

Giselle Póvoa Gomes

**DISTRIBUIÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO GENE
MUC7 EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA E
CRÔNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2008

Gomes, Giselle Póvoa
G585a Distribuição do polimorfismo genético do gene MUC7 em indivíduos com
periodontite agressiva e crônica / Giselle Póvoa Gomes. Belo Horizonte, 2008.
47f. : il.

Orientador: Rodrigo Villamarim Soares
Co-orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Mucosa bucal. 2. Polimorfismo genético. 3. Imunidade natural. 4. Periodontite. I.
Soares, Rodrigo Villamarim. II. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. III. Pontifícia
Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III.
Título.

CDU: 616.311

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amores Mirian e Fernando pelo apoio, incentivo e amor incondicionais. O meu muito obrigada, pois vocês são meu esteio, minha força e minha fé. À minha querida vovó Hollandina (*in memoriam*) por me iluminar e estar sempre presente em minha vida. A todos que acreditaram e torceram por esta conquista. Ao meu querido orientador Rodrigo, pelo esforço, dedicação e exemplo. Ao Paulo Eduardo, meu co-orientador, por todo o apoio e contribuição. Ao professor Élton, pelo incentivo e parceria. A Deus, por permitir tudo isso.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, Mirian e Fernando, pelo amor maior e desprendimento em prol da realização deste grande sonho.

Ao meu namorado Christian, por acreditar e apostar no meu ideal.

À minha família, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus amigos, pelo incentivo e carinho.

Aos meus irmãos, em especial à Adriana, por ter me acolhido.

Aos meus queridos Mestres Rodrigo Villamarim Soares, Paulo Eduardo Alencar de Souza, Élton Gonçalves Zenóbio, Adriana de Castro Amédée Péret, pelo grande exemplo de profissionais e pessoas que são. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e apoio na minha formação profissional.

Obrigada, Rodrigo Villamarim, pela paciência, apoio, orientação e amizade.

Aos professores da clínica de periodontia e todos os professores do mestrado.

À querida Reni, do laboratório de Patologia, pelo amparo e amizade.

À professora Helenice, pela disponibilidade e atenção.

Ao Prof. Roberval, pela atenção constante.

À Prof^a. Patrícia da periodontia, pela boa vontade, disposição e carinho.

À Prof^a. Telma Lorentz e Prof Fernando Costa, pelo apoio.

Aos meus queridos colegas do mestrado, em especial, Thaís Ribeiral Vieira e Leonardo Damasceno pelo espírito coletivo, companheirismo e amizade.

À Paula Rocha, pela contribuição ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Germano, pelo auxílio prestado.

Aos queridos alunos da graduação Clarice e Gustavo, que se tornaram grandes amigos, pelo prazer em repassar seus conhecimentos, pela atenção, apoio e amizade.

Às queridas amigas, também alunas da graduação, Marina e Juliana, pelo companheirismo, amizade e alegria.

Aos queridos alunos da graduação Pedro e Karine, pelo carinho e apoio.

Ao Francisco, pelo coleguismo.

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

A todos os funcionários, em especial à Cris, Alenice e Conceição.

Aos pacientes que participaram do trabalho
A Deus, por tudo isso

RESUMO

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de suporte dos dentes. Há relatos da associação de variantes polimórficas de diferentes moléculas com a DP. Adicionalmente, indivíduos portadores de periodontites exibem uma expressão diferenciada da mucina glicoproteína-2 (MG2) e de outras proteínas salivares. MG2 é codificada pelo gene MUC7 e possui atividade fungicida, bactericida e antivirótica. O gene MUC7 apresenta polimorfismo genético em relação ao número de repetições em tandem (RTs) e esta variação está associada a alterações funcionais em portadores de asma e na atividade respiratória em geral. O objetivo do presente estudo é avaliar a frequência da distribuição das variantes alélicas do gene MUC7 em indivíduos com periodontite agressiva, crônica e sem periodontite. Células da mucosa oral foram coletadas, o DNA extraído, primers específicos foram utilizados para amplificar a região que codifica as RTs e os produtos analisados através de eletroforese. Embora os percentuais de distribuição de homozigotos (6 RTs) e heterozigotos (5 RTs e 6 RTs) tenham apresentado variações entre os grupos, estas não foram significativas estatisticamente ($p>0,05$; Correlação de Fisher). A mobilidade eletroforética de produtos derivados de 5 ou 6 RTs não resultou em bandas distintas em Western Blots. Estes resultados indicam que polimorfismos de repetição em tandem no gene que codifica a mucina MG2 não estão associados ao desenvolvimento das formas agressiva e crônica da doença periodontal.

Palavras Chave: *mucina salivar, polimorfismo genético, expressão protéica, imunidade inata, periodontites.*

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is characterized by an inflammatory reaction of the supporting periodontal tissues of the teeth. There are reports of the association of polymorphisms variants of different molecules with PD. Furthermore, individuals with periodontitis exhibit a differential expression of mucin-glycoprotein-2 (MG2) and in other salivary proteins. MG2 is encoded in the MUC7 gene and possess bactericidal, candidacidal and antiviral activities. The MUC7 gene exhibits genetic polymorphism related to the number of tandem repeats (TRs) and this variation is associated with functional changes in patients with asthma and in respiratory activity in general. The purpose of this study is to assess the distribution frequency of allelic variants of the gene MUC7 in individuals with aggressive periodontitis, chronic and without periodontitis. Oral mucosal cells were collected, the DNA extracted, specific primers were used to amplify the region that encodes the TRs and the products analyzed by eletrophoresis. Although the percentage distribution of homozigotes (6 TRs) and heterozigotes (5 TRs and 6 TRs) have shown variation among groups, this difference was not considered statistically significant ($p>0,05$; Fisher's Correlation). The eletrophoretic mobility of products derived from 5 or 6 TRs did not result in distinct bands in Western Blots. These results indicate that polymorphisms related to the number of tandem repeats in the gene coding for mucin MG2 are not associated with the development of aggressive and chronic forms of periodontal disease.

Keywords: salivary mucin, genetic polymorphism, protein expression, innate immunity, periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO CIENTÍFICO	Erro! Indicador não definido.
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.1

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal, uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de suporte dos dentes, ocorre em decorrência de uma infecção provocada por um grupo específico de bactérias (BECK; OFFENBACHER, 1998). Existem duas formas principais de periodontite: a crônica e a agressiva (ARMITAGE, 1999; FLEMMING, 1999). Na periodontite crônica, as características da doença não estão presentes significativamente até a terceira década de vida, enquanto que a forma agressiva pode ocorrer na primeira, segunda, terceira, e quarta décadas (POTTER, 1989).

A periodontite agressiva destaca-se nas suas formas localizada e generalizada. A progressão da doença é rápida, a quantidade de deposição microbiana é incompatível com a severidade da destruição periodontal, e esta doença tende a exibir um caráter familiar (ARMITAGE, 1999). Na periodontite crônica, a presença de fatores irritantes locais é compatível com a severidade da doença e, geralmente, a taxa de progressão da doença é lenta ou moderada (ARMITAGE, 1999).

Geneticistas referem-se a diferentes formas dos genes como variantes alélicas ou alelos. Variantes alélicas de um gene se diferenciam em suas seqüências de nucleotídeos. Quando um específico alelo ocorre em, no mínimo, 1% da população, isso é denominado polimorfismo genético e estes são considerados como variantes normais na população (GUTTMACHER; COLLINS, 2002).

Há relatos da associação entre variantes polimórficas da Interleucina-1 e a doença periodontal (KORNMAN; DUFF, 2001; GUZMAN *et al.*, 2003; MEISEL *et al.*, 2003; KOMATSU *et al.*, 2008;). Variantes polimórficas da Interleucina-4 (HOLLA *et al.*, 2008) e da Interleucina-6 (TREVILATTO *et al.*, 2003) também foram associadas a um aumento da incidência da doença periodontal. Resultados similares foram observados em estudos avaliando o polimorfismo genético de receptores para a Vitamina D, que são responsáveis pela ativação de monócitos, estimulação da imunidade celular e inibição da proliferação de linfócitos, e a incidência de doença periodontal (TACHI *et al.*, 2003; GUNES *et al.*, 2008).

Estudos prévios relataram que a expressão e/ou função de proteínas salivares (lactoferrina, lisozima, MG2 e SIgA) estava alterada em indivíduos portadores de doença periodontal (JALIL *et al.*, 1993; GROENINK *et al.*, 1999, FINE *et al.*, 2002; DIAB-LADKI *et al.*, 2003; JENTSCH *et al.*, 2004). A mucina glicoproteína-2 (MG2) é produzida nas secreções salivares derivadas das glândulas submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores (SOARES *et al.*, 2002). Esta mucina salivar está presente na película adquirida formada sobre o cemento (FISHER *et al.*, 1987), possui atividade fungicida (Gururaja *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000), bactericida (LIU *et al.*, 2002) e a capacidade de formar complexos com a SIgA e a lactoferrina (BIESBROCK *et al.*, 1991; SOARES *et al.*, 2003).

MG2 é codificada pelo gene MUC7 (BOBEK *et al.*, 1993) e um estudo sobre a incidência de polimorfismo na região das repetições em tandem (RTs) deste gene revelou que a distribuição dos percentuais de homozigotos (indivíduos com 6 RTs em ambos os alelos) e heterozigotos (indivíduos com 5 RTs em um dos alelos e 6 RTs no outro) entre os indivíduos portadores de asma era diferente da dos não portadores, sugerindo que a expressão do alelo com 5 RTs apresentaria um possível fator protetor na função pulmonar (KIRKBRIDE *et al.*, 2001).

Concluindo, variantes polimórficas de interleucinas e de receptores celulares foram associados a um aumento da incidência de doença periodontal. A mucina salivar MG2 possui diversas funções na cavidade oral, tem sua expressão alterada em portadores de doença periodontal e exhibe polimorfismo genético. Assim sendo, a avaliação da possível associação entre variantes polimórficas do gene MUC7 e a doença periodontal poderá determinar a importância deste polimorfismo na etiopatogênese da doença periodontal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a frequência das variantes alélicas do polimorfismo do gene MUC7.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se a frequência das variantes alélicas do polimorfismo do gene MUC7 em indivíduos com periodontite agressiva, crônica e sem periodontite é diferenciada.
- Comparar a mobilidade eletroforética do produto do gene MUC7 de indivíduos homozigotos (6-6 RTs) e heterozigotos (5-6 RTs).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Doenças poligênicas são doenças complexas associadas a variações em múltiplos genes, cada qual tendo uma pequena contribuição e risco na manifestação das mesmas. Já nas doenças mendelianas, um único gene que sofreu uma mutação é o principal determinante do fenótipo da doença. Geneticamente, doenças complexas são muito mais prevalentes, ocorrem numa frequência maior que 1% na população e fatores ambientais são importantes no seu processo (TABOR *et al.*, 2002).

As variantes genéticas que contribuem para as doenças complexas são denominadas polimorfismos genéticos (KINANE; HART, 2003). O polimorfismo genético ocorre quando diferentes alelos (variante de um gene que ocupa um local específico, um *locus* no cromossomo) de um mesmo gene coexistem na população. Dois ou mais alelos para um dado *locus* podem existir na natureza através da evolução. O polimorfismo genético resulta de espontâneas mutações gênicas em células com função normal ou de interações aleatórias com o ambiente (SHORK *et al.*, 2000).

Existem polimorfismos genéticos derivados de uma mutação pontual, assim como de inserções e deleções. A classe mais comum de mutação pontual é a transição, que compreende a substituição de um par G-C por um A-T e vice-versa. A variação no sítio que abriga essas mudanças recebeu o nome de polimorfismo de um único nucleotídeo (SHORK *et al.*, 2000). Com relação ao polimorfismo genético derivado de inserções ou deleções, o minissatélite ou NVRT (número variável de repetições em tandem) é formado por seqüências de vários nucleotídeos repetidas em número diferente em cada indivíduo, fornecendo assim, uma característica única. Há também o polimorfismo genético do tipo microssatélite ou SSRP (seqüência simples de repetição polimórfica) que é constituído por seqüências repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos (SCHORK *et al.*, 2000).

Polimorfismos genéticos são muito utilizados em estudos de genética populacional através da genotipagem de indivíduos e da avaliação das frequências genotípicas entre grupos de interesse, sendo que essas frequências podem se diferenciar de um grupo doente para um grupo controle.

Desse modo, quando um dado alelo é identificado por associar-se a uma doença, estudos funcionais podem ser iniciados para a investigação de um possível papel para aquele gene na etiologia e patogênese da doença (LOOS *et al.*, 2005)

Há evidências clínicas e científicas de que os fatores genéticos sejam determinantes na susceptibilidade e progressão da doença periodontal, tendo em vista que variantes alélicas podem interferir nas respostas imunes inata e adaptativa, através da alteração nos níveis de produção de mediadores inflamatórios (KINANE; HART, 2003).

A doença periodontal é uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de suporte dos dentes provocada por um grupo específico de bactérias (BECK & OFENBACHER, 1998). Existem duas formas principais de periodontite, a crônica e a agressiva (ARMITAGE, 1999; FLEMING, 1999). A periodontite agressiva (PA) destaca-se nas suas formas localizada e generalizada. A progressão da doença é rápida, a quantidade de deposição microbiana é incompatível com a intensidade da destruição periodontal e sua manifestação tende a exibir um caráter familiar (ARMITAGE, 1999). Na periodontite crônica (PC), a presença de fatores irritantes locais é compatível com a intensidade da doença e, geralmente, a progressão da doença é lenta ou moderada (ARMITAGE, 1999).

Variantes polimórficas podem estar associadas com variadas formas clínicas de periodontite (KORNMAN *et al.*, 1997). Há relatos da associação entre variantes polimórficas da Interleucina-1 (IL-1) e a doença periodontal (KORNMAN; DUFF, 2001; GUZMAN *et al.*, 2003). A IL-1 é considerada uma citocina crucial na patogênese da doença periodontal (MEISEL *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por Kornman *et al.* (1997) numa amostra de 87 indivíduos não fumantes, observou-se que 80% dos indivíduos que apresentavam mais de 10% dos sítios com sangramento à sondagem possuíam genótipo positivo para uma maior produção de IL-1, enquanto que apenas 38,6% dos indivíduos sem genótipo positivo para IL-1 apresentaram mais do que 10% dos sítios com sangramento à sondagem. Os indivíduos com genótipo positivo para uma maior produção IL-1 tiveram risco calculado para o desenvolvimento da destruição periodontal sete vezes maior do que os demais indivíduos.

A citocina IL-4 também é considerada importante para o controle da doença periodontal, tendo em vista que a mesma inibe a secreção de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. Assim sendo, foi relatado que a ausência local de IL-4 aumentaria a atividade da doença periodontal (SHAPIRA *et al.*, 1992). Adicionalmente, variantes polimórficas da IL-4 foram relacionadas a um maior risco para desenvolvimento de periodontite crônica (HOLLA *et al.*, 2008). Variantes polimórficas da IL-6 também foram associadas a um aumento da incidência da doença periodontal (TREVILATTO *et al.*, 2003).

De maneira geral, uma ausência de associação entre polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do gene da citocina Interleucina-10 (IL-10) e o desenvolvimento de periodontite agressiva e crônica tem sido demonstrada (GONZALES *et al.*, 2002; SCAREL-CAMINAGA *et al.*, 2004; MELLATI *et al.* 2007). Entretanto, associação entre o polimorfismo -1087 e a periodontite crônica grave foi descrita em europeus (BERGLUNDH *et al.*, 2003). A presença da base G na posição -1087 estaria relacionada com o aumento na produção da IL-10, enquanto que a base A nessa posição, levaria a um decréscimo na produção dessa citocina (BERGLUNDH *et al.*, 2003).

Estudos similares avaliando a associação entre o polimorfismo genético de receptores para a Vitamina D e a incidência da doença periodontal foram descritos (TACHI *et al.*, 2001; TACHI *et al.*, 2003). Foi relatado que a variação genética e, conseqüente expressão de receptores alterados, modificava a resposta imunológica, uma vez que a Vitamina D participa da ativação de monócitos, estimula a imunidade celular e inibe a proliferação de linfócitos.

Estudos prévios relataram que a expressão e, em alguns casos, a função de proteínas salivares como a lactoferrina, lisozima, mucina glicoproteína-2 (MG2) e imunoglobulina secretora A (IgAs) estavam alteradas em indivíduos portadores de doença periodontal (JALIL *et al.*, 1993; GROENINK *et al.*, 1999, FINE *et al.*, 2002; DIAB-LADKI *et al.*, 2003; JENTSCH *et al.*, 2004). A MG2 é codificada pelo gene MUC7 e é considerada um membro único da família dos genes das mucinas por ser pequena, solúvel e monomérica (MONIAUX *et al.*, 2001).

Os genes das mucinas exibem polimorfismo genético do tipo NVRT e estão historicamente associados com os tecidos dos quais foram clonados -

MUC1 (pancreático); MUC2 e MUC3 (intestinal); MUC4, MUC5AC e MUC5B (traqueobronquial); MUC6 (gástrico); e MUC7 (salivar) (BIESBROK *et al.*, 1997). As mucinas, produtos destes genes, são classificadas como de alto peso molecular formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) (PEREZ-VILLAR; HILL, 1999), de alto peso molecular associadas a membranas (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12-13) (CARRAWAY *et al.*, 2000), e como de baixo peso molecular (MUC7) (MONIAUX *et al.*, 2001).

Na saliva humana, há duas mucinas denominadas mucina glicoproteína-1 MG1 (produto do gene MUC5B) e MG2, as quais são encontradas nas secreções das glândulas submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores (TABAK, 1995). Particularmente, a MG2 tem um peso molecular aparente de 180 kDa (150-200 kDa), sendo constituída de 30,4% de proteína, 68% de carboidrato e 1,6% de sulfatos (LOOMIS *et al.*, 1987). MG2 é codificada pelo gene MUC7, localizado no cromossomo 4q13-q21 (BOBEK *et al.*, 1993; 1996) e sua concentração na saliva total é aproximadamente de 13,3 mg% (RAYMENT *et al.*, 2000). Possui uma configuração espacial estendida, assemelhando-se a uma escova de mamadeira (LOOMIS *et al.*, 1987) e apresenta uma alta concentração de resíduos de serina, treonina, prolina e alanina, os quais compreendem juntos 65% dos aminoácidos da mesma.

A MG2 é composta por 357 aminoácidos, que estão localizados em 3 regiões principais. Um total de 144-resíduos na região N-terminal; uma região contendo usualmente 6 repetições em tandem (RT) com 23 resíduos cada, denominada região RT (total de 138 resíduos); e uma região C-terminal com 75 resíduos (GURUJARA *et al.*, 1998). Dentre os resíduos de asparagina com potencial para N-glicosilação encontrados, 3 ocorrem na região N-terminal e 2 na região C-terminal da MG2. As cadeias laterais de carboidratos possuem de 2 a 7 monossacarídeos e a maioria dos mesmos é N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose, fucose e/ou ácido siálico (PRAKOBPHOL *et al.*, 1982).

MG2 está presente no biofilme que recobre as superfícies orais, prevenindo contra o ressecamento dos tecidos moles e atuando na mastigação, deglutição e fala (COLLINS; DAWES, 1987). Ocorre na película adquirida formada sobre o cimento (FISHER *et al.*, 1987) e interage e aglutina

diversos microorganismos orais (BIESBROK *et al.*, 1991; LIGHTENBERG *et al.*, 1992; REDDY *et al.*, 1993; STINSON; LEVINE *et al.*, 1993; GROENINK *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1999, 2000, 2002). MG2 tem a propriedade de aglutinar o vírus HIV-1 (BERGEY *et al.*, 1994) e inibir a infecção por este vírus (NAGASHUNMUGAM *et al.*, 1997).

Um estudo prévio utilizando um fragmento recombinante da MG2, correspondendo aos resíduos 1 a 86 descreveu que este se ligava especificamente ao pili da *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores sugeriram que essa interação desempenharia um papel central na modulação da colonização dessa bactéria na área orofaríngea, prevenindo a adesão de *P. aeruginosa* às células epiteliais (REDDY, 1998). Posteriormente, foi relatado que outra proteína recombinante denominada rNMUC7, compreendendo os 144 resíduos da região N-terminal da MG2, continha um determinante estrutural para ligação bacteriana (LIU *et al.*, 2002). A rNMUC7 apresentava atividade fungicida contra o fungo *Candida albicans* e experimentos adicionais indicaram que as cisteínas presentes nesta região participavam do processo. Tendo em vista que apenas duas cisteínas ocorrem na MG2, Soares *et al.* (2002) submeteram a MG2 a reações de alquilação e analisaram os resultados por meio de Western Blot, ELISA e espectrometria de massa. Os resultados revelaram que as duas cisteínas presentes na apomucina se encontram na forma ditiol.

Um estudo com o objetivo de se detectar complexos entre a MG2 e outras proteínas salivares através de um procedimento denominado *panning*, que consiste na interação entre uma proteína alvo, neste caso a MG2, e peptídeos codificados em plasmídeos, foi conduzido previamente (SOARES *et al.*, 2003). Os autores relataram que uma seqüência de aminoácidos que ocorre na lactoferrina foi encontrada, e a interação confirmada em outros experimentos. Devido às características peculiares da MG2 e lactoferrina, os autores sugeriram que a migração desse complexo heterotípico para o esmalte e/ou cimento poderia resultar na localização de uma proteína antibacteriana e uma antiinflamatória em sítios onde patógenos orais podem estar presentes. MG2 é um dos componentes de estruturas denominadas de micelas salivares, cuja formação se dá através de um processo seletivo de interações entre as proteínas salivares (SOARES *et al.*, 2004).

Com o objetivo de se avaliar o polimorfismo genético do gene MUC7 sugerido em estudo anterior (BOBEK *et al.*, 1993), Biesbrok *et al.* (1997) amplificaram a região de interesse do gene em amostras de 14 indivíduos. Um produto de amplificação com 6 repetições em tandem (RT) foi observado em 10 indivíduos e fragmentos que correspondiam a um alelo codificando 5 e o outro, 6 RTs nos demais indivíduos. Esses dados foram confirmados em análise através de Southern Blot em amostras de 6 dos 14 indivíduos.

Kirkbride *et al.* (2001) realizaram um estudo com 162 indivíduos que foram classificados em quatro grupos, sendo 83 asmáticos/alérgicos, 10 asmáticos/não-alérgicos, 58 não-asmáticos/alérgicos e 11 não-asmáticos/não-alérgicos. Uma significativa menor frequência do alelo contendo 5 RTs foi encontrada nos indivíduos com asma em comparação aos não asmáticos, assim como comparando os asmáticos/alérgicos com os asmáticos/não-alérgicos. Estes resultados sugeriram um possível fator protetor do alelo 5 na função pulmonar. Adicionalmente, a seguinte distribuição dos alelos foi observada nos participantes: 0,8% dos indivíduos eram homozigotos (5-5 RTs), 21,3% heterozigotos (5-6 RTs), 77,6% homozigotos (6-6 RTs) e 0,26% heterozigotos (6-8 RTs).

Com o intuito de averiguar se o possível efeito protetor do alelo 5 na função pulmonar se deu por diferença funcional, Rosseau *et al.* (2006) estudaram variações genéticas frequentes em regiões potencialmente funcionais. Indivíduos com o alelo contendo 5 RTs apresentaram menor probabilidade de ocorrência de resfriado do que indivíduos com o alelo contendo 6 RTs, confirmando o efeito protetor descrito previamente (KIRKBRIDE *et al.* 2001).

Concluindo-se, o gene MUC7 apresenta polimorfismo genético do tipo NVRT de 5, 6 ou 8 RTs e exibe um fator protetor em relação à asma no trato respiratório e ao declínio da função respiratória com a idade. A glicoproteína MG2 é de fundamental importância na manutenção da homeostasia da cavidade oral, tendo em vista que é um agente bactericida, fungicida e antiviral. Portanto, a investigação da relação desse polimorfismo com periodontites, particularmente se ele influencia ou não na incidência e gravidade da doença, permitirá aumentar a compreensão do papel deste componente salivar na etiopatogênese destas doenças.

REFERÊNCIAS

- ARMITAGE, G. C. International workshop for a classification of periodontal disease and conditions. ***Annals of Periodontology***, v.4, p.1-6, 1999.
- BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. Oral health and systemic disease: periodontitis and cardiovascular disease. ***Journal of Dental Education***, v.62, p.859-870, 1998.
- BERGEY, E. J. *et al.* Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. ***Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes***, v. 7, p 995-1002, 1994.
- BERGLUNDH, T. *et al.* Association of the 1087 IL-10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. ***Journal of Clinical Periodontology***, v.30, p.249-254, 2003.
- BIESBROCK, A. R.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. ***Infection and Immunity***, v.59, p.3492-3497, 1991.
- BIESBROCK, A. R.; BOBEK, L. A.; LEVINE, M. J. MUC7 gene expression and genetic polymorphism. ***Glycoconjugate Journal***, v.14, p.415-422, 1997.
- BOBEK, L. A. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene MUC7. ***Genomics***, v.32, p.277- 282, 1996.
- BOBEK, L. A. *et al.* Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). ***The Journal of Biological Chemistry***, v.268, p.20563-20569, 1993.
- CARRAWAY, K. L. *et al.* Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues. ***Frontiers Biosciences***, v.5, p.95-107, 2000.
- COLLINS, L. M.; DAWES, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. ***Journal of Dental Research***, v.66, p.1300-1302, 1987..
- DIAB-LADKI, R.; PELLAT, B.; CHAHINE, R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. ***Clinical Oral Investigation***, v.7, p.103-107, 2003.
- FINE, D.H.; FURGANG, D.; BEYDOUIN, F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with localized aggressive periodontitis. ***Journal of Periodontology***, v.73, p.624-30, 2002.
- FISHER, S. J. *et al.* External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. ***Archives of Oral Biology***, v.32, p.509-517, 1987.
- FLEMMING, T. F. Periodontitis. ***Annals of Periodontology***, v.4, p.32, 1999.

GONZALES, J. R. *et al.* Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. ***Journal of Clinical Periodontology***, v.29, p.816-822, 2002.

GROENINK, J. *et al.* Interaction of the salivary low-molecular-weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. ***Antonie Van Leeuwenhoek***, v.70, p.79-87, 1996.

GROENINK, J. *et al.* Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. ***Journal of Clinical Periodontology***, v.26, p.269-275, 1999.

GUNES, S. *et al.* Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. ***Indian Journal of Medical Research***, v.127, p.58-64, 2008.

GURURAJA, T. L. *et al.* Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7). ***Biochimica et Biophysica Acta***, v.1431, p.107-119, 1999.

GURURAJA, T. L. *et al.* Structural features of human salivary mucin, MUC7. ***Glycoconjugate Journal***, v.15, p.457-467, 1998.

GUTTMACHER, A. E; COLLINS, F. S. Genomic medicine – a primer. ***New England Journal of Medicine***, v.347, p.1512-1520, 2002.

GUZMAN, S. *et al.* Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in diabetic population. ***Journal of Periodontology***, v.74, p.1183-1190, 2003.

HOLLA, L. I. *et al.* Association of interleukin-6 (IL-6) haplotypes with plaque-induced gingivitis in children. ***Acta Odontologica Scandinavica***, v.66, p.105-112, 2008.

JALIL, R. A. *et al.* Concentrations of thiocyanate, hypothiocyanite, 'free' and 'total' lysozyme, lactoferrin and secretory IgA in resting and stimulated whole saliva of children aged 12-14 years and the relationship with plaque accumulation and gingivitis. ***Journal of Periodontal Research***, v.28, p.130-136, 1993.

JENTSCH, H.; SIEVERT, Y.; GÖCKE, R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. ***Journal of Clinical Periodontology***, v.31, p.511-514, 2004.

KINANE, D. F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. ***Critical Review Oral Biology and Medicine***, v.14, p.430-449, 2003.

KIRKBRIDE, H. J. *et al.* Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. ***European Journal of Human Genetics***, v.9, p.347-354, 2001.

KOMATSU, Y. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping method. **International Journal of Immunogenetic**, v.35, p.165-170, 2008.

KORNMAN, K. S.; DUFF G. W. Candidate genes as potential links between periodontal and cardiovascular diseases. **Annual of Periodontology**, v.1, p.48-57, 2001.

KORNMAN, K. S. *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of. Clinical Periodontology**, v. 24, p.72-77, 1997.

LIGHTENBERG, A. J. *et al.* Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG 222. **Infection and Immunity**, v.60, p.3878-3884, 1992.

LIU, B. *et al.* The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral *Streptococci* and exhibits candidacidal activity. **Biochemical Journal**, v.345, p.557-564, 2000.

LIU, B. *et al.* Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v.364, p.286-293, 1999.

LIU, B. *et al.* Interaction of human salivary mucin MG2, its recombinant N-terminal region and a synthetic peptide with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Periodontal Research**, v.37, p.416-424, 2002.

LOOMIS, R. E. *et al.* Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v.258, p.452-464, 1987.

LOOS, B. G.; JOHN R. P.; LAINE, M. L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p.159-179, 2005.

MEISEL, P., *et al.* The interleukin-1 polymorphisms, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based. Ship study. **Journal of Dental Research**, v.82, p.189-193, 2003.

MELLATI, E. *et al.* Analysis of -1082 IL-10 gene polymorphism in Iranian patients with generalized aggressive periodontitis. **Medical Science Monitoring**, v.13, p.510-514, 2007.

MONIAUX, N. *et al.* Structural organization and classification of the human mucin genes. **Frontiers of Bioscience**, v.6, p.1192-1206, 2001.

NAGASHUNMUGAM, T. *et al.* Human submandibular saliva inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection by displacing envelope glycoprotein

gp120 from the virus. **Journal of Infectious Diseases** v. 178, p. 1635-1641, 1998.

PEREZ-VILLAR, J.; HILL, R. L. The structure and assembly of secreted mucins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p.31751-31754, 1999.

POTTER, R. H. **Etiology of periodontitis**: the heterogeneity paradigm. Indianapolis: Oral Health Research Institute, Indiana University School of Dentistry, 1989.

PRAKOBPHOL *et al.* Purification of a low-molecular-weight mucin-type glycoprotein from human submandibular-sublingual saliva. **Carbohydrate Research**, v. 108, p.111-122, 1982.

RAYMENT, S. A. *et al.* Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. **Journal of Dental Research**, v. 79, p.1765-1772, 2000.

REDDY, M. S. Binding of the pili of *Pseudomonas aeruginosa* to a low-molecular-weight mucin and neutral cystatin of human submandibular-sublingual saliva. **Current Microbiology**, v.37, p.395-402, 1998.

ROSSEAU, K. *et al.* MUC7 haplotype analysis: results from a longitudinal birth cohort support protective effect of the MUC7*5 allele on respiratory function. **Annals of Human Genetics**, v. 70, p. 417-427, 2006.

SCAREL-CAMINAGA, R. M. *et al.* Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p.443-448, 2004.

SCHORK, N. J.; FALLIN, D.; LANCHBURY, J. S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clinical Genetics**, v.58, p.250-264, 2000.

SHAPIRA, L.; VAN DYKE, T. E.; HART, T. C. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. **Medical Hypotheses**, v.39, p.319-322, 1992.

SOARES, R. V. *et al.* Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, slgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. **Archives of Oral Biology**, v.49, p.337-343, 2004.

SOARES, R. V. *et al.* Structural characterisation of cysteines in a bacterial-binding motif of human salivary mucin MG2. **Archives of Oral Biology**, v.47, p.591-597, 2002.

SOARES, R. V. *et al.* MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. **Journal of Dental Research**, v.82, p.471-475, 2003.

STINSON, M. W.; LEVINE, M. J. Modulation of intergeneric adhesion of oral bacteria by human saliva. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, p. 309-314, 1993.

TABAK, L. A. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins **Annual Review of Physiology**, v. 57, p.547-564, 1995.

TABOR, H. K.; RISCH, N. J.; MYERS, R. M. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.391-397, 2002.

TACHI, Y. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. **Life Science**, v.73, p.3313-3321, 2003.

TACHI, Y. *et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphism with periodontal diseases in Japanese and Chinese. **Nucleic Acids Abstracts**, v.1,p.111-112, 2001.

TREVILATTO, P. C. *et al.* Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a caucasian Brazilian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, p.438-442, 2003.

Artigo Científico a ser submetido à revista "Journal of Clinical Periodontology".

Análise da Distribuição do Polimorfismo Genético da MG2 em Indivíduos com Periodontite Agressiva e Crônica

Giselle Póvoa Gomes¹

Paulo Eduardo Alencar de Souza²

Élton Gonçalves Zenóbio³

Rodrigo Villamarim Soares⁴

RESUMO

A doença periodontal (DP) é caracterizada por uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de suporte dos dentes. Há relatos da associação de variantes polimórficas de diferentes moléculas com a DP. Adicionalmente, indivíduos portadores de periodontites exibem uma expressão diferenciada da mucina glicoproteína-2 (MG2) e de outras proteínas salivares. MG2 é codificada pelo gene MUC7 e possui atividade fungicida e bactericida. O gene MUC7 apresenta polimorfismo genético em relação ao número de repetições em tandem (RT) e esta variação está associada a alterações funcionais em portadores de asma e na atividade respiratória em geral. O objetivo do presente estudo é avaliar a frequência da distribuição das variantes alélicas do gene MUC7 em indivíduos com periodontite agressiva, crônica e sem periodontite. Células da mucosa oral foram coletadas, o DNA extraído, primers específicos foram utilizados para amplificar a região que codifica as RTs e os produtos analisados através de eletroforese. Embora os percentuais de distribuição de homozigotos (6 RTs) e heterozigotos (5 RTs e 6 RTs) tenham apresentado variações entre os grupos, estas não foram significativas estatisticamente ($p > 0,05$; Correlação de Fisher). A mobilidade eletroforética de produtos derivados de 5 ou 6 RTs não resultou em bandas distintas em Western Blots. Estes resultados indicam que polimorfismos de repetição em tandem no gene que codifica a mucina MG2 não estão associados ao desenvolvimento das formas agressiva e crônica da doença periodontal.

Palavras Chave: *mucina salivar, polimorfismo genético, expressão protéica, imunidade inata, periodontites.*

¹ Mestranda em Clínicas Odontológicas – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

² Doutor em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais; Professor Adjunto de Estomatologia e Imunologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

³ Doutor em Periodontia pela Universidade do Estado de São Paulo; Professor Adjunto de Periodontia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

⁴ Doutor em Biologia Oral pela Boston University; Professor Adjunto de Periodontia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é caracterizada por uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de suporte dos dentes e ocorre em decorrência de uma infecção provocada por um grupo específico de bactérias ⁽¹⁾. Existem duas formas principais de periodontite: a crônica e a agressiva ^{(2) (3)}. Na periodontite crônica, as características da doença não estão presentes significativamente até a terceira década de vida, enquanto que a forma agressiva pode ocorrer na primeira, segunda, terceira e quarta décadas ⁽⁴⁾.

A periodontite agressiva destaca-se nas suas formas localizada e generalizada. A progressão da doença é rápida, a quantidade de deposição microbiana é incompatível com a severidade da destruição periodontal e esta doença tende a exibir um caráter familiar ⁽²⁾. Na periodontite crônica, a presença de fatores irritantes locais é compatível com a intensidade da doença e, geralmente, a progressão da doença é lenta ou moderada ⁽²⁾.

Geneticistas referem-se a diferentes formas dos genes como variantes alélicas ou alelos. Variantes alélicas de um gene se diferenciam em suas seqüências de nucleotídeos. Quando um específico alelo ocorre em, no mínimo, 1% da população, isso é denominado polimorfismo genético e estes são considerados como variantes normais na população ⁽⁵⁾.

Há relatos da associação entre variantes polimórficas da Interleucina-1 e a doença periodontal ⁽⁶⁾⁽⁰⁷⁾⁽⁰⁸⁾⁽⁰⁹⁾. Variantes polimórficas da Interleucina-4 ⁽¹⁰⁾ e da Interleucina-6 ⁽¹¹⁾ também foram associadas a um aumento da incidência da doença periodontal. Resultados similares foram observados em estudos avaliando o polimorfismo genético de receptores para a Vitamina D, que são responsáveis pela ativação de monócitos, estimulação da imunidade celular e inibição da proliferação de linfócitos ⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

Estudos prévios relataram que a expressão e/ou função de proteínas salivares, como lactoferrina, lisozima, mucina glicoproteína-2 (MG2) e imunoglobulina secretora A (IgAs), estavam alteradas em indivíduos portadores de doença periodontal ^{(14)(15)(16)(17) (18)}. A mucina salivar MG2 é produzida nas secreções salivares derivadas das glândulas submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores ⁽¹⁹⁾. Esta mucina salivar está presente na película

adquirida formada sobre o cimento ⁽²⁰⁾, possui atividade fungicida ⁽²¹⁾⁽²²⁾, bactericida ⁽²³⁾ e a capacidade de formar complexos com a IgAs e a lactoferrina ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾.

A MG2 é composta por 357 aminoácidos, que estão localizados em 3 regiões principais. Um total de 144-resíduos na região N-terminal; uma região contendo usualmente 6 repetições em tandem (RT) com 23 resíduos cada, denominada região RT (total de 138 resíduos); e uma região C-terminal com 75 resíduos ⁽²⁶⁾. MG2 é codificada pelo gene MUC7 ⁽²⁷⁾ e um estudo sobre a incidência do polimorfismo na região das RTs deste gene revelou que a distribuição dos percentuais de homozigotos (indivíduos com 6 RTs em ambos os alelos) e heterozigotos (indivíduos com 5 e 6 RTs) entre os indivíduos portadores de asma era diferente da dos não portadores, sugerindo que a expressão do alelo com 5 RTs apresentaria um possível fator protetor na função pulmonar ⁽²⁸⁾.

Uma vez que a mucina salivar MG2 possui diversas funções na cavidade oral, tem sua expressão alterada em portadores de doença periodontal e exhibe polimorfismo genético, a avaliação de possíveis associações entre variantes polimórficas do gene MUC7 e as formas agressiva e crônica da doença periodontal pode contribuir para melhor compreensão da participação dos fatores relacionados ao hospedeiro na etiopatogênese dessas doenças.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos Participantes

Este estudo transversal envolveu indivíduos do estado de Minas Gerais, Brasil, e o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, sob número CAAE 0016.0.213.000-05. Um total de 177 indivíduos em tratamento nas Clínicas de Periodontia das Faculdades de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foi incluído nesse estudo. Os indivíduos foram divididos em 3 grupos: indivíduos com periodontite agressiva (n=22), indivíduos com periodontite crônica (n=68) e indivíduos sem doença periodontal (grupo controle; n=87).

Presença de doenças sistêmicas ou outros problemas médicos relevantes, imunodepressão, gravidez, diabetes e antibioticoterapia nos últimos três meses foram utilizados como critérios de exclusão. O diagnóstico da doença periodontal foi obtido a partir das características radiográficas e da observação dos seguintes sinais e parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, medição da perda de inserção clínica, sangramento à sondagem, mobilidade dentária, presença de placa bacteriana ou cálculo dental. Medidas de profundidade de sondagem e de nível de inserção foram realizadas em seis sítios ao redor de cada dente. A diferenciação dos grupos foi baseada em critérios descritos previamente ⁽²⁾.

Os indivíduos com periodontite agressiva tinham idades entre 15 e 38 anos e apresentavam grande destruição periodontal na região de incisivos centrais e/ou primeiros molares permanentes, além de acúmulo de placa bacteriana não compatível com o grau de destruição tecidual. Os indivíduos com periodontite crônica tinham idades entre 25 e 55 anos e apresentavam inflamação, perda de inserção clínica maior do que 4 mm e acúmulo de placa compatível com o grau de destruição tecidual. Todos os indivíduos com periodontite crônica exibiam pelo menos três dentes com perda de inserção clínica. Os indivíduos do grupo controle tinham idades variando de 19 a 50 anos e não apresentavam história de doença periodontal, nem sinais e sintomas clínicos de doença periodontal ativa no momento da coleta. Todos os sítios periodontais destes indivíduos apresentavam profundidade de sondagem menor do que 4 mm.

Coleta de amostras e extração de DNA

Foram realizadas coletas de células epiteliais da mucosa jugal bilateralmente, através 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). A extração do DNA foi feita com base no protocolo descrito por Boom *et al.* ⁽²⁹⁾, com algumas modificações. Após centrifugação das células descamadas a 200g 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. Finalmente, 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 pela Polimerase

O polimorfismo do gene MUC7 foi avaliado por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase). As seqüências dos primers usados foram 5'-GGTCAACCCTACCTTAGTG-3' (senso) e 5'-TTGCTCCACCATGTCTCAA-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 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 35 segundos a 54°C, mais 30 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 diagnósticos moleculares foram determinados de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos: 833 pares de base (pb) correspondentes a 6 RTs e 764 pb correspondentes a 5 RTs.

Coleta de Saliva

Com a finalidade de se avaliar a mobilidade eletroforética da MG2 a fim de se determinar se o produto de 5 ou 6 RTs poderia ser distinguido através da eletroforese, saliva de indivíduos homozigotos (6 RTs) e heterozigotos (5 RTs e 6 RTs) foi coletada. A coleta foi realizada no período da manhã, entre 10:00 e 11:00 horas. Foi solicitado que os participantes se abstivessem de ingerir alimentos e bebidas nas duas horas que precederam a coleta. Os indivíduos enxaguaram a cavidade oral com água e em seguida a saliva estimulada foi coletada em tubos graduados mantidos previamente, e também durante o período da coleta (5 minutos), em gelo. As amostras obtidas foram centrifugadas (200g por 10 min) imediatamente após a coleta e o material sobrenadante transferido para um novo tubo e congelado a -20°C até a sua utilização em experimentos de eletroforese e Western Blot.

Eletroforese e Western Blot

Amostras de saliva (50 µl) foram liofilizadas, dissolvidas com o tampão de Laemmli e a corrida de eletroforese realizada em géis de separação (7.5 % SDS-PAGE). As proteínas salivares nos géis foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell). As transferências foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8.3, contendo glicina 0,19 M e metanol (20%), a 100 V, por 1 hora e a temperatura ambiente. Membranas contendo proteínas salivares imobilizadas foram incubadas em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 contendo NaCl 150 mM e 0,05% de Tween 20 (TBST) por 5 min e bloqueadas em TBST contendo 5% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBST (3X10min) e incubadas com anticorpos primários (produzidos em coelhos) direcionados contra a MG2, diluídos 1:1.000 em TBST contendo 1% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBST (3X10min) e incubadas com anticorpos secundários (produzidos em caprinos; Promega, Madison, WI, USA), conjugados com a fosfatase alcalina, direcionadas contra as imunoglobulinas G de coelhos, diluídos 1:7.500 em TBST contendo 1% de leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. As

membranas foram lavadas em TBST (3X10min) e incubadas com BCIP e NBT de acordo com as instruções do fabricante (Promega).

Análise Estatística

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

RESULTADOS

Variação alélica no número de repetições em tandem

Amostras de DNA de 177 indivíduos foram obtidas e utilizadas em reações de PCR. A análise dos produtos amplificados contendo a região que codifica as RTs do gene MUC7 foi feita em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata e um destes pode ser observado na Figura 1. A distribuição dos alelos nos indivíduos dos 3 grupos avaliados pode ser observada na Tabela 1. Um total de 149 indivíduos (84%) possuía os dois alelos com 6 RTs e 28 indivíduos (16%) possuía um alelo com 6 RTs e o outro com 5 RTs. O percentual de homozigotos (6-6 RTs) e heterozigotos (5-6 RTs) variou nos grupos avaliados. As proporções de homozigotos foram de 77,3% no grupo com periodontite agressiva; 88,2% no grupo com periodontite crônica; e 82,8% no grupo sem periodontite. Consequentemente, as proporções de heterozigotos foram de 22,7%; 11,8% e 17,2% para os mesmos grupos. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na comparação da distribuição de homozigotos e heterozigotos nos grupos avaliados (Correlação de Fisher – $p > 0,05$ em todas as análises).

Mobilidade Eletroforética do Produto do Gene MUC-7

A especificidade do anticorpo usado neste estudo foi comprovada em estudos prévios ⁽³⁰⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁵⁾⁽³¹⁾. Western Blots foram conduzidos em amostras de saliva de indivíduos heterozigotos e homozigotos para avaliar a expressão do gene MUC7 nos mesmos. A mobilidade eletrofrética das bandas imuno-reativas derivadas da MG2 contendo 6-6 RTs ou 5-6 RTs foi similar. Um Western Blot representativo pode ser observado na Figura 2.

DISCUSSÃO

A MG2 encontra-se presente no biofilme que cobre a superfície da mucosa oral ⁽³²⁾, possui afinidade pela hidroxiapatita ⁽³³⁾ e foi identificada na película formada sobre o esmalte e o cimento ⁽²⁰⁾. Interage com vários microorganismos da cavidade oral, exibe atividade fungicida para *Candida albicans* ⁽²¹⁾⁽²³⁾, bactericida para o patógeno periodontal *Agregatibacter actinomycetemcomitans* ⁽²³⁾, e capacidade de aglutinar um número importante de bactérias orais ⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽²⁴⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾ e também o vírus HIV-1 ⁽³⁸⁾.

Foi relatado que a formação de um complexo heterotípico entre MG2 e imunoglobulinas IgAs ocorre e que o mesmo favorece a atividade antimicrobiana das proteínas envolvidas ⁽²⁴⁾. Outro complexo heterotípico envolvendo esta mucina e a lactoferrina também foi descrito ⁽²⁵⁾ e os autores sugeriram que a migração do mesmo para o esmalte e/ou cimento poderia resultar na localização de uma proteína antibacteriana e uma antiinflamatória em sítios onde patógenos orais podem estar presentes.

Estudos prévios relataram que a expressão e/ou função de proteínas salivares estava alterada em indivíduos portadores de doença periodontal ⁽³⁹⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾. Neste contexto, a avaliação da concentração da MG2 na saliva de indivíduos apresentando doença periodontal associada à presença de *A. actinomycetemcomitans* foi realizada ⁽¹⁵⁾. Foi relatado que a produção de MG2 nos indivíduos com a infecção era no mínimo 3 vezes menor do que a encontrada nos indivíduos sem a doença. Baseado nestes resultados, os autores sugeriram que esta reduzida expressão desta mucina levaria a um aumento na susceptibilidade a infecções orais.

As características desta mucina salivar descritas acima demonstram sua importância como um componente do sistema imune inato presente na cavidade oral, e que a expressão da mesma se encontra reduzida em indivíduos com periodontite agressiva. Adicionalmente, diversos estudos evidenciam que oligossacarídeos presentes em mucinas atuam como receptores para microorganismos ⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾. Tendo em vista que a região das RTs da MG2 exibe uma alta concentração de oligossacarídeos, é possível que a mesma module a adesão de microorganismos a esta mucina.

MG2 é codificada pelo gene MUC7, localizado no cromossomo 4q13-q21 ⁽⁴³⁾⁽²⁷⁾ e a ocorrência de polimorfismo genético na região que codifica as RTs foi relatada previamente ⁽⁴⁴⁾. Um estudo que examinou a distribuição alélica para o polimorfismo do gene MUC7 (NVRT) entre pacientes asmáticos (alérgicos e não alérgicos) e não asmáticos (alérgicos e não alérgicos) de diferentes origens étnicas, descreveu que alelos codificando 5 e 6 RTs estavam presentes em todos os grupos, sendo que o alelo com 6 RTs foi o mais freqüente nas populações avaliadas ⁽²⁸⁾. A menor freqüência encontrada para o alelo 5 se deu no grupo dos indivíduos asmáticos, o que levou os autores a sugerirem que o este alelo (5 RTs) seria um possível fator protetor para a asma. Um estudo posterior confirmou estes resultados e indicou que a expressão do alelo com 5 RTs minimizaria o declínio da função respiratória associado ao aumento da idade ⁽⁴⁵⁾. Estas informações demonstram que a região das RTs mais longa (6 RTs) ou mais curta (5 RTs) da MG2 exibe atividades distintas.

Portanto, o presente estudo foi conduzido, no intuito de se comparar a distribuição desses mesmos alelos entre indivíduos com periodontite agressiva, crônica, e sem periodontite e avaliar se a presença de alelos específicos e, conseqüentemente, de uma proteína com um maior ou menor número de RTs poderia ser correlacionada às periodontites agressiva e/ou crônica. Assim como nos estudos anteriores ⁽²⁸⁾⁽⁴⁵⁾, os resultados do presente estudo revelaram que o alelo codificando 6 RTs foi o mais encontrado nos grupos avaliados. Não foram observados indivíduos homozigotos para o alelo codificando 5 RTs, possivelmente em razão do menor número de indivíduos incluídos no presente (n=177), visto que no estudo anterior somente 3 indivíduos numa amostra de 375 participantes apresentaram homozigose para esse mesmo alelo ⁽²⁸⁾.

Foram observadas diferenças nos percentuais dos genótipos 5-6 RTs (PA - 22,7%; PC - 11,7%; GC - 17,2%) e 6-6 RTs (PA - 77,2%; PC - 88,2%; GC - 82,7%) nos grupos avaliados, embora esta variação não tenha sido estatisticamente significativa. Esta ausência de correlação, dentro dos limites da amostra populacional avaliada, permite concluir que a diferente distribuição alélica e conseqüente variação na extensão da região das RTs da proteína expressada, não influencia na incidência e gravidade das periodontites.

Amostras de saliva representativas dos genótipos encontrados no presente estudo (4 MUC7 5-6 RTs e 4 MUC7 6-6 RTs) foram submetidas a experimentos de Western Blots, com o objetivo de se comparar possíveis diferenças na mobilidade eletroforética da MG2 em relação à variação do número de RTs. Os achados encontrados revelaram a ausência de padrões específicos para cada alelo, resultado similar ao descrito anteriormente ⁽²⁸⁾. Esse achado é derivado da heterogeneidade da glicosilação presente na molécula da MG2 e de outras mucinas, a qual acarreta na produção de moléculas com peso molecular distinto no mesmo indivíduo ⁽⁴¹⁾.

O número reduzido de indivíduos do grupo com periodontite agressiva avaliado no presente estudo é derivado da prevalência reduzida desta doença na população ⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾. É importante ressaltar que este estudo é o primeiro a avaliar a possível correlação entre o polimorfismo genético do gene MUC7 e a ocorrência e gravidade da doença periodontal. A análise dos resultados obtidos revelou ausência de associação entre a expressão diferenciada de RTs e as periodontites, indicando que a presença ou ausência de uma repetição em tandem contendo 23 aminoácidos e respectivas cadeias de oligossacarídeos ligadas a resíduos de serina e/ou treonina no mesmo, não influencia nas diversas atividades funcionais descritas para esta mucina salivar na cavidade oral, visto que algumas destas atividades também ocorram nas demais regiões da molécula. As periodontites são doenças complexas, por isso, estudos adicionais de possíveis interações entre fatores genéticos, ou outros que possam contribuir para aumentar a compreensão da etiopatogênese devem ser conduzidos.

REFERÊNCIAS

- (01) Beck JD, Offenbacher S. Oral health and systemic disease: periodontitis and cardiovascular disease. **J Dent Educ.**, 1998; 62: 859-870.
- (02) Armitage GC. International workshop for a classification of periodontal disease and conditions. **Ann Periodontol**, 1999; 4:1-6.
- (03) Flemming TF. Periodontitis. **Ann of Periodontol**, 1999; 4:32.
- (04) Potter RH. **Etiology of periodontitis**: the heterogeneity paradigm. Indianapolis: Oral Health Research Institute, Indiana University School of Dentistry, 1989.
- (05) Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine: a primer. **N Engl J Med**, 2002; 347:1512-1520.
- (06) Kornman KS, Duff GW. Candidate genes as potential links between periodontal and cardiovascular diseases. **Ann Periodontol**, 2001; 1:48-57.
- (07) Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in diabetic population. **J Periodontol**, 2003; 74:1183-1190.
- (08) Meisel P *et. al.* The interleukin-1 polymorphisms, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based. Ship study. **J. Dent. Res.**, 2003; 82:189-193.
- (09) Komatsu Y, Galicia JC, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping method. **Int J Immunogenet**, 2008; 35:165-170.
- (10) Holla LI, Musilova K, Vokurva J, Klapusová L, Pantuckova P, Kukletova M, Kukla L, Znojil V. Association of interleukin-6 (IL-6) haplotypes with plaque-induced gingivitis in children. **Acta Odontol Scand**, 2008; 66: 105-112.
- (11) Trevilatto PC *et. al.* Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a caucasian Brazilian population. **J. Clin. Periodontol**, 2003; 30:438-442.
- (12) Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara, M, Ueda M, Imai H, Ohura K. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. **Life Sci**, 2003; 73:3313-3321.
- (13) Gunes S, Sumer AP, Keles GC, Kara N, Koprulu H, Bagci H, Bek Y. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. **Indian J Med Res**, 2008; 127:58-64.

- (14) Jalil R A, Ashley FP, Wilson RF, Wagaiyu EG. Concentrations of thiocyanate, hypothiocyanite, 'free' and 'total' lysozyme, lactoferrin and secretory IgA in resting and stimulated whole saliva of children aged 12-14 years and the relationship with plaque accumulation and gingivitis. **J Periodontal Res**, 1993; 28:130-6.
- (15) Groenink J. et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. **J Clin Periodontol**, 1999; 26:269-275.
- (16) Fine DH, Furgang D, Beydouin F. Lactoferrin iron levels are reduced in saliva of patients with localized aggressive periodontitis. **J Periodontol**, 2002; 73:624-30.
- (17) Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. **Clin Oral Investig**, 2003; 7: 103-107.
- (18) Jentsch H, Sievert Y, Gocke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. **J Clin Periodontol**, 2004; 31:511-514.
- (19) Soares RV, Liu B, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. Structural characterisation of cysteines in a bacterial-binding motif of human salivary mucin MG2. **Arch Oral Biol**, 2002; 47:591-597.
- (20) Fisher SJ et al. External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. **Arch Oral Biol**, 1987; 32:509-517.
- (21) Gururaja TL et al. Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7). **Bioch Bioph acta**, 1999; 1431:107-119.
- (22) Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral *Streptococci* and exhibits candidacidal activity. **Biochem J**, 2000; 345:557-564.
- (23) Liu B, Rayment SA, Soares RV, Oppenheim FG, Offner GD, Fives-Taylor, P, Troxler RF. Interaction of human salivary mucin MG2, its recombinant N-terminal region and a synthetic peptide with Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Periodontal Res**, 2002; 37:416-424.
- (24) Biesbrock AR; Reddy MS; Levine MJ. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. **Infect Immun**, 1991; 59:3492-3497.
- (25) Soares RV, Siqueira CC, Bruno LS, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. **J Dent Res**, 2003; 82:471-475.

- (26) Gururaja TL, Ramasubbu N, Venugopalan P, Reddy MS, Ramalingam K, Levine MJ. Structural features of human salivary mucin, MUC7. **Glycocon J**, 1998; 15:457-467.
- (27) Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). **J Biol Chem**, 1993; 268:20563-20569.
- (28) Kirkbride HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash M W, Moss FM, Mitchell DM, Swallow DM. Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. **Eur J Hum Genet**, 2001; 9: 347-354.
- (29) Boom R, Sol CJ, Salimans MN, Jansen CL, Wertheim-van Dillen P M, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 1990; 28:495-503.
- (30) Rayment SA, Liu B, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF. Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. **J Dent Res**, 2000; 79:1765-1772.
- (31) Collins L M, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. **J Dent Res**, 1987; 66:1300-1302.
- (32) Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, Offner G, Troxler RF. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. **Arch Oral Biol**, 2004; 49:337-343.
- (33) Tabak L A. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins **Ann Rev Physiol**, 1995; 57:547-564.
- (34) Gibbons RJ. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. **Infect Immun**, 1988; 56:2990-2993
- (35) Levine MJ. Specificity of salivary-bacterial interactions: Role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 1978; 19:107-115.
- (36) Lightenberg AJ *et al.* Influence of saliva on aggregation and adherence of *Streptococcus gordonii* HG 222. **Infect Immun**, 1992, 60:3878-3884.
- (37) Stinson MW; Levine MJ. Modulation of intergeneric adhesion of oral bacteria by human saliva. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, 1993; 4:309-314.

- (38) Bergey EJ, Cho MI, Blumberg BM *et al.* Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. **J AIDS**, 1994; 7:995-1002.
- (39) Jalil RA, Ashley FP, Wilson RF, Wagaiyu EG. Concentrations of thiocyanate, hypothiocyanite, 'free' and 'total' lysozyme, lactoferrin and secretory IgA in resting and stimulated whole saliva of children aged 12-14 years and the relationship with plaque accumulation and gingivitis. **J Periodontal Res**, 1993; 28:130-6.
- (40) Veerman EC, Bank CM, Namavar F, Appelmelk BJ, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV Sulfated glycans on oral mucin as receptors for *Helicobacter pylori*. **Glycobiology**, 1997; 7:737-743.
- (41) Offner GD, Troxler RF. Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins. **Adv Dent Res**, 2000; 14:69-75.
- (42) Prakobphol A, Borén T, Ma W, Zhixiang P, Fisher SJ. Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. **Biochem.**, 2005; 44:2216-2224.
- (43) Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ. Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene MUC7. **Genomics**, 1996; 32:277- 282
- (44) Biesbrok AR, Bobek LA, Levine MJ. MUC7 gene expression and genetic polymorphism. **Glycoconj. J.**, 1997; 14:415-422.
- (45) Rosseau K, Vinall LE, Butterworth SL, Hardy RJ, Holloway J, Wadsworth, MEJ, Swallow DM. MUC7 haplotype analysis: results from a longitudinal birth cohort support protective effect of the MUC7*5 allele on respiratory function. **Ann Hum Genet**, 2006; 70:417-427.
- (46) Cortelli JR, Cortelli SC, Pallos D, Jorge AO. Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraíba. **Pesqui Odontol Bras**, 2002; 16:163-168.
- (47) López NJ, Ríos V, Pareja MA, Fernández O. Prevalence of juvenile periodontitis in Chile. **J Clin Periodontol**, 1991; 18:529-533.
- (48) Saxby MS. Juvenile periodontitis: an epidemiological study in the west Midlands of the United Kingdom. **J Clin Periodontol**, 1987; 14:594-598.

Legendas das Figuras

Figura 1 – Variação Alélica dos Produtos do PCR. Gel de poliacrilamida corado por Nitrato de Prata. 1, 3, 5-8 produtos 6-6 TRs; 2, 9 produtos 5-6 TRs; 4 padrão de DNA; TRs - repetições em tandem; pb - pares de base

Figura 2 – Mobilidade Eletroforética da MG2. Western blot exposto ao anti-MG2. 1, 3, 5, 7 amostras de indivíduos homozigotos (6-6TRs); 2, 4, 6, 8 amostras de indivíduos homozigotos (5-6TRs); TRs - repetições em tandem

Tabela 1. Distribuição das variantes alélicas das repetições em tandem do gene MUC7

	Periodontite Agressiva	Periodontite Crônica	Controle
Número de Indivíduos	22	68	87
5-6TRs	5	8	15
6-6TRs	17	60	72

*TRs – repetições em tandem; Controle – indivíduos sem periodontite

Figura 1. Variação Alélica dos Produtos do PCR

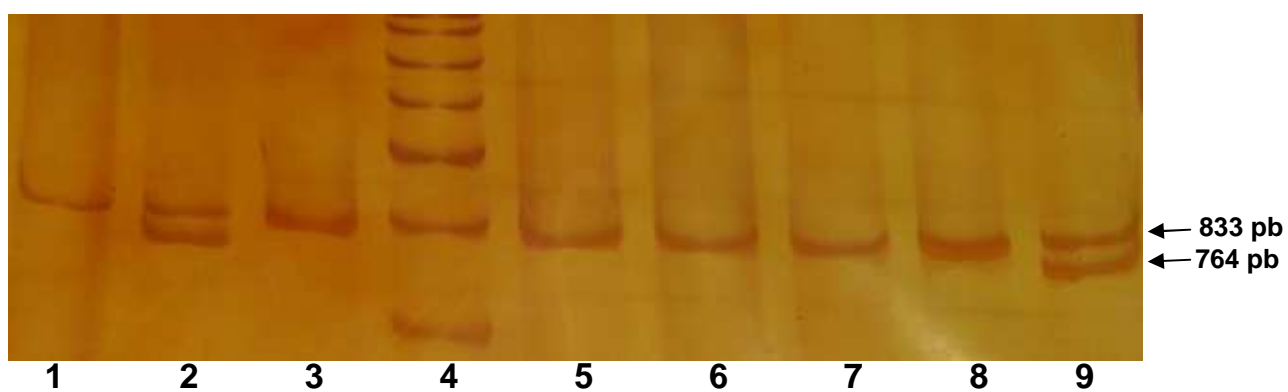
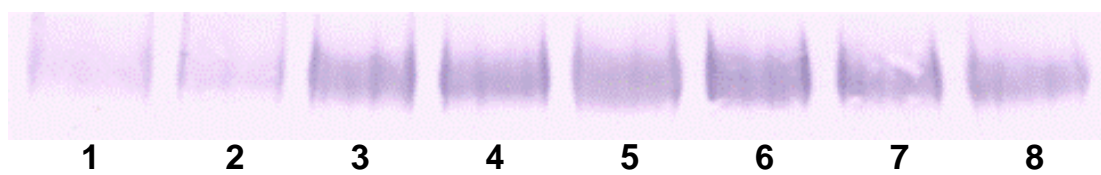


Figura 2 – Mobilidade Eletroforética da MG2.



ANEXOS

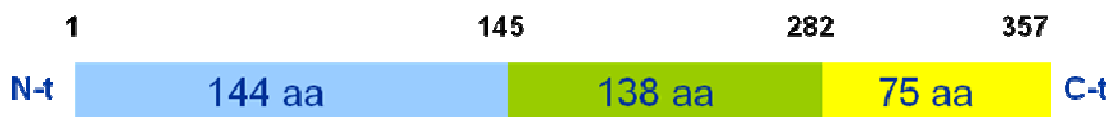
Anexo 1. Diagrama Estrutural da MG2

Anexo 2. Coleta e Processamento de Células da Mucosa Oral

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 1. Diagrama Estrutural da MG2

MG2



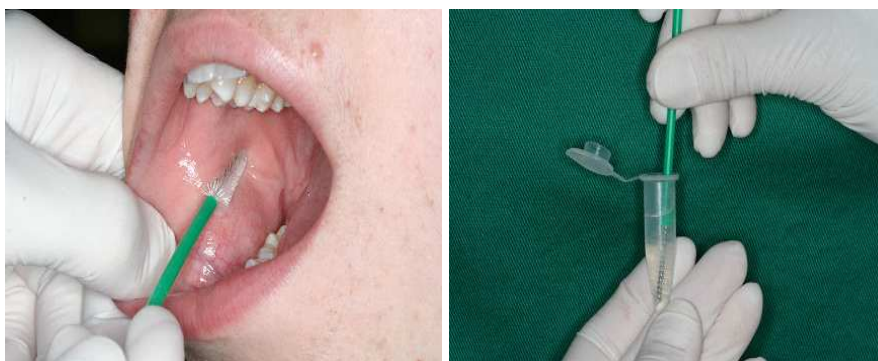
(145)

TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPPE
 TTAAPPTPSATTQAPPSSSAPPE
 TTAAPPTPPATTPAPPSSSAPPE
 TTAAPPTPSATTPAPLSSSAPPE
 TTAVPPTPSATTLDPSSASAPPE
 TTAAPPTPSATTPAPPSSPAPQE

(282)

As 3 principais regiões da MG2 (N-terminal, TRs e C-terminal) assim como o número de aminoácidos presentes nas mesmas estão ilustrados no diagrama acima. Aminoácidos específicos presentes nas 6 repetições em tandem também podem ser observados.

Anexo 2. Coleta e Processamento de Células da Mucosa Oral



Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

N.º Registro CEP: CAAE 0016.0.213.000-05

Título do Projeto: Análise da distribuição do polimorfismo genético do gene MUC7 em indivíduos com periodontite agressiva e crônica.

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

1) Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre a diferença da saliva nas pessoas com e sem problemas na gengiva. Vamos selecionar pessoas com e sem problemas na gengiva. Se decidir participar dela, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o seu papel nesta pesquisa.

Você foi selecionado porque é de um dos dois grupos (com problemas na gengiva ou sem problemas na gengiva) e, portanto, queremos examinar a sua saliva. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

É preciso entender a natureza e os riscos da sua participação e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

2) Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar se a saliva de pessoa que têm a gengiva inflamada é diferente da saliva de pessoas que não tem a gengiva inflamada.

3) Procedimentos do Estudo

Se concordar em participar deste estudo você será solicitado doar uma pequena quantidade de saliva (5 ml) e passaremos uma espátula macia na parte interna da sua boca. Depois de examinarmos a sua saliva e a de outras pessoas, vamos poder entender se a saliva de pessoas com problemas na gengiva é diferente da saliva de pessoas sem problemas na gengiva.

4) Riscos e desconfortos

Nesta pesquisa não existem riscos adicionais ao exame feito pelo dentista.

5) Benefícios

São informações relativas ao que deve ser descrito neste item:

- ✓ A participação na pesquisa não acarretará gasto para você, sendo totalmente gratuita. O conhecimento que você adquirir a partir da sua participação na pesquisa poderá beneficiá-lo com informações e orientações futuras em relação ao seu problema/tratamento e um melhor conhecimento dos fatores de risco sobre o tema, beneficiando-o de forma direta ou indireta.
- ✓ O tratamento poderá ou não trazer benefícios a você, mas as informações obtidas por meio do estudo poderão ser importantes para a descoberta de novos tratamentos/técnicas/tecnologia, capazes de diminuir os problemas existentes em relação ao objeto pesquisado.
- ✓ As consultas, os procedimentos relacionados ao estudo e a terapêutica utilizada serão inteiramente gratuitos.
- ✓ Se diagnosticado algum problema, este será tratado e/ou encaminhado para tratamento apropriado.

6) Tratamento Alternativo (se for o caso)

Não se aplica neste estudo.

Se você decidir não participar deste estudo, receberá o tratamento padrão para o seu problema/doença, de acordo com as normas desta instituição.

7) Custos/Reembolso

Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo e as consultas, os exames e todo tratamento serão gratuitos e também não receberá pagamento pela sua participação.

8) Responsabilidade

Não se aplica neste estudo.

9) Caráter Confidencial dos Registros

Algumas informações obtidas a partir de sua participação neste estudo não poderão ser mantidas estritamente confidenciais. Além dos profissionais de saúde que estarão cuidando de você, agências governamentais locais e o Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde o estudo está sendo realizado podem precisar consultar seus registros. Você não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este

consentimento informado, você autoriza as inspeções em seus registros, que será realizada na presença do pesquisador responsável e somente a pedido dos órgãos citados acima.

10) Participação

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ser examinado por um dentista e doar uma pequena quantidade de saliva e de células da mucosa oral

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 ou perda de benefícios aos quais você tenha direito de outra forma. Em caso de você decidir retirar-se do estudo, deverá notificar ao profissional e/ou pesquisador que esteja atendendo-o. A recusa em participar ou a saída do estudo não influenciarão seus cuidados nesta instituição.

11) 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.

Caso você tenha mais dúvidas sobre o estudo, por favor, ligue para a 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

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

12) 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 sobre os métodos do estudo a ser utilizado, das inconveniências, dos riscos, dos benefícios e dos eventos adversos que podem vir a ocorrer em

consequência dos procedimentos.

Declaro que tive tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra 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 e benefícios 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