuda e companheirismo.

Às secretárias do mestrado Angélica e Silvânia, pelo carinho e disponibilidade constante.

“Porque Dele, e por meio Dele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém.”

Romanos 11:36

RESUMO

Periodontites são doenças inflamatórias crônicas dos tecidos que suportam os dentes. Existem relatos da associação de variantes polimórficas de diferentes genes e a doença periodontal e, adicionalmente, que indivíduos portadores desta doença podem exibir uma expressão diferenciada do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). O VEGF é um indutor da angiogênese que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, além de ser um mediador pró-inflamatório. A associação entre polimorfismos do gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese já foi descrita. O objetivo do presente estudo foi avaliar se variantes polimórficas do gene VEGF estão associados à periodontite crônica e/ou agressiva. Células da mucosa oral foram coletadas de 102 indivíduos com diagnóstico de periodontite agressiva (PA), crônica (PC), e sem periodontite (SP). O DNA das mesmas foi extraído e primers específicos utilizados em PCR. Os produtos gênicos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e as bandas foram evidenciadas através de coloração com nitrato de prata. Posteriormente, os produtos foram submetidos à digestão por meio da enzima de restrição Hin1II. Os diagnósticos obtidos revelaram diferenças nos percentuais dos genótipos 936 C/C (PA - 9%; PC - 40%; SP - 33%) e C/T (PA - 91%; PC - 60%; SP - 67%) nos grupos avaliados, embora esta variação não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Teste Exato de Fisher). O resultado do presente estudo indica que o polimorfismo 936C/T do VEGF não interfere na periodontite crônica ou agressiva. Estudos adicionais envolvendo amostras maiores ou investigando outros polimorfismos deste ou de outros genes devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos nas periodontites crônica e agressiva.

Palavras-chave: Angiogênese fisiológica. Angiogênese patológica. Periodontite crônica. Periodontite agressiva. Polimorfismo genético. VEGF.

ABSTRACT

Periodontitis are chronic inflammatory diseases of the tissues that support teeth. There are reports of an association of polymorphic variants of different genes and periodontal disease, and in addition, subjects with periodontitis exhibit a differential expression of endothelial growth factor (VEGF). VEGF is a potent inducer of angiogenesis involved in various physiological and pathological processes, besides being a pro-inflammatory mediator. There are reports of an association between VEGF gene polymorphisms and the risk of developing or aggravating many diseases in which inflammatory and angiogenic mechanisms are involved in the pathogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether VEGF 936C/T polymorphic variants are associated with chronic or aggressive periodontitis. Therefore, oral mucosa cells were collected from individuals diagnosed with chronic periodontitis, aggressive periodontitis and without periodontitis. The DNA was extracted and the specific primers used in PCR. The amplified gene products were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gel (6.5%) and PCR products revealed by silver nitrate staining. Subsequently, the products were digested with the restriction enzyme Hin1II and the obtained diagnostics revealed the absence of difference in the distribution of polymorphic variants of VEGF 936 C/T between groups ($p > 0.05$; Test Fisher's exact). The result of this study indicates that VEGF 936C/T polymorphic do not interference in the pathogenesis of chronic and aggressive periodontitis. Additional studies involving larger samples or investigating other polymorphisms of this or other genes should be conducted to improve the knowledge of the role of genetic polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis.

Key-words: Aggressive periodontitis. Chronic periodontitis. Genetic polymorphism. Pathological angiogenesis. Physiological angiogenesis. VEGF.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Distribuição das variantes alélicas do VEGF 936 C/T 44

TABELA 2 Comparação da distribuição das variantes alélicas do VEGF 936 C/T ... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

DMV - Densidade microvascular
DP – Doença Periodontal
FGC – Fluido gengival crevicular
PA – Periodontite agressiva
PC – Periodontite crônica
PCR - Reação em cadeia de polimerase
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNAm – RNA mensageiro
RPM – Rotações por minuto
SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único
SP – Sem periodontite
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE ARTIGOS

Esta dissertação gerou os seguintes artigos:

1 – ARAÚJO, M.M.; SOUZA, P.E.A.; ZENÓBIO, E.G.; SOARES, R.V. Papel do VEGF nas Periodontites: Revisão de Literatura.

2 - ARAÚJO, M.M.; SILVA, K.C.; ASSIS, M.A.L.; SOUZA, P.E.A.; ZENÓBIO, E.G.; SOARES, R.V. Polimorfismo genético do VEGF na Periodontite crônica e agressiva.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
REFERÊNCIAS	15
APÊNDICE A – ARTIGO 1	19
APÊNDICE B – ARTIGO 2	37
ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO	53

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP), uma doença de caráter inflamatório dos tecidos periodontais, é caracterizada por perda progressiva dos tecidos de suporte e inserção derivada da infecção e interação de espécies bacterianas específicas com os componentes de resposta do hospedeiro em indivíduos susceptíveis (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999; FLEMMIG, 1999). Existem duas formas principais de periodontite; a crônica e a agressiva (ARMITAGE, 1999; FLEMMING, 1999).

Periodontite crônica é a forma mais prevalente de periodontite e esta geralmente exibe uma progressão variando de leve a moderada. Adicionalmente, é observada com maior frequência em adultos em resposta ao acúmulo crônico de biofilme e cálculo, e sua progressão pode tornar-se mais intensa pelo impacto de fatores locais, sistêmicos ou ambientais que influenciam a resposta do hospedeiro ao ataque bacteriano (FLEMMING, 1999).

A periodontite agressiva é caracterizada pela rápida taxa de progressão da doença, sendo mais comum em indivíduos jovens exibindo uma quantidade de biofilme e cálculo incompatível com a gravidade da destruição tecidual. A história familiar de periodontite agressiva é indicativa de um traço genético associada à etiologia da mesma (NOVAK *et al.*, 1996; TONETTI *et al.*, 1999; ARMITAGE, 1999).

Estudos distintos relatam a natureza altamente vascular da lesão periodontal ao descreverem que na região da bolsa periodontal, há uma relação entre o aumento do número de vasos sanguíneos e progressão da doença (GAVIN, 1970; BONAKDAR *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1999; CHAPPLE *et al.*, 2000; CORNELINI *et al.*, 2001; ZOELLNER *et al.*, 2002). Neste contexto a angiogênese (neovascularização), é caracterizada pela formação de novos capilares, um processo presente no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Este fenômeno ocorre em condições fisiológicas e patológicas (SHWEIKI *et al.*, 1993; NISSEN *et al.*, 1998; TAICHMAN *et al.*, 1998; MATSUSHITA *et al.*, 1999; CARLILE *et al.*, 2001) permitindo maior acesso de células inflamatórias, nutrientes e oxigênio para o tecido inflamado (JOHNSON *et al.*, 1999).

Das diversas citocinas e fatores de crescimento envolvidos na regulação da angiogênese, o mais potente agente que atua especialmente no endotélio vascular é o fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.*, 1992; DVORAK *et al.*, 1995; LANTIERI *et al.*, 1998; BECIT *et al.*, 2001; MATTIOLI *et al.*, 2001). O VEGF, uma glicoproteína secretada por células endoteliais (BERSE *et al.*, 1992; NAMIKI

et al., 1995; WILLIAMS *et al.*, 1995), atua como um fator de crescimento que potencializa o aumento da permeabilidade microvascular, induz a expressão de enzimas proteolíticas, estimula a proliferação de células endoteliais assim como a migração de monócitos e osteoclastos (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.*, 1992; DVORAK *et al.*, 1995; NAKAGAWA *et al.*, 2000; SAKUTA *et al.*, 2001). O VEGF é detectado nos tecidos periodontais dentro de células endoteliais, plasmócitos, macrófagos e no epitélio juncional, sucular e gengival (TISCHER *et al.*, 1991).

Alguns polimorfismos tem sido descritos no gene VEGF. Renner *et al.* (2000) descreveram três mutações no gene VEGF (702 C/T, 936 C/T e 1612 G/A). Neste contexto, o conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismo genético e várias doenças imunes e inflamatórias, tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das doenças (KINANE; HART, 2003). Uma série de polimorfismos genéticos foi considerado estar em associação com risco de periodontite em várias populações (SCHENKEIN, 2002). Recentes estudos sustentam a evidência de que os genes influenciam a predisposição individual para o início e a progressão da DP (KINANE; HART, 2003).

A avaliação da existência de associação entre polimorfismos do gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese, tem sido alvo de estudos (YOUNG *et al.*, 2004; CHAE *et al.*, 2008; NARS *et al.*, 2008; CHURCHILL *et al.*, 2008). O presente estudo é o primeiro a investigar a possível correlação entre o polimorfismo do gene VEGF em pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica, e sem periodontite. Sendo assim, a condução do presente estudo contribuirá para aumentar a compreensão do papel dessa molécula na etiopatogênese da DP.

2 OBJETIVOS

Realizar uma discussão, por meio da literatura, do papel e associação do VEGF nas periodontites.

Analisar se a frequência das variantes alélicas do polimorfismo do gene VEGF 936C/T é diferenciada, em indivíduos com periodontite agressiva, crônica e sem periodontite.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). International workshop for a classification of periodontal diseases a conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.7-38, 1999.
- ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-6, 1999.
- BECIT, N.; CEVIZ, M.; KOCAK, H.; et al. The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis. An experimental study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.22, p.310-316, 2001.
- BERSE, B.; BROWN, L.F.; VAN DE WATER, L.; DVORAK, H.F.; SENGHER, D.R. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. **Mol Biol Cell**, v.3, p.211-220, 1992.
- BONAKDAR, M.P.; BARDER, P.M.; NEWMAN, H.N. The vasculature in chronic adult periodontitis: A qualitative and quantitative study. **Journal of Periodontology**, v.69, p.50-58, 1997.
- CARLILE, J.; HARADA, K.; BAILLIE, R.; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissue. Possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field cancerisation. **J Oral Pathol Med**, v.30, p.449-457, 2001.
- CHAE, Y.S.; KIM, J.G.; SOHN, S.K.; CHO, Y.Y.; AHN, B.M.; MOON, J.H.; JEON, S.W.; PARK, J.Y.; LEE, I.T.; CHOI, G.S.; JUN, S.H. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. **J Korean Med Sci**, v.23, p.421-427, 2008.
- CHAPPLE, C.C.; KUMAR, R.K.; HUNTER, N. Vascular remodeling in chronic inflammatory periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v.29, p.500-506, 2000.
- CHURCHILL, A.J.; CARTER, J.G.; RAMSDEN, C.; TURNER, S.J.; YEUNG, A.; BRENCHLEY, P.E.; RAY, D.W. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.49, p.3611-3616, 2008.
- CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor. A unique regulator of blood vessel function. **J Cell Biochem**, v.47, p.219-223, 1991.

CORNELINI, R.; ARTESE, I.; RUBINI, C.; et al. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.389-393, 2001.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **Am J Pathol**, v.146, p.1029-1039, 1995.

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v.13, p.18-32, 1992.

FLEMMIG, T.F. Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.32-38, 1999.

GAVIN, J.B. Ultrastructural features of cronic marginal gingivitis. **Journal of Periodontal Research**, v.5, p.19-29, 1970.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G.; DAI, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.70, p.848-852, 1999.

KINANE, D.F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, p.430-449, 2003.

LANTIERI, L.A.; MARTIN-GARCIA, N.; WECHSLER, J.; MITROFANOFF, M.; RAULO, Y.; BARUCH, J.P. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue. A possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. **Plast Reconstr Surg**, v.101, p.392-398, 1998.

MATSUSHITA, K.; MOTANI, R.; SAUTA, T.; et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. **Infect Immun**, v.67, p.1633-1639, 1999.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; et al. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol Reprod**, v.65, p.1014-1019, 2001.

NAKAGAWA, K.; CHEN, Y.X.; ISHIBASHI, H.; et al. Angiogenesis and its regulation. Roles of vascular endothelial cell growth factor. **Semin Thromb Hemost**, v.26, p.61-66, 2000.

NAMIKI, A.; BROGI, E.; KEARNEY, M.; KIM, E.A.; WU, T.; COUFFINHAL, T.; VARTICOVSKI, L.; ISNER, J.M. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. **J Biol Chem**, v.270, p.31189-31195, 1995.

NARS, H.B.; CHAHED, K.; BOUAOUINA, N.; CHOUCANE, L. Functional vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. **Clin Chim Acta**, v.395, p.124-129, 2008.

NISSEN, N.; POLVERINI, P.J.; KOCH, A.E.; VOLIN, M.V.; GAMELLI, R.L.; diPIETRO, L.A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v.152, p.1442-1452, 1998.

NOVAK, M.J.; NOVAK, K.F. Early-onset periodontitis. **Curr Opin Periodontol**, v.3, p.45, 1996.

RENNER, W.; KOTSCHAN, S.; HOFFMAN, C.; OBERMAYER-PIETCH, B.; PILGER, E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. **J Vasc Res**, v.37, p.443-448, 2000.

SAKUTA, T.; MATSUSHITA, K.; YAMAGUCHI, N.; et al. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. **J Med Microbiol**, v.50, p.233-237, 2001.

SCHENKEIN, H.A. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? **Periodontology** 2000, v.30, p.79-90, 2002.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulation angiogenesis. **J Clin Invest**, v.1, p.2235-2243, 1993.

TAICHMAN, N.S.; CRUCHLEY, A.T. FLETCHER, L.M.; et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva. A possible role in the maintenance of mucosal hemostasis. **Lab Invest**, v.78, p.869-875, 1998.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splincing. **J Biol Chem**, v.266, p.11947-11954, 1991.

TONETTI, M.S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.39-53, 1999.

WILLIAMS, B.; BAKER, A.Q.; GALLACHER, B.; LODWICK, D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.25, p.913-917, 1995.

YOUNG, H.S.; SUMMERS, A.M.; BHUSHAN, M.; BRECHLEY, P.E.; GRIFFITHS, C.E. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. **J Invest Dermatol**, v.122, p.209-215, 2004.

ZOELLNER, H.; CHAPPLE, C.C.; HUNTER, N. Microvasculature in gingivitis and chronic periodontitis: Disruption of vascular networks with protracted inflammation. **Microsc Res Tech**, v.56, p.15-31, 2002.

APÊNDICE A – ARTIGO 1: Papel do VEGF nas Periodontites: Revisão da Literatura.

Milena Moreira de Araújo, Paulo Eduardo Alencar de Souza, Elton Gonçalves Zenóbio, Rodrigo Villamarim Soares.

RESUMO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica dos tecidos de suporte dos dentes que resulta em perda de inserção clínica e perda óssea alveolar. A vascularização periodontal é profundamente afetada durante a progressão da doença periodontal, e há evidências de que os tecidos inflamados aumentam a expressão de várias citocinas e fatores de crescimento. Estas moléculas modulam a angiogênese, um processo essencial no desenvolvimento da inflamação crônica, que é definida como a formação de novos capilares que possuem a capacidade de transportar células pró-inflamatórias para a lesão e suprir de nutrientes e oxigênio o tecido inflamado. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) atua como modulador da angiogênese, tendo em vista que promove o aumento da permeabilidade microvascular, induz a expressão de enzimas proteolíticas, estimula a proliferação de células endoteliais assim como a migração celular. O VEGF é detectado dentro de células endoteliais, plasmáticas e macrófagos, no epitélio juncional, sucular e gengival nos tecidos periodontais e no fluido gengival crevicular de pacientes com doença periodontal. O propósito deste estudo foi descrever, por meio de estudos prévios, o papel do VEGF na etiopatogênese da doença periodontal.

Palavras-chave: Angiogenese. Doença periodontal. Inflamação. VEGF.

ABSTRACT

Periodontal diseases are inflammatory conditions of the supporting tissues of the teeth that might result in loss of clinical attachment and alveolar bone levels. The periodontal vasculature is profoundly affected during the progression of periodontal disease, and there are evidences that inflamed tissues increase the expression of several cytokines and growth factors. These molecules modulate angiogenesis, an essential process in the development of chronic inflammation, which is defined as the formation of new capillaries that have the capacity to carry pro-inflammatory cells to lesion as well as to supply nutrients and oxygen to the inflamed tissues. The vascular endothelial growth factor (VEGF) acts as a modulator of angiogenesis modulating microvascular permeability, inducing the expression of proteolytic enzymes, stimulating endothelial cell proliferation and cell migration. VEGF is detected within endothelial cells, macrophages and plasma cells in the junctional and sulcular epithelium of the gingival and periodontal tissues of individuals with periodontal disease. The purpose of this study was to describe, previous studies that analyze the role of VEGF in the ethiopathogenesis of periodontal diseases.

Key-words: Angiogenesis. Periodontal disease. Inflammation. VEGF.

INTRODUÇÃO

Entre os processos inflamatórios que afetam a dentição humana, a doença periodontal (DP) é a mais frequente. A DP compreende as lesões que afetam o tecido periodontal de proteção (gengiva), e o tecido de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), sendo a segunda caracterizada, em sua fase mais avançada, pela destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsa periodontal (FLEMMIG, 1999).

Existem duas formas de periodontite: a periodontite crônica que é caracterizada pela progressão lenta da perda de inserção conjuntiva (FLEMMIG, 1999); e a periodontite agressiva que afeta adolescentes e adultos jovens, e exibe rápida perda de tecido periodontal nos indivíduos afetados (ARMITAGE, 1999; TONETTI; MOMBELLI, 1999).

A DP tem como agente etiológico primário um biofilme bacteriano específico, composto principalmente por bactérias gram-negativas anaeróbias e espiroquetas (SOCRANSKY *et al.*, 2005). A resposta inflamatória do hospedeiro à carga antigênica determina a característica destrutiva da doença, onde os produtos bacterianos interagem com o epitélio gengival para induzir a expressão e produção de mediadores químicos inflamatórios e imunológicos (PAGE, 1991; BIRKEDAL-HANSEN, 1993; VAN DYKE; SERHAN, 2003; KANTARCI; VAN DYKE, 2005; BARTOLD; NARAYANAN, 2006).

A vascularização periodontal é afetada profundamente durante a progressão da DP, e há evidências de que os tecidos inflamados aumentam a expressão de várias citocinas e fatores de crescimento que podem regular a angiogênese (FERRARA *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.* 1999; SUTHIN *et al.*, 2003). Esse processo essencial no desenvolvimento da doença inflamatória crônica é definido como a formação de novos capilares, e o mesmo ocorre sob condições fisiológicas/patológicas (SHWEIKI *et al.*, 1993; NISSEN *et al.*, 1998; TAICHMAN *et al.*, 1998; MATSUSHITA *et al.*, 1999; CARLILE *et al.*, 2001).

Das diversas citocinas e fatores de crescimento envolvidos na regulação da angiogênese, o mais potente agente que atua particularmente no endotélio vascular é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.* 1992; DVORAK *et al.* 1995; LANTIERI *et al.*, 1998; BECIT *et al.*, 2001;. MATTIOLI *et al.*, 2001). O VEGF potencializa o aumento da permeabilidade microvascular, estimula proliferação de células endoteliais e induz a expressão de enzima proteolítica e a migração de células

essenciais para angiogênese (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.* 1992; DVORAK *et al.* 1995; NAKAGAWA *et al.*, 2000; SAKUTA *et al.*, 2001).

O VEGF é detectado em plasmócitos, macrófagos, no epitélio juncional, sucular e gengival dos tecidos periodontais (TISCHER *et al.*, 1991). Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF pode ser um mediador importante na DP (JOHNSON *et al.*, 1999; SUTHIN *et al.*, 2003) e na cicatrização periodontal (CETINKAYA *et al.*, 2007; PRAPULLA *et al.*, 2007) possivelmente pela modulação da expansão vascular e progressão da inflamação. VEGF também foi detectado em amostras salivares (BOOTH *et al.*, 1998), no fluido gengival crevicular (FGC) e em tecidos periodontais doentes (GÜNERI *et al.*, 2004). Nesse contexto, o presente estudo realizou uma revisão da literatura discutindo a expressão e/ou função do VEGF na DP.

REVISÃO DE LITERATURA

O possível papel do VEGF na patogênese da DP tem sido investigado em estudos, onde o mesmo tem sido detectado clinicamente no tecido gengival e no FGC de indivíduos por meio do teste de ELISA e imunohistoquímico ou outras técnicas (BOOTH *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1999; SUTHIN *et al.*, 2003; ÜNLÜ *et al.*, 2003; GÜNERI *et al.*, 2004). No entanto, não está claro se o VEGF influencia no processo de progressão da doença ou na fase de cicatrização (CETINKAYA *et al.*, 2007).

Booth *et al.* (1998), investigaram a presença do VEGF em tecidos periodontais, no FGC e em amostras salivares de indivíduos saudáveis e com DP. Em pacientes com periodontite, o volume do FGC e a quantidade de VEGF coletados de sítios doentes foram maiores que em amostras de sítios clinicamente saudáveis. Entretanto a concentração de VEGF por unidade de volume no FGC foi maior nos sítios saudáveis. Adicionalmente, as concentrações de VEGF detectadas em sítios saudáveis de indivíduos com DP foram superiores a dos sítios de indivíduos sem doença. Eles explicaram estes achados por meio de dois possíveis mecanismos: 1) a presença de níveis subclínicos de inflamação ou cicatrização após ataque bacteriano pode interferir na expressão de VEGF; 2) angiogênese fisiológica no ambiente gengival/periodontal. O VEGF também foi detectado em concentrações significativamente maiores em todas as amostras salivares dos indivíduos com DP em relação aos controles. Os autores concluíram que o VEGF pode ser relevante no processo de

manutenção da saúde periodontal e que a condição periodontal influencia nos níveis salivares do VEGF.

A possível contribuição do VEGF para a progressão da DP foi corroborado por um estudo prévio (JOHNSON *et al.*, 1999), que avaliou as concentrações de VEGF e o número de vasos sanguíneos em biópsias de tecido gengival com e sem DP. O número de vasos sanguíneos foi menor dentro de tecidos normais e aumentou significativamente em tecidos com bolsas periodontais. O número de vasos sanguíneos foi diretamente correlacionado com a profundidade das bolsas periodontais e as concentrações de VEGF foram maiores nos tecidos inflamados. Os autores sugeriram que o VEGF poderia ser um importante fator na progressão da gengivite para a periodontite através do seu papel na promoção da expansão da rede vascular observada no processo inflamatório.

A remodelação vascular é uma característica bem conhecida da inflamação crônica, sendo assim, Chappler *et al.* (2000), avaliaram a densidade microvascular (DMV) no processo de remodelação vascular em indivíduos com DP, bem como a expressão do VEGF nesses tecidos. Biópsias de tecidos gengivais de dentes extraídos foram realizadas, em indivíduos com diagnóstico de saúde periodontal e DP crônica. Mudanças quantitativas e qualitativas na vasculatura do tecido conjuntivo periodontal foram observadas, com o aumento da DMV e o diâmetro dos vasos em indivíduos com periodontite. A regulação da atividade angiogênica foi modificada neste ambiente, manifestando-se como expressões alteradas do VEGF, caracterizadas por altos níveis de expressão em queratinócitos da mucosa bucal e reduzidos níveis no epitélio da bolsa. O estudo conclui que a DP crônica não tratada é caracterizada por profunda remodelação da vasculatura ao longo da parede da bolsa, resultando em um aumento seletivo no diâmetro dos vasos e reduzida expressão do VEGF no epitélio da bolsa.

Dentre outros biomarcadores, Lee *et al.* (2003) investigaram níveis de VEGF no FGC de indivíduos com gengivite, periodontite crônica e sem DP. Altas concentrações de VEGF foram detectadas nas amostras do FGC de pacientes com periodontite crônica. A concentração de VEGF foi significativamente maior nos sítios com gengivite quando comparados com sítios saudáveis. Como conclusão, os autores sugerem que o VEGF pode ser relevante para destruição tecidual em indivíduos com periodontite crônica.

Sakai *et al.* (2006), investigaram proteínas que pudessem ser utilizadas como marcadores específicos para a DP em amostras de FGC de sulcos gengivais saudáveis e de bolsas periodontais, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na periodontite. Níveis elevados de VEGF foram detectados no FGC de sítios doentes com diferença estatisticamente

significativa quando comparado aos sítios saudáveis. Os autores sugeriram que existe uma correlação entre a expressão do VEGF e a DP.

Sabe-se que o VEGF também é necessário para o desenvolvimento, a remodelação, reparação e regeneração de muitos tecidos, incluindo tecidos periodontais de suporte (SUTHIN *et al.*, 2003). Portanto, existe a possibilidade do VEGF também estar relacionado com a cicatrização de feridas nos tecidos periodontais. Um dos primeiros estudos a avaliar a expressão do VEGF durante a fase de destruição e estágios de cicatrização da DP foi o de Cooke *et al.* (2006). No estudo, os níveis de VEGF foram medidos no FGC após cirurgia periodontal reconstrutiva, com e sem aplicação adicional de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) local. O aumento nos níveis de VEGF foi observado em ambos os grupos cirúrgicos, sendo mais pronunciado no grupo de PDGF durante a cicatrização da ferida periodontal.

Cetinkaya *et al.* (2007), em um estudo experimental, também avaliaram a expressão do VEGF na destruição e nos estágios de cicatrização da DP e investigaram a associação entre a expressão do mesmo e a vascularização, no que diz respeito ao número e diâmetro dos vasos sanguíneos. Como resultado, formas de vasos sanguíneos com grandes dimensões foram observadas no tecido conjuntivo gengival nos ratos do grupo de destruição periodontal, enquanto no grupo de cicatrização, grandes áreas foram ocupadas por inúmeros vasos sanguíneos com dimensões menores. Por outro lado, os vasos sanguíneos no grupo controle tinham dimensões normais e formas mais regulares quando comparados com os do tecido conjuntivo dos ratos nos grupos teste. O número e o diâmetro de vasos sanguíneos foram aumentados nos grupos teste em relação ao grupo controle. Porém não houve um aumento estatisticamente significativo no número de vasos sanguíneos entre os grupos teste de cicatrização em relação ao de destruição periodontal. Concentrações de VEGF estavam significativamente maiores no grupo teste de cicatrização periodontal em relação ao de destruição e ao controle. Este resultado indicou uma possível relação entre a expressão do VEGF e vascularização, na resolução da inflamação e cicatrização espontânea dos tecidos periodontais.

Prapulla *et al.* (2007) pesquisaram os níveis de VEGF no FGC em pacientes com saúde periodontal, gengivite, periodontite crônica e pós-terapia inicial (raspagem e alisamento radicular) nos pacientes com periodontite crônica; a fim de avaliar o impacto da terapia periodontal nas concentrações de VEGF. As concentrações de VEGF no FGC eram maiores no grupo de periodontite crônica e menores no grupo com saúde periodontal. Os resultados demonstraram que os níveis VEGF no FGC aumentaram progressivamente de indivíduos

saudáveis para indivíduos com periodontite. A concentração média de VEGF no FGC no grupo de periodontite crônica decresceu após terapia periodontal inicial. O estudo sugeriu, portanto, que o tratamento destinado à DP resultou em uma redução estatisticamente significativa nos níveis de VEGF no FGC, confirmando também o papel do VEGF como um biomarcador da DP.

Lester *et al.* (2009), dentre outros biomarcadores, estudaram a contribuição do VEGF, nos estágios da inflamação gengival em tecidos doentes, em comparação a tecidos saudáveis. Um aumento progressivo nas concentrações de VEGF em amostras gengivais obtidos a partir de sítios com periodontite leve, moderada e grave em comparação a sítios sem doença foi observada. As maiores concentrações, de todos os biomarcadores, foram em tecidos gengivais obtidos de sítios com periodontite grave. Os autores concluíram que o VEGF poderia ser um fator importante na iniciação e progressão da inflamação gengival.

No estudo de Artese *et al.* (2010), foi realizada avaliação da expressão de VEGF, bem como a quantificação de vasos sangüíneos presentes nos tecidos por meio do DMV em amostras de indivíduos com periodontite agressiva generalizada, periodontite crônica e periodontalmente saudáveis. Valores muito elevados de DMV foram encontrados no epitélio oral de pacientes com periodontite agressiva generalizada e crônica, sendo que no grupo controle a vascularização no tecido conjuntivo foi considerada normal. Foi encontrada baixa expressão do VEGF em células endoteliais vasculares do grupo saudável, e esta foi aumentando progressivamente nos grupos de periodontite crônica e agressiva. Os achados sugeriram, portanto, que o VEGF é um fator importante na patogênese de ambas as formas de periodontite.

No estudo experimental de Spolidorio *et al.* (2010), foi avaliada se, a curto prazo, a indução de plaquetopenia (trombocitopenia), prejudicaria e/ou retardaria o processo de cicatrização periodontal. Foram estudados os efeitos da trombocitopenia na expressão de fatores de crescimento pró e anti-angiogênicos (VEGF e endostatina, respectivamente), a perda do osso alveolar e neovascularização em ratos com periodontite induzida. Os ratos foram distribuídos em 5 grupos de 10 animais cada (3 grupos testes e 2 grupos controles). Ligaduras de algodão foram colocadas na margem gengival do primeiro molar dos grupos testes. Ratos dos grupos controles foram submetidos a todos os procedimentos descritos, porém as ligaduras foram imediatamente removidas. Quinze dias após a colocação da ligadura, 1 grupo controle e 1 grupo teste foram sacrificados. As ligaduras dos dois grupos testes restantes foram removidas para o acompanhamento da regeneração tecidual espontânea da DP durante os 15 dias subsequentes. Um grupo foi tratado com soro normal e outro grupo

foi tratado com soro anti-plaquetário para indução de trombocitopenia. O outro grupo controle, que não recebeu ligaduras, foi tratado com soro anti-plaquetário. Após a remoção da ligadura, o grupo teste tratado com soro normal mostrou reduzida perda de osso alveolar e aumento nos números dos vasos sanguíneos. O soro anti-plaquetário causou atraso na regeneração do osso alveolar e diminuição no número de vasos. Após a remoção da ligadura, um significativo aumento na expressão do VEGF e diminuição de endostatina foram observados nos ratos tratados com soro normal. O grupo de trombocitopenia apresentou uma queda dramática em ambas concentrações de VEGF e endostatina. Como conclusão, os autores sugeriram que a trombocitopenia leva a um atraso na cicatrização periodontal em periodontite experimental, e esta pode ser mediada, em parte, por uma diminuição na concentração sérica de VEGF e endostatina.

Evidências de estudos transversais e longitudinais suportam a associação entre *diabetes mellitus* (tanto do tipo I e II) e a DP (COHEN *et al*, 1970; OLIVER; TERVONEN, 1994; GROSSI, 2001; KINANE; MARSHALL, 2001).). A DP tem sido reconhecida como uma importante complicação do *diabetes mellitus* (LOE, 1993), representando uma fonte distante de baixo grau de inflamação sistêmica. O *diabetes mellitus* pode contribuir para a periodontite por meio de alterações vasculares, disfunção de neutrófilos, síntese alterada de colágeno e predisposição genética (OLIVER; TERVONEN, 1994). Além disso, o suprimento de oxigênio, a remoção dos produtos finais do metabolismo de difusão e a migração de leucócitos estão prejudicadas em pacientes diabéticos, devido à microangiopatia gengival e o aumento da resposta angiogênica, que promove a progressão da DP (JOHNSON *et al.*, 1999) e incapacitam a reparação e a regeneração tecidual (MURRAH, 1985). Tem sido demonstrado que a gravidade da DP aumenta com a duração do diabetes, e a cronicidade da infecção periodontal pode contribuir para o agravamento do diabetes, levando a complicações mais graves (CLARK; LEE, 1995; GROSSI; GENCO, 1998). Relatórios recentes sugerem que o VEGF desempenha um papel central na mediação da microvasculopatia diabética, bem como afeta os níveis glicêmicos (AIELLO; WONG, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2009). A angiogênese é geralmente prejudicada nos pacientes diabéticos, e essa situação pode resultar em danos de cicatrização de feridas (MARTIN *et al.*, 2003; DIMARCO *et al.*, 2008).

Ünlü *et al.* (2003) avaliaram a presença do VEGF nos tecidos periodontais, por meio de exames imunohistoquímicos de amostras gengivais de sítios saudáveis e de sítios com periodontite de indivíduo com e sem diabetes tipo II. Os resultados foram comparados com indivíduos do grupo controle (sem periodontite e sem doença sistêmica). O VEGF foi detectado em ambos os tecidos gengivais doentes do grupo de diabéticos e não diabéticos e

em amostras de tecidos saudáveis de diabéticos. Pacientes diabéticos com periodontite demonstraram maior coloração para VEGF nos tecidos gengivais. O estudo concluiu que a expressão do VEGF é mais proeminente, mesmo no tecido gengival saudável dos pacientes diabéticos controlados do que nos outros grupos do estudo, indicando o possível efeito da condição sistêmica sobre o nível de VEGF.

Outro estudo (GÜNERI *et al.*, 2004) investigou os níveis de VEGF no FGC e em tecidos gengivais dos seguinte grupos: pacientes com periodontite e saúde sistêmica; pacientes com periodontite e *diabetes mellitus* (usando os sítios saudáveis dos próprios indivíduos de cada grupo como controle) e ainda um grupo controle negativo, pacientes sem doença sistêmica e periodontal. Nos tecidos de pacientes com diabetes, o VEGF foi detectado nos sítios saudáveis e doentes. O VEGF não foi observado em nenhuma das amostras de tecidos dos controles negativos (grupo 3). Nos indivíduos sistematicamente saudáveis o VEGF foi observado em apenas duas amostras de tecidos doentes e em nenhuma das amostras gengivais dos sítios saudáveis (grupo 1). No paciente diabético (grupo 2) o VEGF foi observado nas amostras de gengivas saudáveis de 4 pacientes e em 6 amostras de tecidos com DP, sendo mais proeminente que nos sítios doentes dos pacientes sistemicamente saudáveis. Os níveis de VEGF no FGC dos sítios doentes foram aumentados em comparação com os sítios saudáveis de todos os grupos. Os autores sugeriram, portanto, que o efeito do VEGF influencia tanto nos processos patológicos como nos processos de cicatrização periodontal.

Sakallıoğlu *et al.* (2007) quantificaram níveis de VEGF no tecido gengival e no FGC em indivíduos com DP e diabetes tipo II, com bom controle metabólico e compararam estes ao de indivíduos sistemicamente saudáveis com periodontite. O objetivo foi avaliar o efeito do *diabetes mellitus* nas concentrações de VEGF, e se esse fenômeno também é válido para pacientes diabéticos com bom controle metabólico e periodontite. As concentrações de VEGF nos tecidos doentes foram maiores no grupo de diabéticos que no grupo sem doença sistêmica. A diferença do nível de VEGF no FGC entre os grupos de diabéticos e saudáveis, não foi estatisticamente significativo. Os resultados sugeriram que, nos pacientes diabéticos, o aumento dos níveis de VEGF nos tecidos doentes pode acontecer mesmo sob condição de bom controle metabólico. Os autores concluíram que o *diabetes mellitus* pode ser um importante fator modificante da expressão de VEGF em tecidos com periodontite.

Aspriello *et al.* (2009) compararam a expressão do VEGF assim como a DMV em tecidos gengivais de pacientes com periodontite crônica, com e sem *diabetes mellitus*. Células VEGF-positivas foram significativamente aumentadas em epitélio de pacientes com diabetes tipo I e tipo II em comparação com indivíduos sem esta doença sistêmica. Um aumento

significativo de VEGF em células endoteliais foi observado em indivíduos com diabetes tipo I em relação aos indivíduos com diabetes tipo II. O percentual médio de DMV em indivíduos com diabetes tipo I foi estatisticamente maior em comparação aos diabéticos tipo II e aos sem esta doença. Os autores relataram que essa diferença era derivada da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, devido à resistência à insulina vascular dos diabéticos tipo II, o que pode levar à redução da expressão do VEGF em células endoteliais e da DMV em comparação com diabético tipo I. O estudo concluiu que o VEGF age como um potente agente inflamatório na periodontite, especialmente quando esta é agravada pelo diabetes.

Keles *et al.* (2010) determinaram os níveis de VEGF por meio da quantificação do RNAm nos tecidos gengivais de pacientes com gengivite e periodontite, com ou sem *diabetes mellitus* tipo II, a fim de testar a hipótese de que a expressão do VEGF, é afetada de forma diferencial nos níveis de gengivite e periodontite em pacientes com ou sem *diabetes mellitus*, em relação aos controles saudáveis. A transcrição do VEGF foi detectada em todos os grupos. Em contraste com a hipótese, não houve diferença significativa nos níveis de expressão do RNAm do VEGF entre os grupos. Estes resultados sugerem que pacientes com gengivite e periodontite associado ao *diabetes mellitus* tipo II, que entretanto possuam bom controle metabólico, parecem não ter alterações nos níveis de RNAm do VEGF nos tecidos gengivais.

DISCUSSÃO

O VEGF é uma citocina multifuncional que desempenha um papel importante na inflamação crônica mediando a angiogênese é aceito como um provável fator na manutenção da fisiologia periodontal, bem como na progressão da doença inflamatória (CORNELINI *et al.*, 2001).

Alguns estudos sugerem que o VEGF atua na patogênese da DP, com efeito sobre a regulação da mesma (BOOTH *et al.* 1998; JOHNSON *et al.*, 1999; SUTHIN *et al.*, 2003; CETINKAYA *et al.*, 2003; PRAPULLA *et al.*, 2007). No entanto, outros possuem resultados conflitantes, sugerindo que a expressão do VEGF está aumentada (BOOTH *et al.* 1998; JOHNSON *et al.*, 1999; SUTHIN *et al.*, 2003; ÜNLÜ *et al.*, 2003) ou diminuída (CHAPPLE *et al.*, 2000), em tecidos gengivais doentes e no fluido gengival crevicular.

Os achados de Artese *et al.* (2010) onde valores muito altos de DMV foram encontrados no epitélio oral de pacientes com periodontite agressiva generalizada e

periodontite crônica estão de acordo com os resultados de Chappler *et al.* (2000). Porém, Artese *et al.* (2010) observaram expressão de VEGF aumentada em tecidos doentes, ao contrário dos achados de Chappler *et al.* (2000) que observou altos níveis de expressão do VEGF em queratinócitos da mucosa bucal e baixos níveis no epitélio da bolsa.

Em Artese *et al.* (2010) foi encontrada baixa expressão do VEGF em células endoteliais vasculares em indivíduos saudáveis, e esta foi aumentando progressivamente nos grupos de periodontite crônica e agressiva, resultados similares aos reportados por Lester *et al.* (2009) onde houve um aumento progressivo nas concentrações de VEGF em amostras gengivais obtidos a partir de sítios com periodontite leve, moderada e grave foi encontrado.

Spolidorio *et al.* (2010) relataram elevados níveis séricos de VEGF durante a fase de reparo periodontal. Estes resultados são compatíveis com os relatos de Cook *et al.* (2006) que mostraram aumento dos níveis de VEGF durante a regeneração do tecido periodontal. Neste contexto, o estudo experimental de Cetinkaya *et al.* (2007) relatou que a expressão do VEGF foi mais relacionada com o estágio de cura da DP do que com a fase de destruição. Adicionalmente, que o aumento do VEGF no grupo com periodontite não foi significativamente diferente dos sítios saudáveis, concordando com os resultados do estudo de Keles *et al.* (2010).

Os achados de Prapulla *et al.* (2007) estão de acordo com os de Guneri *et al.* (2004) que também reportaram aumento de níveis de VEGF em FGC em sítios doentes comparados com sítios saudáveis, e contrários aos achados de Booth *et al.* (1998) onde houve um aumento na concentração de VEGF no FGC de amostras saudáveis em comparação aos sítios doentes. No estudo de Sakai *et al.* (2006) e de Lee *et al.*, (2003), níveis mais elevados de VEGF também foram detectados no FGC em sítios doentes quando comparado aos sítios saudáveis.

Vários estudos suportam que a associação entre *diabetes mellitus* e a DP pode afetar os níveis glicêmicos, assim como que o VEGF desempenha um papel central na mediação da microvasculopatia diabética. No entanto, um estudo conduzido em indivíduos com e sem *diabetes mellitus* (KELES *et al.*, 2010) não encontrou diferença significativa nos níveis de expressão do VEGF entre os grupos com gengivite e periodontite.

O estudo de Sakallioğlu *et al.* (2007) apresentou resultados em partes similares aos de Ünlü *et al.* (2003) e Güneri *et al.* (2004). Nestes, a presença de VEGF em amostras de tecido gengival coletadas de sítios periodontais e sítios saudáveis, em indivíduos sem doença sistêmica e em indivíduos diabéticos tipo II foi avaliada. Os resultados demonstraram que pacientes diabéticos com periodontite apresentaram maior coloração para VEGF. Porém, deve

ser ressaltado que os participantes dos estudos de Ünlü *et al.* (2003) e Güneri *et al.* (2004) eram diabéticos metabolicamente mal controlados, e no estudo de Sakallıoğlu *et al.* (2007) os indivíduos com diabetes tipo II, tinham um bom controle metabólico. Em Sakallıoğlu *et al.* (2007) a concentração de VEGF no FGC no grupo com periodontite e diabetes em comparação com o grupo com periodontite sem doença sistêmica não foi estatisticamente significativa, discordando portanto, com o estudo de Güneri *et al.* (2004), no qual o nível médio do VEGF no FGC foi maior no grupo com periodontite do que no grupo com periodontite e diabetes.

No estudo de Güneri *et al.* (2004) não houve diferenças significativas nos valores de VEGF nos tecidos gengivais de sítios saudáveis e doentes de pacientes com periodontite, sem *diabetes mellitus*, o que confirma as conclusões do estudo de Keles *et al.* (2010). Comparando os resultados de Güneri *et al.* (2004) com os de Booth *et al.* (1998), observa-se que no grupo de indivíduos sistemicamente saudáveis, foram observados achados similares quanto ao aumento do grau de coloração do VEGF nos sítios doentes. Porém Booth *et al.* (1998) relataram uma alta concentração de VEGF em FGC de amostras saudáveis comparados aos sítios doentes, contrariando os achados de Güneri *et al.* (2004). O estudo de Güneri *et al.* (2004) também concorda com os achados de Johnson *et al.* (1999), que relata um aumento nos níveis de VEGF em sítios periodontais de pacientes sistemicamente saudáveis.

O único estudo onde foram incluídos pacientes com *diabetes mellitus* tipo I e II foi o de Aspriello *et al.* (2009). Os resultados relataram células VEGF-positivas significativamente aumentadas em epitélio de pacientes com diabetes tipo I e II em comparação com indivíduos sem esta doença sistêmica. Um aumento significativo de VEGF em células endoteliais foi observado em indivíduos com diabetes tipo I em relação aos indivíduos com diabetes tipo II. O percentual médio de DMV em indivíduos com diabetes tipo I foi estatisticamente maior em comparação aos diabéticos tipo II e aos sem esta doença. O estudo concluiu que o VEGF age como um potente agente inflamatório na periodontite, especialmente quando esta é agravada pelo diabetes.

CONCLUSÃO

A avaliação da associação da expressão e/ou ação do VEGF na patogênese da DP foi conduzida em diversos estudos. Embora alguns resultados controversos sejam observados, a maioria dos estudos encontrou uma relação direta entre esta importante molécula com a extensão e gravidade da DP. A associação da mesma com a DP e o *diabetes mellitus* também foi um achado frequente. Portanto, tendo em vista que a DP é uma doença de etiologia complexa, a condução de estudos adicionais analisando o papel do VEGF na DP pode contribuir para aumentar a compreensão da etiopatogênese da doença.

REFERÊNCIAS

AIELLO, L.P.; WONG, J.S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. **Kidney Int**, v.77, p.113–19, 2000.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-6, 1999.

ARTESE, L.; PIATTELLI, A.; DE GOUVEIA CARDOSO, L.A.; FERRARI, D.S.; ONUMA, T.; PICCIRILLI, M.; FAVERI, M.; PERROTTI, V.; SIMION, M.; SHIBLI, J.A. Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.81, n.5, p.718-726, 2010.

ASPRIELLO, S.D.; ZIZZI, A.; LUCARINI, G.; RUBINI, C.; FALOIA, E.; BOSCARO, M.; TIRABASSI, G.; PIEMONTESE, M. Vascular endothelial growth factor and microvessel density in periodontitis patients with and without diabetes. **Journal of Periodontology**, v.80, n.11, p.1783-1789, 2009.

BARTOLD, P.M.; NARAYANAN, A.C. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v.40, p.29-49, 2006.

BECIT, N.; CEVIZ, M.; KOCAK, H.; et al. The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis. An experimental study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.22, p.310-316, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **Journal of Periodontal Research**, v.28, p.500-510, 1993.

BOOTH, V.; YOUNG, S.; CRUCHLEY, A.; TAICHMAN, N.S.; PALEOLOG, E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.33, p.491-499, 1998.

CARLILE, J.; HARADA, K.; BAILLIE, R.; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissue. Possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **J Oral Pathol Med**, v.30, p.449-457, 2001.

CETINKAYA, B.O.; KELES, G.C.; AYAS, B.; SAKALLIOGLU, E.E.; ACIKGOZ, G. The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.78, n.6, p.1129-1135, 2007.

CHAPPLE, C.C.; KUMAR, R.K.; HUNTER, N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v.29, n.10, p.500-506, 2000.

CLARK, C.M. JR; LEE, D.A. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v.332, p.1210–1217, 1995.

COHEN, D.W.; FRIEDMAN, L.A.; SHAPIRO, J.; KYLE, G.C.; FRANKLIN, S. Diabetes mellitus and periodontal disease: two-year longitudinal observations, I. **Journal of Periodontology**, v.41, p.709-712, 1970.

CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor. A unique regulator of blood vessel function. **J Cell Biochem**, v.47, p.219-223, 1991.

COOKE, J.W.; SARMENT, D.P.; WHITESMAN, L.A.; et al. Effect of rhPDGF-BB delivery on mediators of periodontal wound repair. **Tissue Eng**, v.12, p.1441-1450, 2006.

CORNELINI, R.; ARTESE, I.; RUBINI, C.; *et al.* Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.389-393, 2001.

DI MARCO, G.S.; ALAM, A.; DOL, F.; CORVOL, P.; GASC, J.M.; LARGER, E. Angiogenesis and diabetes: different responses to pro-angiogenic factors in the chorioallantoic membrane assay. **Mol Med**, v.14, p.705–14, 2008.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **Am J Pathol**, v.146, p.1029-1039, 1995.

FERRARA, N.; HOUCK, K. JAKEMAN, L.; LEUNG, D. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v.13, p.18-32, 1992.

FLEMMIG, T.F. Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.32-38, 1999.

GROSSI, S.G. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. **Annals Periodontology**, v.6, p.138–145, 2001.

GROSSI, S.G.; GENCO, R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Annals Periodontology**, v.3, p.51–61, 1998.

GÜNERİ, P.; ÜNLÜ, F.; YESILBEK, B.; BAYRAKTAR, F.; KOKULUDAG, A.; HEKIMGİL, M. Vascular Endothelial Growth Factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. **Journal of Periodontology**, v.75, p.91-97, 2004.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G.; DAI, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.70, p.848-852, 1999.

KARTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Resolution of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.76, p.2168-2174, 2005.

KELES, G.C.; CETINKAYA, B.O.; EROGLU, C.; SIMSEK, S.B.; KAHRAMAN, H. Vascular endothelial growth factor expression levels of gingiva in gingivitis and periodontitis patients with/without diabetes mellitus. **Inflamm Res**, v.59, n.7, p.543-549, 2010.

KINANE, D.F.; MARSHALL, G.J. Periodontal manifestations of systemic disease. **Aust Dent J**, v.46, p.2-12, 2001.

LANTIERI, L.A.; MARTIN-GARCIA, N.; WECHSLER, J. MITROFANOFF, M.; RAULO, Y.; BARUCH, J.P. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue. A possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. **Plast Reconstr Surg**, v.101, p.392-398, 1998.

LEE, E.; YANG, Y.; HO, Y.; HO, K.; TSAI, C. Potential role of vascular endothelial growth factor, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in Periodontal Disease. **Kaohsiung J Med Sci**, v.19, n.8, p.406-415, 2003.

LESTER, S.R.; BAIN, J.L.; SERIO, F.G.; HARRELSON, B.D.; JOHNSON, R.B. Relationship between gingival angiopoietin-1 concentrations and depth of the adjacent gingival sulcus. **Journal of Periodontology**, v.80, n.9, p.1447-1453, 2009.

LOE, H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.16, p. 329–334, 1993.

MARTIN, A.; KOMADA, M.R.; SANE, D.C. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. **Med Res Rev**, v.23, p.117–145, 2003.

MATSUSHITA, K.; MOTANI, R.; SAUTA, T.; et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. **Infect Immun**, v.67, p.1633-1639, 1999.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; et al. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol Reprod**, v.65, p.1014-1019, 2001.

MURRAH, V.A. Diabetes mellitus and oral manifestations. **J Oral Pathol**, v.14, p.271-281, 1985.

NAKAGAWA, K.; CHEN, Y.X.; ISHIBASHI, H.; et al. Angiogenesis and its regulation. Roles of vascular endothelial cell growth factor. **Semin Thromb Hemost**, v.26, p.61-66, 2000.

NAKAMURA S, IWASAKI N, FUNATSUH, KITANO S, IWAMOTO Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v.247, p.21–26, 2009.

NISSEN, N.; POLVERINI, P.J.; KOCH, A.E.; VOLIN, M.V.; GAMELLI, R.L.; diPIETRO, L.A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v.152, p.1442-1452, 1998.

OLIVER, R.C.; TERVONEN, T. Diabetes – a risk factor for periodontitis in adults. **Journal of Periodontology**, v.65, p.530-538, 1994.

PAGE, R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.26, p.230-242, 1991.

PRAPULLA, D. V.; SUJATHA, P. B.; PRADEEP, A. R. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. **Journal of Periodontology**, v.78, n.9, 2007.

SAKAI, A.; OHSHIMA, M.; SUGANO, N.; OTSUKA, K.; ITO, K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. **Journal of Periodontology**, v.77, p.856-864, 2006.

SAKALLIOĞLU, E.E.; ALIYEV, E.; LÜTFİOĞLU, M.; YAVUZ,Ü.; AÇIKGÖZ; G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of gingival and gingival crevicular fluid in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. **Clin Oral Invest**, v.11, p.115-120, 2007.

SAKUTA, T.; MATSUSHITA, K.; YAMAGUCHI, N.; et al. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. **J Med Microbiol**, v.50, p.233-237, 2001.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. **J Clin Invest**, v.1, p.2235-2243, 1993.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** **2000**; v.38, p.135-187, 2005.

SPOLIDORIO, L.C.; HERRERA, B.S.; COIMBRA, L.S.; FIGUEIREDO, M.N.; SPOLIDORIO, D.M.; MUSCARÁ, M.N. Short-term induction of thrombocytopenia delays periodontal healing in rats with periodontal disease: participation of endostatin and vascular endothelial growth factor. **Journal of Periodontal Research**, v.45, n.2, p.184-192, 2010.

SUTHIN K, MATSUSHITA K, MACHIGASHIRA M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v.38, n.1, p.90-96, 2003.

TAICHMAN, N.S.; CRUCHLEY, A.T. FLETCHER, L.M.; et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva. A possible role in the maintenance of mucosal hemostasis. **Lab Invest**, v.78, p.869-875, 1998.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **J Biol Chem**, v.266, p.11947-11954, 1991.

TONETTI, M.S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.39-53, 1999.

ÜNLÜ, F.; GÜNER, I.P.G.; HEKIMGİL, M.; YESILBEK, B.; BOYACIOĞLU, H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. **Journal of Periodontology**, v.74, p.181-187, 2003.

VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J Dent Res**, v.82, n.2, p.82-90, 2003.

APÊNDICE B - ARTIGO 2: Polimorfismo genético do VEGF na Periodontite crônica e agressiva.

Milena Moreira de Araújo, Karine Câmara Silva, Marina Araújo Leite Assis, Paulo Eduardo Alencar de Souza, Elton Gonçalves Zenóbio, Rodrigo Villamarim Soares.

RESUMO

Periodontites são doenças inflamatórias crônicas dos tecidos que suportam os dentes. Existem relatos da associação de variantes polimórficas de diferentes genes e a doença periodontal e, adicionalmente, indivíduos portadores desta doença podem exibir uma expressão diferenciada do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). O VEGF é um indutor da angiogênese que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, além de ser um mediador pró-inflamatório. A associação entre polimorfismos do gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese já foi descrita. O objetivo do presente estudo foi avaliar se variantes polimórficas do gene VEGF estão associados à periodontite crônica e/ou agressiva. Células da mucosa oral foram coletadas de 102 indivíduos com diagnóstico de periodontite agressiva (PA), crônica (PC), e sem periodontite (SP). O DNA das mesmas foi extraído e primers específicos utilizados em PCR. Os produtos gênicos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e as bandas foram evidenciadas através de coloração com nitrato de prata. Posteriormente, os produtos foram submetidos à digestão por meio da enzima de restrição Hin1II. Os diagnósticos obtidos revelaram diferenças nos percentuais dos genótipos 936 C/C (PA - 9%; PC - 40%; SP - 33%) e C/T (PA - 91%; PC - 60%; SP - 67%) nos grupos avaliados, embora esta variação não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Teste Exato de Fisher). O resultado do presente estudo indica que o polimorfismo 936C/T do VEGF não interfere na periodontite crônica ou agressiva. Estudos adicionais envolvendo amostras maiores ou investigando outros polimorfismos deste ou de outros genes devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos nas periodontites crônica e agressiva.

Palavras-chave: Angiogênese fisiológica, Angiogênese patológica. Periodontite agressiva. Periodontite crônica. Polimorfismo genético, VEGF,

ABSTRACT

Periodontitis are chronic inflammatory diseases of the tissues that support teeth. There are reports of an association of polymorphic variants of different genes and periodontal disease, and in addition, subjects with periodontitis exhibit a differential expression of endothelial growth factor (VEGF). VEGF is a potent inducer of angiogenesis involved in various physiological and pathological processes, besides being a pro-inflammatory mediator. There are reports of an association between VEGF gene polymorphisms and the risk of developing or aggravating many diseases in which inflammatory and angiogenic mechanisms are involved in the pathogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether VEGF 936C/T polymorphic variants are associated with chronic or aggressive periodontitis. Therefore, oral mucosa cells were collected from individuals diagnosed with chronic periodontitis, aggressive periodontitis and without periodontitis. The DNA was extracted and the specific primers used in PCR. The amplified gene products were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gel (6.5%) and PCR products revealed by silver nitrate staining. Subsequently, the products were digested with the restriction enzyme Hin1II and the obtained diagnostics revealed the absence of difference in the distribution of polymorphic variants of VEGF 936 C/T between groups ($p > 0.05$; Test Fisher's exact). The result of this study indicates that VEGF 936C/T polymorphic do not interference in the pathogenesis of chronic and aggressive periodontitis. Additional studies involving larger samples or investigating other polymorphisms of this or other genes should be conducted to improve the knowledge of the role of genetic polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis.

Key-words: Aggressive periodontitis. Chronic periodontitis. Genetic polymorphism. Pathological angiogenesis. Physiological angiogenesis. VEGF.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP), é um processo inflamatório crônico dos tecidos de suporte dos dentes, resultante da infecção de espécies bacterianas específicas. A DP está associada com a perda da integridade da inserção epitelial junto ao dente e com formação de bolsa oriunda da proliferação de células epiteliais. O aprofundamento contínuo da bolsa, em conjunto com a destruição da matriz do tecido conjuntivo é acompanhado por reabsorção óssea, resultando em eventual perda do dente (GOODSON *et al.*, 1982; BOOTH *et al.*, 1998; CHAPPLE *et al.*, 2000).

Angiogênese (neovascularização) é definida como a formação de novos capilares, um processo essencial no desenvolvimento da doença inflamatória crônica. A angiogênese ocorre em processos fisiológicos/patológicos (SHWEIKI *et al.*, 1993; NISSEN *et al.*, 1998; TAICHMAN *et al.*, 1998; MATSUSHITA *et al.*, 1999; CARLILE *et al.*, 2001) nos quais vasos neoformados realizam o transporte de células pró-inflamatórias para a lesão, bem como nutrientes e oxigênio para o tecido inflamado (JOHNSON *et al.*, 1999).

Existem relatos de que a vascularização periodontal é afetada profundamente durante a progressão da DP, e que a expressão de várias citocinas e fatores de crescimento que podem regular a angiogênese nos tecidos inflamados é elevada (FERRARA *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.*, 1999; SUTHIN *et al.*, 2003). Neste contexto, uma relação entre um aumento do número de vasos sanguíneos e progressão da doença, afetando especialmente capilares e vênulas na região da bolsa periodontal já foi descrita (BONAKDAR *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1999; CHAPPLE *et al.*, 2000).

Das diversas citocinas e fatores de crescimento envolvidos na regulação da angiogênese, o mais potente agente que atua especialmente no endotélio vascular é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.*, 1992; DVORAK *et al.*, 1995; LANTIERI *et al.*, 1998; BECIT *et al.*, 2001; MATTIOLI *et al.*, 2001). O VEGF potencializa o aumento da permeabilidade microvascular, estimula proliferação de células endoteliais e induz a expressão de enzima proteolítica e a migração de células endoteliais, monócitos e osteoblastos essenciais para angiogênese (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.*, 1992; DVORAK *et al.*, 1995; NAKAGAWA *et al.*, 2000; SAKUTA *et al.*, 2001).

O gene VEGF produz diferentes isoformas protéicas com subunidades polipeptídicas possuindo diferente número de aminoácidos. O gene VEGF está localizado no cromossoma 6p21.3 e diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados a este gene foram descritos (JAIN *et al.*, 2009). Particularmente no estudo de Renner *et al.* (2000) foram descritas três mutações no gene VEGF (702 C/T, 936 C/T e 1612 G/A).

Uma série de polimorfismos genéticos estão associados com risco de periodontite em várias populações (SCHENKEIN, 2002). Recentes estudos sustentam a evidência de que os genes influenciam a predisposição individual para o início e a progressão da DP (KINANE; HART, 2003). Neste contexto, o conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismo genético e várias doenças imunes e inflamatórias, tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das doenças (KINANE; HART, 2003). Diversos estudos têm avaliado a existência de associação entre polimorfismos no gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese (YOUNG *et al.*, 2004; CHAE *et al.*, 2008; NARS *et al.*, 2008; CHURCHILL *et al.*, 2008).

A correlação entre o polimorfismo do gene VEGF e as periodontites, pode contribuir para aumentar compreensão do papel desta molécula na etiopatogênese da DP. Sendo assim, este estudo é o primeiro a investigar a possível correlação entre o polimorfismo do gene VEGF e a DP e teve como objetivo analisar se a frequência das variantes alélicas do polimorfismo do gene VEGF 936C/T é diferenciada, em indivíduos com periodontite agressiva, crônica e sem periodontite.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

Este estudo caracterizou-se por ser observacional transversal, com seleção de indivíduos com periodontite crônica, agressiva e sem periodontite, no período entre Janeiro a Setembro de 2010. Os participantes eram pacientes do Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Brasil.

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas (CAE 0168.0.213.000-09). Baseado no estudo de Renner *et al.* (2000), tabagistas, diabéticos, indivíduos imunodeprimidos, com diagnóstico de osteoporose, mulheres grávidas, HIV positivo ou submetidos à quimioterapia foram excluídos do estudo. Os critérios de inclusão foram baseados em estudos prévios (ARMITAGE, 1999; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 2000a, b, c). Os critérios específicos para seleção e agrupamento foram baseados em Flemmig, 1999. O grupo com diagnóstico de periodontite crônica consistiu de indivíduos com profundidade de sondagem $> 4\text{ mm}$ e $< 6\text{ mm}$; perda de inserção $> 3\text{ mm}$ e $\leq 4\text{ mm}$ (periodontite crônica moderada) e/ou profundidade de sondagem $\geq 6\text{ mm}$; perda de inserção $\geq 5\text{ mm}$ (periodontite crônica grave) e/ou mais de 30% dos sítios presentes afetados (periodontite crônica generalizada). O grupo com periodontite agressiva apresentava destruição periodontal restrita aos sítios interproximais dos primeiros molares e incisivos (periodontite agressiva localizada) e/ou destruição periodontal em pelo menos 3 sítios interproximais de dentes permanentes além dos primeiros molares e incisivos (periodontite agressiva generalizada). O grupo controle consistiu de indivíduos com ausência de periodontite (profundidade de sondagem $< 4\text{ mm}$). Participaram do estudo 102 indivíduos, sendo 57 tinham periodontite crônica (35 mulheres e 22 homens, idade entre 29 a 79 anos), 19 tinham periodontite agressiva (15 mulheres e 4 homens, com idade entre 16 a 42 anos) e 26 tinham ausência de periodontite (19 mulheres e 7 homens, idade entre 20 a 49).

Coleta de Células da Mucosa Oral e Obtenção das Amostras de DNA

O procedimento de coleta e processamento das amostras foram semelhante ao descrito por Boom *et al.* (1990). Foram realizadas coletas de células epiteliais da mucosa jugal bilateralmente, por meio de raspagem com escova cervical estéril descartável. As cerdas das escovas foram lavadas imediatamente em microtubos contendo 1 ml de tampão de Krebbs (0,724% NaCl; 0,03% KCl ; 0,028% MgSO₄; 0,594% Hepes; 0,18% C₆H₁₂O₆ em água deionizada). Após centrifugação das células descamadas à 10.000 rotações por minuto (rpm), por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e 20 μl de sílica (SiO₂, Sigma, St Louis, MO, USA) e 450 μl de tampão de lise (6 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6,4, 25 mM EDTA e 1,5% Triton X-100) foram adicionados aos pellets obtidos. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, incubadas a 56°C em banho seco por 30 minutos, homogeneizadas, centrifugadas novamente e o sobrenadante, descartado. Os pellets obtidos

(DNA ligado à sílica) foram lavados duas vezes com 450 µl de tampão de lavagem (6 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6,4), duas vezes com 450 µl de etanol 70% e uma vez com 450 µl de acetona. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados novamente, os sobrenadantes descartados e os pellets mantidos em banho seco a 56°C por 30 minutos. Na etapa final, 100 µl de tampão Tris-EDTA foram adicionados e os tubos incubados em banho seco a 56°C, durante 12 horas. Após centrifugação, os sobrenadantes contendo o DNA foram armazenados para utilização nas reações de amplificação gênica.

Reação em Cadeia da Polimerase - Digestão dos produtos e diagnóstico molecular

O DNA obtido, pela extração, foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR). As seqüências dos primers usados foram 5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' (senso) e 5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTACAG -3' (anti-senso). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 8µl de DNA; 12 µl de tampão Pré-mix (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), que contém íons, desoxinucleotídeos e enzima Taq DNA polimerase; 0,5 µl de cada primer e 4µl de H₂O. Foi utilizado termociclador (Eppendorf® Mastercycler personal, Hamburg, Alemanha) com o seguinte programa de PCR para a amplificação gênica: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, mais 1 minuto a 64°C, mais 40 segundos a 72°C e um último ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos gênicos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e as bandas foram evidenciadas através de coloração com nitrato de prata. Os produtos da PCR foram digeridos pela enzima de restrição Hin1II (Sinapse, São Paulo, SP, Brasil). De acordo com o genótipo do indivíduo, fragmentos de digestão de diferentes tamanhos (208pb; 122 pb e 86 pb) foram obtidos. Após a eletroforese, as bandas do gel foram digitalizadas para armazenamento dos dados em computador.

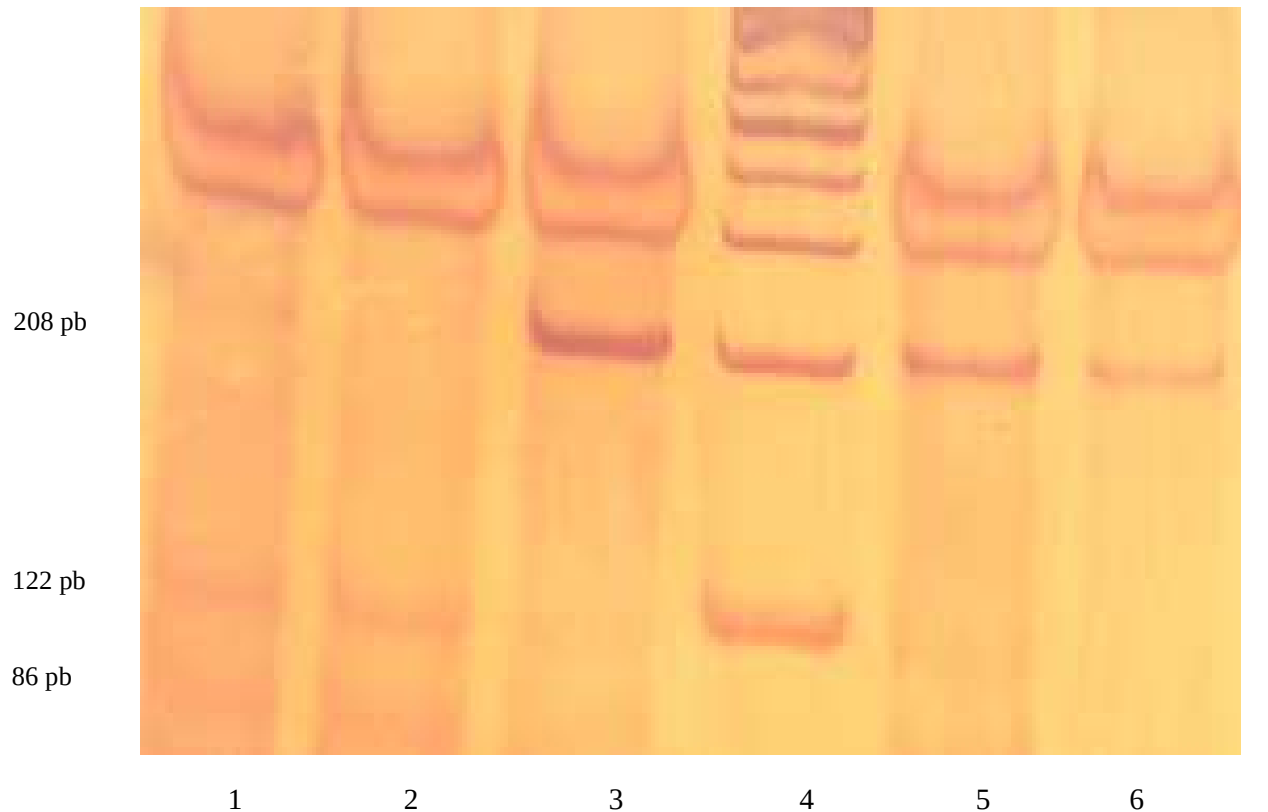
Análise Estatística

A análise utilizando o Teste Exato de Fisher para comparar as distribuições dos genótipos entre os grupos avaliados foi realizada. Um nível de significância $\alpha = 0,05$ foi utilizado. A análise foi realizada utilizando-se o programa estatístico StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, Califórnia, USA).

RESULTADOS

Amostras de DNA foram coletadas de todos os participantes e estas, usadas em reações de PCR. A digestão dos produtos do PCR com a enzima de restrição Hin1II permite a diferenciação de homozigotos 936 C/C, heterozigotos 936 C/T e homozigotos 936T/T, tendo em vista que os produtos de homozigotos 936 C/C não são clivados gerando uma banda com 208 pares de base, os de heterozigotos são clivados gerando uma banda com 208 pares de base, uma com 122 e outra com 86 pares de base e, finalmente, os de homozigotos 936T/T geram uma com 122 e outra com 86 pares de base. A análise dos produtos amplificados e digeridos da região do gene VEGF, onde se encontra o 936 C/T, foi feita em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata e um gel representativo pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Produtos da digestão do 936 C/T.



pb – pares de base; Faixas 1 e 2 - 936 C/T; Faixas 3, 5 e 6 – 936 C/C; Faixa 4 – padrão de DNA 1 kb.

O diagnóstico do polimorfismo do gene VEGF (936C/T) foi obtido de 43 participantes, sendo 11 com periodontite agressiva (9 mulheres e 2 homens, com idade entre 16 a 42 anos), 20 com periodontite crônica (16 mulheres e 4 homens, com idade entre 28 a 79 anos) e 12 sem periodontite (9 mulheres e 3 homens, idade entre 20 a 49 anos). A distribuição dos alelos nestes indivíduos pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das variantes alélicas do VEGF 936 C/T

Genótipo	Periodontite Agressiva	Periodontite Crônica	SP
	n = 11	n = 20	n = 12
C/C	1	8	4
C/T	10	12	8

PA – Periodontite Agressiva; PC – Periodontite Crônica; SP - indivíduos sem periodontite

O percentual de homozigotos (936C/C) e heterozigotos (936C/T) variou nos grupos avaliados. As proporções de homozigotos foram: 9% no grupo com periodontite agressiva, 40% no grupo com periodontite crônica e 33% no grupo sem periodontite. Consequentemente as proporções de heterozigotos foram: 91%, 60% e 67% para os mesmos grupos. Entretanto, a análise estatística por meio do Teste Exato de Fisher não revelou diferença na distribuição de homozigotos e heterozigotos nos grupos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação da distribuição das variantes alélicas do VEGF 936 C/T

Comparação	p
PA x PC	0,11
PA x SP	0,32
PC x SP	0,99

PA – Periodontite Agressiva; PC – Periodontite Crônica; SP - indivíduos sem periodontite; valor de p – Teste Exato de Fisher

DISCUSSÃO

O VEGF é uma citocina multifuncional que desempenha um papel importante na inflamação crônica, mediando a angiogênese, e é aceito como um provável fator na manutenção da fisiologia periodontal, bem como na progressão da doença inflamatória (CORNELINI *et al.*, 2001).

Sabe-se que nos tecidos inflamados ocorre um aumento da expressão de mediadores inflamatórios e do número de vasos sanguíneos, processos que contribuem para progressão da DP (CHAPPLE *et al.*, 2000). Particularmente, o VEGF atua como um potente fator indutor da angiogênese por regular a permeabilidade microvascular, estimular a proliferação de células endoteliais, induzir a expressão de enzimas proteolíticas e migração de células endoteliais, monócitos e osteoblastos, essenciais para a angiogênese (CONNOLLY, 1991; FERRARA *et al.* 1992; DVORAK *et al.* 1995; NAKAGAWA *et al.*, 2000; SAKUTA *et al.*, 2001).

O VEGF foi detectado nos tecidos periodontais dentro de células endoteliais vasculares, células plasmáticas, macrófagos e epitélio sulcular, juncional e gengival (TISCHER *et al.*, 1991). Estudos prévios relataram concentrações elevadas de VEGF em tecidos e no FGC de sítios com DP (BOOTH *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1999; CHAPPLE *et al.*, 2000, SAKAI *et al.*, 2006; PRAPULLA *et al.*, 2007; LESTER *et al.*, 2009; ARTESE *et al.*, 2010). Johnson *et al.* (1999) afirmaram que o VEGF pode ser um fator importante na progressão da gengivite para a periodontite, através do seu papel na promoção da expansão da rede vascular observada no processo inflamatório. Esta extensiva distribuição celular associada com níveis detectáveis de VEGF no FGC de sítios saudáveis e doentes sugere que o VEGF exerce seu papel na manutenção da saúde periodontal e também na doença periodontal inflamatória crônica (BOOTH *et al.*, 1998).

Uma série de polimorfismos genéticos está associado com risco de desenvolvimento de periodontites em várias populações (SCHENKEIN, 2002). Existem evidências de que os genes influenciam a predisposição individual para o início e a progressão da DP (KINANE; HART, 2003). Adicionalmente, diversos estudos têm avaliado e encontrado associações entre polimorfismos do gene VEGF e doenças nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese (YOUNG *et al.*, 2004; CHAE *et al.*, 2008; NARS *et al.*, 2008; CHURCHILL *et al.*, 2008).

É importante perceber que os mecanismos etiopatogênicos das doenças são complexos, associados com variações de múltiplos genes, cada um com o risco de uma pequena contribuição relativa para o processo global da doença. O número e o tipo de genes modificadores para a mesma condição pode não ser igual para diferentes populações e/ou grupos étnicos. Além disso, eles também podem ser influenciados por fatores ambientais, genéticos (KINANE, HART, 2003; LOOS *et al.*, 2005).

No presente estudo, a análise da distribuição do VEGF alelo 936 C/T em pacientes com periodontite crônica, agressiva e sem periodontite foi conduzida. Foram observadas diferenças nos percentuais na distribuição dos genótipos entre os grupos avaliados (936 C/C: PA - 9%, PC - 40% e SP - 33%; 936 C/T: PA - 91%, PC- 60% e SP -67%) embora esta variação não tenha sido estatisticamente significativa. Esta ausência de associação sugere que a expressão das diferentes variantes alélicas 936 C/T do gene VEGF não interfere na patogênese das periodontites. Entretanto, tendo em vista que diferenças percentuais pronunciadas foram observadas, a investigação de outras populações ou grupos étnicos, e /ou de um número maior de indivíduos/amostras poderá confirmar com maior precisão se estas

variantes polimórficas de fato não participam da modulação destas importantes doenças periodontais. Adicionalmente, é importante ressaltar que este estudo foi o primeiro a investigar a possível correlação entre o polimorfismo genético do gene VEGF em pacientes com periodontite crônica, agressiva e sem periodontite.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de diferentes variantes polimórficas do gene VEGF 936 C/T não interfere na etiopatogênese das periodontites crônica e agressiva. Estudos adicionais devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos nestas doenças.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. **Journal of Periodontology**, v.71, p.853-855, 2000(a).

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. **Journal of Periodontology**, v.71, p.856-858, 2000(b).

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). Parameter on aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.71, p.867-869, 2000(c).

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. **Annals of Periodontology**, v.4, n.1, p.1-6, 1999.

ARTESE, L.; PIATTELLI, A.; DE GOUVEIA CARDOSO, L.A.; FERRARI, D.S.; ONUMA, T.; PICCIRILLI, M.; FAVERI, M.; PERROTTI, V.; SIMION, M.; SHIBLI, J.A. Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.81, n.5, p.718-726, 2010.

BECIT, N.; CEVIZ, M.; KOCAK, H.; et al. The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis. An experimental study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.21, p.310-316, 2001.

BECK, J.D.; OFFENBACHER, S. Oral health and systemic disease: periodontitis and cardiovascular disease. **Journal of Dental Education**, v.62, p.859-870, 1998.

BONAKDAR, M.P.; BARDER, P.M.; NEWMAN, H.N. The vasculature in chronic adult periodontitis: A qualitative and quantitative study. **Journal of Periodontology**, v.69, p.50-58, 1997.

BOOM, R.; SOL., C.J.; SALIMANS, M.N.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v.28, p.495-503, 1990.

BOOTH V, YOUNG S, CRUCHLEY A, TAICHMAN NS, PALEOLOG E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v.33, p.491-499, 1998.

BYRNE, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med**, v.9, n.4, p.777-795, 2005.

CARLILE, J.; HARADA, K.; BAILLIE, R.; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissue. Possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **J Oral Pathol Med**, v.30, p.449-457, 2001.

CHAE, Y.S.; KIM, J.G.; SOHN, S.K.; CHO, Y.Y.; AHN, B.M.; MOON, J.H.; JEON, S.W.; PARK, J.Y.; LEE, I.T.; CHOI, G.S.; JUN, S.H. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. **J Korean Med Sci**, v.23, p.421-427, 2008.

CHAPPLE, C.C.; KUMAR, R.K.; HUNTER, N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. **J Oral Pathol Med**, v.29, n.10, p.500-506, 2000.

CHURCHILL, A.J.; CARTER, J.G.; RAMSDEN, C.; TURNER, S.J.; YEUNG, A.; BRENCHELEY, P.E.; RAY, D.W. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.49, p.3611-3616, 2008.

CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor. A unique regulator of blood vessel function. **J Cell Biochem**, v.47, p.219-223, 1991.

CORNELINI, R.; ARTESE, I.; RUBINI, C.; et al. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.16, p.389-393, 2001.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **Am J Pathol**, v.146, p.1029-1039, 1995.

FERRARA, N.; HOUCK, K. JAKEMAN, L.; LEUNG, D. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v.13, p.18-32, 1992

FLEMMIG, T.F. Periodontitis. **Annals of Periodontology**, v.4, p.32, 1999.

JAIN, L.; VARGO, C.A.; DANESI, R.; SISSUNG, T.M.; PRICE, D.K.; VENZON, D.; VENITZ, J.; FIGG, W.D. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. **Mol Cancer Ther**, v.8, n.9, p.2496-2508, 2009.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G.; DAI, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.70, p.848-852, 1999.

GOODSON JM, TANNER AC, HAFFAJEE AD, SORNBERGER GC, SOCRANSKY SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. **Journal Clinical Periodontology**, v.9, p.472-481, 1982.

KINANE, D.F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, p.430-449, 2003.

LANTIERI, L. A.; MARTIN-GARCIA, N.; WECHSLER, J.; MITROFANOFF, M.; RAULO, Y.; BARUCH, J.P. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue. A possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. **Plast Reconstr Surg**, v.101, p.392-398, 1998.

LESTER, S.R.; BAIN, J.L.; SERIO, F.G.; HARRELSON, B.D.; JOHNSON, R.B. Relationship between gingival angiopoietin-1 concentrations and depth of the adjacent gingival sulcus. **Journal of Periodontology**, v.80, n.9, p.1447-1453, 2009.

LOOS, B.G.; JOHN, R.P.; LAINE, M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. **Journal Clinical Periodontology**, v.32, p.159-79, 2005.

MATSUSHITA, K.; MOTANI, R.; SAUTA, T.; et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. **Infect Immun**, v.67, p.1633-1639, 1999.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; et al. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol Reprod**, v.65, p.1014-1019, 2001.

NAKAGAWA, K.; CHEN, Y.X.; ISHIBASHI, H.; et al. Angiogenesis and its regulation. Roles of vascular endothelial cell growth factor. **Semin Thromb Hemost**, v.26, p.61-66, 2000.

NARS, H.B.; CHAHED, K.; BOUAOUINA, N.; CHOUCANE, L. Functional vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. **Clin Chim Acta**, v.395, p.124-129, 2008.

NISSEN, N.; POLVERINI, P.J.; KOCH, A.E.; VOLIN, M.V.; GAMELLI, R.L.; diPIETRO, L.A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v.152, p.1442-1452, 1998.

PAGE, R.C.; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology** 2000, v.14, p.9-11, 1997.

PARRA, .F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p.177-182, 2003.

PRAPULLA, D. V.; SUJATHA, P. B.; PRADEEP, A. R. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. **Journal of Periodontology**, v.78, n.9, 2007.

SAKAI, A.; OHSHIMA, M.; SUGANO, N.; OTSUKA, K.; ITO, K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. **Journal of Periodontology**, v.77, p.856-864, 2006.

RENNER, W.; KOTSCHAN, S.; HOFFMAN, C.; OBERMAYER-PIETCH, B.; PILGER, E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. **J Vasc Res**, v.37, p.443-448, 2000.

SAKUTA, T.; MATSUSHITA, K.; YAMAGUCHI, N.; et al. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. **J Med Microbiol**, v.50, p.233-237, 2001.

SCHENKEIN, H.A. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? **Periodontology** 2000, v.30, p.79-90, 2002.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulacion angiogenesis. **J Clin Invest**, v.1, p.2235-2243, 1993.

SUTHIN K, MATSUSHITA K, MACHIGASHIRA M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**,v.38, n.1, p.90-96, 2003.

TAICHMAN, N.S.; CRUCHLEY, A.T. FLETCHER, L.M.; et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva. A possible role in the maintenance of mucosal hemostasis. **Lab Invest**, v.78, p.869-875, 1998.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splincing. **J Biol Chem**, v.266, p.11947-11954, 1991.

UMEDA, M. et al. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. **Journal of Periodontology**, v.69, p. 1111-1118, 1998.

VAN WINKELHOFF, A.J. et al. Black-pigmented Bacterioides and motile organisms on oral mucosal surface in individuals with and without periodontal breakdown. **Journal of Periodontal Research**, v.21, p. 434-439, 1986.

YOUNG, H.S.; SUMMERS, A.M.; BHUSHAN, M.; BRENCHELEY, P.E.; GRIFFITHS, C.E. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. **J Invest Dermatol**, v.122, p.209-215, 2004.

ZAMBON, J.J.; REYNOLDS, H.S.; SLOTS, J. Black- pigmented Bacterioides spp. in the human oral cavity. **Infection and Immunity**, v.32, p. 198-203, 1981.

ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

N.º Registro CEP: 0168.0.213.000-09

Título do Projeto: Polimorfismo do VEGF na etiopatogenia das periodontites

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações que você não compreendeu.

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre a diferença de uma proteína (VEGF) nas pessoas com e sem problemas na gengiva. Você foi selecionado porque é de um dos dois grupos (grupo com problemas na gengiva ou grupo sem problemas na gengiva). É importante que leia as informações abaixo para entender o seu papel nesta pesquisa e decidir se está disposto(a) a participar da mesma. Sua participação não é obrigatória. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição, PUCMINAS. Caso após a leitura e compreensão deste termo de consentimento você decida participar, você dará o seu consentimento livre e esclarecido por escrito assinando seu nome no final do termo.

Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar se o VEGF de pessoas que têm a gengiva inflamada ou não é diferente.

Procedimentos do Estudo (o que será feito)

Se concordar em participar deste estudo, vamos coletar células da sua boca. Para isso, vamos usar uma espátula plástica que será passada na mucosa da sua boca. Vamos extrair o DNA das células para avaliarmos o gene do VEGF. Avaliando a sequência do seu gene saberemos se o VEGF participa ou não da perda de implantes.

Riscos, desconfortos

Nesta pesquisa não existem riscos adicionais ao de um exame feito por um dentista. A participação na pesquisa não acarretará gasto para você, sendo totalmente gratuita.

Sigilo, privacidade e anonimato

Garantimos a manutenção do sigilo sobre as informações obtidas assim como a manutenção da sua privacidade e de seu anonimato. Apenas os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso ao seu prontuário e resultados. Você não será identificado (manutenção do anonimato) caso seus dados sejam utilizados em publicações científicas. Caso deseje, você poderá saber qual foi o resultado da sua avaliação.

Participação

É importante que você esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou sair do estudo a qualquer momento sem penalidades. Caso você decida retirar-se do estudo, notifique o pesquisador.

Para obter informações adicionais

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

PUCMINAS, Faculdade de Odontologia, Programa de Mestrado em Clínicas Odontológicas.

Avenida Dom José Gaspar, 500 – Prédio 46, Coração Eucarístico

Belo Horizonte, MG- Brasil Cep. 30535-610

Telefone (31) 3319-4414; Fax (31) 3319-4415

E-mail: mestodonto@pucminas.br

Professor Rodrigo Villamarim Soares (pesquisador)

Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, você também poderá contatar o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, no telefone (31) 3319-4298, Fax (31) 3319-4229 ou E-mail: clcarv@pucminas.br

Declaração de consentimento

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado adequadamente sobre a minha participação no estudo e entendi as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi explicada de maneira adequada e que minhas dúvidas foram esclarecidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem qualquer penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos da participação no mesmo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele/ela compreendeu essa explicação.

Assinatura do pesquisador

Data