



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DOUTORADO

Perfil da condição bucal de idosas do Distrito Federal.

Associação entre o polimorfismo genético da Interleucina-6 e do

Fator de Necrose Tumoral com doença periodontal

em pacientes geriátricos.

Aluna: Ana Maria Costa

Orientadora: Ana Cristina Barreto Bezerra

Brasília/ 2008

ANA MARIA COSTA

**Perfil da condição bucal de idosas do Distrito Federal.
Associação entre o polimorfismo genético da Interleucina-6 e do
Fator de Necrose Tumoral com doença periodontal
em pacientes geriátricos.**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Barreto Bezerra

**Brasília-DF
2008**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família: ao meu marido Pedro e aos meus filhos Maria Luísa e José Pedro pelo apoio e compreensão pelas horas preciosas em que fiquei distante para conclusão deste objetivo.

AGRADECIMENTOS

À minha família: marido, filhos, pais e irmãos, pelo companheirismo que me ajudou a conseguir concluir este trabalho com tranquilidade;

À Dra. Ana Cristina Barreto Bezerra, orientadora, pelos ensinamentos e pela confiança desde a minha formação na graduação e em todas as fases da pós-graduação;

Ao Dr. Otávio de Toledo Nóbrega, por ter assumido parte da orientação desta pesquisa e pela colaboração fundamental em todas as etapas do projeto;

Ao Professor Dr. Sérgio de Freitas Pedrosa, que, na época como Diretor do Curso de Odontologia da Universidade Católica de Brasília, ofereceu todo apoio necessário para o andamento do projeto;

À Professora Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães, pela amizade e profissionalismo, sempre disposta a contribuir com sugestões claras e precisas no decorrer do trabalho;

Ao Dr. Orlando Ayrton de Toledo, Dr. Lawrence Gonzaga Lopes e Dra. Érica Negrini Lia, pela honra em aceitarem em participar da Banca Examinadora;

À Professora Evelyn Michaela pela grande ajuda no tratamento estatístico dos dados deste trabalho;

Às pacientes idosas que aceitaram participar do projeto contribuindo diretamente com o desenvolvimento da pesquisa;

Aos alunos da Universidade Católica de Brasília que durante a realização do Estágio em Odontogeriatría prestaram ajuda valiosa na triagem e no tratamento das pacientes;

Por fim, agradeço a Deus, por atingir mais uma meta em minha vida.

EPÍGRAFE

*Entra pela velhice com cuidado,
Pé ante pé, sem provocar rumores
Que despertem lembranças do passado,
Sonhos de glória, ilusões de amores.*

*Do que tiveres no pomar plantado,
Apanha os frutos e recolhe as flores
Mas lavra ainda e planta o teu eirado
Que outros virão colher quando te fores.*

*Não te seja a velhice enfermidade!
Alimenta no espírito a saúde!
Luta contra as tibiezas da vontade!*

*Que a neve caia! o teu ardor não mude!
Mantém-te jovem, pouco importa a idade!
Tem cada idade a sua juventude.*

Bastos Tigre

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	07
LISTA DE TABELAS	08
RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	25
ARTIGO CIENTÍFICO 1	28
ARTIGO CIENTÍFICO 2 (Versão original na língua inglesa)	45
DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	63
COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS	
ANEXO A – Ficha Clínica/Anamnese	79
ANEXO B – Carta de aprovação do Artigo Científico 1	83
ANEXO C – Comprovante de encaminhamento do Artigo Científico 2	85
ANEXO D – Versão em português do Artigo Científico 2	87

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

C – Citosina

CPOD – cariados, perdidos e obturados (dente)

G – Guanina

IL-6 – Interleucina-6

LPS – Lipopolissacarídeo

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

TNF- α - Fator de necrose tumoral- alfa

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico 1 _____	28
Tabela 1 – Índice CPOD e seus componentes _____	35
Tabela 2 – Distribuição do percentual de edentulismo _____	36
Tabela 3 – Distribuição das idosas segundo o uso e a necessidade de prótese por arcada e tipo. _____	36
Tabela 4 – Distribuição das idosas segundo a condição da prótese (satisfatória ou insatisfatória) _____	37
Tabela 5 – Características periodontais das pacientes idosas: média da profundidade de sondagem clínica, média da perda de inserção clínica, média do índice de placa e média do índice gengival _____	38
Artigo Científico 2 _____	45
Table 1 – Mean values (SD) of clinical parameters of the three experimental groups _____	54
Table 2 – Distribution of the IL-6 and TNF- α genotypes in the healthy group and in groups with moderate and severe chronic periodontitis _____	54
Table 3 – Allele frequencies of IL-6 and TNF- α in the healthy group and in groups with moderate and severe chronic periodontitis _____	55
Table 4 – Genotype frequencies of the IL-6 and TNF - α according to the dominant model (GG vs GA+AA and GG vs GC+CC) in the healthy group and periodontitis (moderate-to-severe) group _____	56

RESUMO

Os trabalhos realizados no Brasil a respeito das principais afecções bucais dos gerontes mostram situação preocupante. O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil de saúde bucal de idosos do Distrito Federal e avaliar o papel do polimorfismo da interleucina-6 (G-174C) e do fator de necrose tumoral- α (G-308A) na severidade da doença periodontal crônica nesta população. Cento e quarenta pacientes do gênero feminino com idade igual ou superior a 60 anos foram examinadas. A condição de cada prótese foi avaliada observando presença de prejuízo estético ou funcional. Em seguida, foi realizado exame clínico para detectar presença de cárie, restaurações e dentes perdidos para cálculo do índice CPOD. O exame periodontal foi realizado em 65 pacientes e incluiu a verificação do índice de placa visível, índice de sangramento gengival, medidas de profundidade de sondagem clínica, perda de inserção clínica e mobilidade dental de todos os dentes presentes. O DNA destas pacientes foi isolado e a reação em cadeia da polimerase foi realizada. Os resultados revelaram péssimas condições bucais dos pacientes examinados. A taxa de edentulismo mostrou-se elevada, o índice CPOD foi alto (29,8) com predomínio do componente extraído (87,1%) e a condição periodontal foi considerada grave. Os dados mostraram diferença significativa na distribuição alélica e na frequência dos genótipos do gene da IL-6 entre pacientes com doença periodontal e controles. Os pacientes que apresentavam o genótipo G/G da IL-6 foram os mais severamente afetados pela doença. O polimorfismo do gene do TNF- α não mostrou associação estatística entre pacientes com periodontite e pacientes saudáveis. A partir destes dados concluiu-se que o perfil da condição bucal das idosas representadas neste estudo é precário. Os resultados sugerem também que o polimorfismo do gene da IL-6 pode ser associado à presença de periodontite crônica, contudo, o polimorfismo do gene do TNF- α não mostrou indícios de influência na progressão da periodontite crônica nesta população de mulheres idosas brasileiras.

Palavras-chaves: Idoso, Índice CPOD, Edentados, Periodontite, Fator de Necrose Tumoral, Polimorfismo, Interleucina-6

ABSTRACT

Data from Brazilian researches that evaluated oral health of elderly people show a worrisome situation. The purpose of this study was to check the oral condition of elderly residents in the Federal District and to evaluate the possible role of interleukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor (G-308A) polymorphisms in the severity of chronic periodontitis. One hundred and forty women aged 60 years or above were examined. The condition of each prosthesis was evaluated to detect the presence of functional or aesthetic damage. Then, clinical examination was carried out to detect the number of decayed, missing or filled teeth in order to calculate the DMFT index. The periodontal examination was conducted in sixty-five subjects and included the index of visible plaque, bleeding index, measurement of clinical probing depth, measurement of clinical attachment level and teeth mobility. DNA was isolated from those subjects, and polymerase chain reaction was used to study the IL-6 and TNF- α gene polymorphisms.

The results showed poor oral conditions of the patients. The rate of edentulism was high, the DMFT index was elevated (29.8) with a predominance of the extracted component (87.1%) and periodontal condition was considered severe. From these data we can conclude that the oral condition of elderly represented in this study is precarious. The results suggest that the interleukin-6 gene polymorphism may be associated with chronic periodontitis, and that TNF- α gene polymorphism may not be involved in the progression of chronic periodontitis in the population of elderly Brazilian women.

Key-words: elderly people, DMFT index, edentulism, periodontitis, tumor necrosis factor, polymorphism, interleukin-6

INTRODUÇÃO



Introdução

O envelhecimento populacional pode ser considerado um fenômeno mundial tendo em vista o ritmo de crescimento mais elevado do grupo etário acima de 60 anos quando comparado aos demais grupos, não só em países desenvolvidos, mas também naqueles em desenvolvimento⁶. O crescimento do contingente idoso deve-se a vários fatores, dentre eles, a diminuição da taxa de natalidade e fecundidade, o avanço na ciência com conseqüente possibilidade de tratamento de doenças, em especial, doenças infecto-contagiosas, melhoria nas condições de vida relacionadas a saneamento básico e acesso aos serviços de saúde a vários segmentos populacionais²⁰.

O efeito combinado da redução dos níveis da fecundidade e da mortalidade no Brasil resultou na transformação da pirâmide etária da população, sobretudo a partir de meados dos anos 1980. O formato tipicamente triangular, com uma base alargada, está cedendo lugar a uma pirâmide populacional característica de uma população em processo de envelhecimento de sua população. O envelhecimento populacional caracteriza-se pela redução da participação relativa de crianças e jovens, acompanhada do aumento do peso proporcional dos adultos e, particularmente, dos idosos²⁰.

Contudo, o aumento da população idosa representa desafios para a sociedade no âmbito social, político, econômico e principalmente, saúde. Este último aspecto pode ser considerado de grande importância visto que a maioria do segmento geriátrico apresenta ao menos uma doença crônica ou limitações de saúde³⁹. Este fato foi investigado por Ramos *et al.*³⁹ cujo estudo reportou que a maior incidência de problemas crônicos de saúde no Brasil é

conseqüência do envelhecimento populacional. Entretanto, ressaltaram que este fato pode representar demanda insuportável de indivíduos doentes para o sistema de saúde.

Em se tratando da saúde bucal, a realidade atual revela situação crítica que pode afetar a saúde geral e agravar a qualidade de vida dos gerontes ^{38,40,42}. Estudos sobre o impacto das condições bucais na qualidade de vida e no bem-estar do indivíduo idoso revelam que os aspectos funcionais, sociais e psicológicos são significativamente afetados por uma condição bucal insatisfatória ⁴.

Sob o ponto de vista epidemiológico, as pesquisas no Brasil voltadas para a saúde bucal do idoso são praticamente inexistentes. Os Levantamentos Epidemiológicos em Saúde Bucal realizados pelo Ministério da Saúde mostraram condições bastante críticas neste grupo etário ^{28,29}. Os dados mostraram índice CPOD elevado, alta taxa de edentulismo e condição periodontal precária.

A principal razão de extrações em grupos de adultos é a cárie dentária. De acordo com dados disponíveis em nível mundial, a cárie é o principal problema bucal dos indivíduos com sessenta anos ou mais ¹². Alguns fatores como a redução do fluxo salivar pelo uso de medicamentos, a dificuldade de higienização por problemas psico-motores e alteração da dieta, potencializam a ação da doença nessa população ³⁵. Contudo, cabe ressaltar que, em países subdesenvolvidos, a cárie dentária também é reflexo da falta de políticas preventivas de saúde destinadas a esta população ⁸.

Na literatura internacional os resultados de delineamentos epidemiológicos com pacientes gerontes variam bastante. Na Austrália, por

exemplo, o índice CPOD médio foi de 24,3 e a média de edêntulos foi de 47,1% ⁴³. Na Espanha, o CPOD encontrado foi de 21,8 e os pacientes edêntulos representaram 31% da amostra ⁴⁶. O Boletim da Organização Mundial de Saúde descreveu o perfil de saúde bucal de idosos na Europa, apontando que o índice de edentulismo variou de 12,8% na Itália até 60% na Dinamarca ³. A variação no índice de edentulismo tem explicação multifatorial, já que fatores ambientais, culturais, econômicos, sociais, além dos determinantes de saúde, podem interferir no enfoque de tratamento nas diferentes sociedades.

Muitos trabalhos indicam alta ocorrência de cárie de raiz em indivíduos idosos ^{7,19}. Segundo Ellen ¹¹, existem quatro categorias de variáveis que podem ser associadas como possíveis indicadores de risco a cárie radicular: biológicos, clínicos, comportamentais e sociais. Dentre os fatores biológicos encontram-se as contagens elevadas de estreptococos grupo *mutans* e lactobacilos na saliva, além do fluxo salivar reduzido e a baixa capacidade de tamponamento da saliva que contribuem para aumentar o tempo de remoção do açúcar da cavidade bucal. As variáveis clínicas incluem condições de saúde e doença que podem predispor um indivíduo à atividade cariiosa elevada ou criar o meio fisicamente seletivo, como, por exemplo, o uso de medicações xerostômicas.

As variáveis comportamentais incluem o consumo freqüente de carboidrato na dieta, práticas de higiene bucal abaixo da média e tabagismo. O fator social pode ser exemplificado pelas comunidades que vivem em locais com baixo nível de fluoreto na água de abastecimento e a falta de acesso a tratamento odontológico ¹¹.

Outra situação clínica é a exposição supragengival de superfícies radiculares, sendo considerado pré-requisito para a cárie radicular. Um dos fatores que pode levar à exposição é a perda de aderência e a recessão associada à doença periodontal ou a seu tratamento ¹.

Em se tratando da doença periodontal, poucos estudos brasileiros realizados com a população geriátrica referem-se à condição periodontal ^{40,42}. Observações resultantes de estudos longitudinais indicam de forma consistente que a sua ocorrência e extensão aumentam com a idade e com a higiene bucal inadequada ³⁴. O envelhecimento por si só não influencia diretamente na suscetibilidade do indivíduo em desenvolver a doença. Os efeitos cumulativos da doença no decorrer da vida podem explicar a maior prevalência da periodontite crônica em pessoas idosas ³⁴. Ademais, Papapanou ³³ ponderou que existe tendência de aumento da prevalência da doença à medida que há aumento da retenção de dentes em idosos, já que o alto índice de perda dentária pode mascarar a incidência de sítios afetados.

A doença periodontal crônica é de etiologia multifatorial. Aspectos microbiológicos, imuno-genéticos e ambientais estão ligados ao início e à modulação da doença. Porém, a resposta aos agentes etiológicos pode variar entre pessoas. Acredita-se que esta resposta pode ser influenciada pelo perfil genético do indivíduo ²². Atualmente, o enfoque das pesquisas está na identificação de polimorfismos genéticos que tem relação com aspectos imunológicos do hospedeiro.

Existem cerca de 20.000 a 25.000 genes no genoma humano. As diferentes formas de genes são determinadas por variantes alélicas ou alelos. Alterações genéticas podem ocorrer na região codificadora ou na região

promotora do gene, o que pode ocasionar modificações quantitativas ou qualitativas da proteína produzida ²⁴. Variações genéticas graves, as quais alteram significativamente a função da proteína, são denominadas mutações. São raras já que sua frequência está na ordem de 0,1% da população. Em contrapartida, o polimorfismo genético é caracterizado quando um alelo específico (alelo raro) ocorre em pelo menos 1% da população. O polimorfismo genético pode alterar a função da proteína sem, no entanto, impedir sua ação. Estas diferenças no funcionamento fisiológico das proteínas podem ser acentuadas por fatores ambientais, como por exemplo, o hábito de fumar. Se a proteína afetada está envolvida em processos biológicos, como a resposta inflamatória a certo agente antigênico, o polimorfismo pode aumentar ou diminuir o risco do indivíduo para diferentes fenótipos da doença ²¹.

A periodontite é considerada uma doença complexa. As doenças classificadas como complexas apresentam características comuns tais como evolução progressiva e crônica e são mais comuns na faixa etária adulta. Outros exemplos de doenças enquadradas como complexas são a doença de Alzheimer e algumas doenças cardiovasculares. As doenças complexas são poligênicas, ou seja, vários genes podem contribuir para a progressão e risco do processo patológico. As variações genéticas são consideradas fatores modificadores da doença. No caso da doença periodontal, pouco se sabe em relação aos genes que podem modificar seu curso. Cabe ressaltar que estas variações alélicas podem afetar o curso da doença, porém dependem de outros fatores tais como, fatores ambientais ²⁴.

Os polimorfismos de base única (SNPs) são os mais frequentemente estudados, especialmente os genes envolvidos no desencadeamento da

cascatas inflamatórias⁴⁷. A variação genética nos genes mediadores da resposta inflamatória e imunológica, como por exemplo, os genes que codificam as citocinas, pode ser fator de suscetibilidade e severidade à periodontopatia²⁵.

Citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que agem como mensageiras transmitindo sinais para outras células, e desta forma, atuam como reguladores positivos e negativos das respostas imunológica e inflamatória e da resposta de reparo do hospedeiro a lesões³². As citocinas podem ter efeitos múltiplos no crescimento e na diferenciação de muitos tipos de células e podem realizar funções que se sobrepõem e são interligadas. Por esta razão, forma-se uma complexa rede que regula a resposta do hospedeiro. Estas substâncias têm a habilidade de agir sobre a célula que as produziu, auto-estimulando sua própria produção e a produção de outras citocinas²¹.

Em se tratando das doenças gengivais, a produção de citocinas induz a resposta inflamatória no interior dos tecidos gengivais e, conseqüentemente, aparecem os sinais clínicos da doença periodontal. Segundo Taylor *et al.*⁴⁸, mediadores como as interleucinas e o fator de necrose tumoral têm papel relevante no início e na regulação da resposta inflamatória no periodonto.

A resposta inflamatória local nas periodontopatias é iniciada por inúmeros fatores de virulência bacterianos, como por exemplo, os lipopolissacarídeos⁴⁴. Estes fatores estimulam e amplificam a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, o fator de necrose tumoral α e as interleucinas. Os mediadores inflamatórios possuem primordialmente papel protetor contra patógenos, mas podem se tornar altamente destrutivos quando há alterações na quantidade destes mediadores. A resposta inflamatória aumentada na

doença periodontal eleva os níveis de citocinas, o que pode levar à severa perda de inserção e reabsorção óssea ⁴⁹.

De acordo com este conceito, a resposta imunológica inapropriada frente ao estímulo bacteriano leva a diferenças na suscetibilidade e severidade da periodontite. Os fatores que podem contribuir para a variação na resposta imunológica incluem idade, raça, gênero e predisposição genética ¹⁴. Segundo Michalowicz et al. ²⁶ estima-se que os fatores genéticos possam influenciar no aumento da suscetibilidade às periodontopatias em até 50%. As evidências do papel da genética na evolução da doença periodontal foram confirmadas após estudos com indivíduos gêmeos ²⁷. Neste estudo foi avaliada a contribuição dos fatores ambientais e genéticos em relação aos achados clínicos da doença periodontal em gêmeos adultos. Os resultados mostraram que a maioria dos achados clínicos da doença foi estatisticamente associada aos fatores genéticos.

Vários genes e suas variações alélicas são estudados e correlacionados com a doença periodontal. Dentre os principais, estão os genes que codificam o fator de necrose tumoral e a interleucina-6.

A interleucina-6 (IL-6) é bastante investigada por apresentar funções imunológicas importantes, como, por exemplo, participar da estimulação da diferenciação ou maturação que promove a capacidade de células ativadas da linhagem B a secretarem imunoglobulinas. Tem importante papel na proliferação de células T ³².

A literatura comporta evidências de associações da alta concentração desta citocina no soro e em outros fluidos biológicos com morbidades

representadas por doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatóide e osteoporose. Por esta razão, a IL-6 é considerada um dos principais mediadores da resposta inflamatória em processos crônicos e infecções. Devido a estas características, pesquisadores sugeriram que a IL-6 poderia ser utilizada como indicador da doença periodontal ⁵⁰.

Esta citocina tem sua síntese a partir de linfócitos T e B, monócitos, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos ^{5,32}. Uma variedade de estímulos induz a formação de IL-6. Em se tratando da doença periodontal, o estímulo preponderante é derivado das endotoxinas bacterianas, em especial o lipopolissacarídeo (LPS).

Na atualidade, acredita-se que polimorfismos na seqüência promotora do gene da IL-6 estão relacionados com alterações na produção deste mediador. Sugere-se que essas variações genéticas possam explicar a suscetibilidade a doenças, uma vez que podem vir acompanhadas pela elevação ou diminuição dos níveis séricos da substância. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na posição -174, com a mudança de bases G (guanina) para C (citosina) afeta a transcrição do gene, o que acarreta alteração nos níveis plasmáticos da IL-6 ⁵⁰.

Em estudo com população brasileira, indivíduos com o genótipo G/G foram estatisticamente associados ao aumento da suscetibilidade à doença periodontal. Os autores acreditam que a presença do alelo raro C confere fator de proteção contra a progressão da doença, já que resulta em menor expressão da IL-6 após estímulo a resposta inflamatória ⁵⁰.

Resultados similares foram reportados em recente estudo, o qual evidenciou forte relação entre sinais clínicos da doença periodontal e a

presença de polimorfismo no gene da IL-6 na posição -174, considerando o genótipo homozigoto (G/G) ⁴⁹.

Níveis elevados desta citocina foram encontrados em amostras de tecido gengival em sítios que exibiram doença periodontal, ao passo que em sítios com ausência de inflamação, a expressão da IL-6 mostrou-se significativamente reduzida ¹⁰.

Os estudos refletem relevante papel da inteleucina-6 na etiopatogenia da doença periodontal. Porém, a progressão das periodontopatias constitui processo complexo com interação de inúmeros fatores. Outras pesquisas são necessárias para confirmar a ação desta citocina na doença, neutralizando-se possíveis variáveis que possam representar viés nos resultados.

Outro importante candidato a estudos genéticos é o gene do fator de necrose tumoral α (TNF α). O TNF α é uma citocina pró-inflamatória que possui funções imuno-regulatórias, tais como, estimular a produção de outros mediadores que conseqüentemente amplificam a resposta inflamatória ^{5,51}. Esta citocina é produzida por monócitos/macrófagos nos estágios iniciais do processo inflamatório em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas subgengivais ²². O TNF- α é uma das citocinas mais estudadas em periodontia devido à sua capacidade de estimular a reabsorção óssea pelos osteoclastos e por promover a liberação de metaloproteinases que estão envolvidas na destruição da matriz extracelular de tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar. Desta forma, a produção aumentada de TNF- α pode desencadear resposta inflamatória exacerbada ¹³.

Indícios de correlação entre TNF- α e periodontite foram encontrados em estudo realizado por Górska *et al.* ¹⁷. A pesquisa investigou a relação entre o

nível de citocinas em pacientes com doença periodontal crônica e pacientes saudáveis. Elevada concentração de TNF- α e interferon γ foi detectada em biópsia de tecido gengival de pacientes com a doença. Segundo os autores, a alta produção de citocinas em pacientes com doença periodontal crônica pode ser reflexo da resposta inflamatória contínua de células T auxiliares contra a presença de patógenos no tecido gengival e pode indicar forte ativação de monócitos/macrófagos em sítios inflamados. A associação entre parâmetros clínicos da doença em grau avançado (perda de inserção periodontal severa e índice de sangramento elevado) e a alta concentração de mediadores inflamatórios foi um achado relevante. Os autores recomendaram o uso do nível de citocinas como teste laboratorial para detectar pacientes suscetíveis à doença periodontal.

O polimorfismo na região promotora do gene do TNF- α na posição -308 tem sido bastante pesquisado na literatura ^{13, 14, 45}. Este polimorfismo é principalmente relacionado à transição de guanina (G) para adenina (A). Porém, ainda não existe consenso se esta variação gênica exerce influência sobre a severidade da doença periodontal. Alguns estudos mostraram que não existem diferenças significativas entre grupos de pacientes doentes e sadios em relação à presença deste polimorfismo ^{13, 14}. Por outro lado, Galbraith *et al.* ¹⁶ encontraram associação positiva com a severidade da doença periodontal.

Estudo em população japonesa referiu que o polimorfismo do gene do TNF- α participou do estabelecimento da doença periodontal. A frequência de pacientes que apresentavam pelo menos uma variação alélica do gene do TNF- α foi significativamente maior entre os indivíduos com doença periodontal do que entre os saudáveis ⁴⁵. Contudo, este polimorfismo de nucleotídeo único

na posição -308 é raro na população japonesa. Desta forma, os polimorfismos associados à predisposição a doença periodontal na população estudada foram SNPs nas posições -1031/- 863 e -857. Este fato reflete a influência do fator étnico na prevalência de polimorfismos genéticos ⁴⁵.

A distribuição dos diferentes genótipos do TNF- α entre um grupo de pacientes com doença periodontal severa e um grupo saudável não mostrou diferença significativa em estudo realizado por Donati *et al.* ⁹. Contudo, a amostra caracterizou-se por aproximadamente 80% de genótipo homocigoto G/G em ambos os grupos. O alelo raro só apareceu em 20%, porém em heterocigotos. O homocigoto A/A não foi detectado em nenhum participante. A dificuldade em encontrar alelos raros na população dificulta a correlação estatística, já que o número de pacientes com estas características genéticas torna-se pouco representativa.

Devido aos resultados conflitantes relacionados ao polimorfismo do gene do TNF α , são necessários novos estudos para elucidar o seu real papel na severidade da doença periodontal.

Apesar da gama de estudos relacionados a polimorfismos genéticos e doença periodontal, não existem publicações específicas com pacientes idosos, o que se torna de fundamental importância já que existem peculiaridades relacionadas ao processo de envelhecimento que influenciam a resposta imunológica.

Existem estudos que mostram que o funcionamento do sistema imunológico no indivíduo idoso pode sofrer transformações, tornando-se menos eficiente ¹⁵. Muitas células com funções imunológicas podem exibir alterações relacionadas à idade, principalmente os linfócitos T. Uma explicação para este

fato é dada pela involução gradual sofrida pelo timo, o que provoca diminuição progressiva na capacidade geradora de linfócitos T ⁴¹.

Com relação aos linfócitos B, não foram observadas alterações significativas em termos de função e frequência numérica no sangue periférico de idosos. As modificações existentes estão relacionadas com as alterações sofridas pelos linfócitos T, já que estes auxiliam as células B em suas funções por meio dos efeitos de citocinas ¹⁵.

As citocinas, por serem importantes marcadores do processo inflamatório, também sofrem alterações durante o envelhecimento, possivelmente pela baixa proliferação das células T devido ao rompimento do equilíbrio entre a produção e a liberação destes mediadores. Em pessoas idosas as funções de resposta celular apresentam diferenças quando comparadas a pessoas jovens. Como exemplo destas modificações, a literatura mostra que mediadores como a interleucina-6, interleucina-1, fator de necrose tumoral- α e fator de crescimento e transformação podem exibir valores aumentados com o processo de envelhecimento. Por outro lado, a interleucina-2 mostra queda na produção em pessoas idosas ³¹.

Alguns autores explicam estas mudanças por meio de um fenômeno denominado *inflammaging*, termo que é utilizado para caracterizar um estado de atividade inflamatória basal ocasionado por agentes antigênicos crônicos ou por produção idiopática de citocinas. Este processo favorece o aparecimento de doenças crônicas no decorrer do tempo e é influenciado por fatores genéticos ³⁰.

Como pode ser observado, a população idosa apresenta aspectos do sistema imunológico que guardam divergência quando comparados aos jovens.

Estes aspectos nem sempre são considerados ao realizar estudos de correlação de polimorfismos genéticos e doença periodontal. São inúmeros os estudos encontrados na literatura que investigam esta associação. Entretanto, os resultados apresentam controvérsias e são conflitantes. Ademais, a maioria dos estudos utiliza amostra heterogênea em relação à idade e gênero, o que contribui para a disparidade nos resultados.

Tendo em vista a necessidade de se obter informações a respeito das principais afecções que acompanham o processo de envelhecimento e esclarecer aspectos relativos à etiologia e aos fatores determinantes destas afecções, este trabalho teve como objetivos traçar o perfil da condição bucal de idosas e correlacionar características periodontais com a presença de polimorfismos genéticos para os genes da interleucina – 6 (G-174A) e fator de necrose tumoral- α (A-308 G).

OBJETIVOS



OBJETIVOS GERAIS

- Descrever o perfil de saúde bucal de idosas do Distrito Federal;
- Correlacionar doença periodontal e polimorfismo genético dos genes da interleucina-6 e do fator de necrose tumoral em idosas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a prevalência de edentulismo, o índice CPOD e as condições periodontais de pacientes idosas;
- Avaliar a relação do polimorfismo de nucleotídeo único (C-G) localizado na posição -174 da região promotora do gene para interleucina-6 com doença periodontal crônica generalizada em pacientes idosas;
- Analisar a relação do polimorfismo de base única (A-G) encontrado na posição -308 da região promotora do gene para fator de necrose tumoral α com doença periodontal crônica generalizada em pacientes idosas.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo aprovado para publicação no periódico *Ciência e Saúde Coletiva*



Perfil da condição bucal de idosas do Distrito Federal

(Oral health status of elderly women from the Brazilian Federal District)

Ana Maria Costa ¹

Maria do Carmo Machado Guimarães ¹

Sérgio de Freitas Pedrosa ²

Otávio de Tolêdo Nóbrega ³

Ana Cristina Barreto Bezerra ⁴

¹ Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília. EPCT QS 7, lote 1 – Águas Claras, Brasília–DF, CEP 72030-170. Brasil.

² Curso de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900. Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Católica de Brasília.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

RESUMO

Os trabalhos realizados no Brasil a respeito das principais afecções bucais dos gerontes mostram situação preocupante. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência de edentulismo, analisar o uso e a necessidade de prótese, calcular o índice CPOD e verificar a condição periodontal de idosas residentes no Distrito Federal. Cento e quarenta mulheres com idade igual ou superior a 60 anos foram examinadas. A condição de cada prótese foi avaliada observando presença de prejuízo estético ou funcional. Em seguida, foi realizado exame clínico para detectar presença de cárie, restaurações e dentes perdidos para cálculo do índice CPOD. O exame periodontal incluiu a verificação do índice de placa visível, índice de sangramento gengival, medidas de profundidade de sondagem clínica, perda de inserção clínica e mobilidade dental de todos os dentes presentes. Os resultados revelaram péssimas condições bucais dos pacientes examinados. A taxa de edentulismo mostrou-se elevada, o índice CPOD foi alto (29,8) com predomínio do componente extraído (87,1%) e a condição periodontal foi considerada grave. A partir destes dados pode-se concluir que o perfil da condição bucal das idosas representadas neste estudo é precário o que reflete a necessidade de se elaborar programas de promoção de saúde e de reabilitação para este segmento da população.

Palavras-chaves: Idoso, Índice CPOD, Edentados

ABSTRACT

Data from brazilian researches that evaluated oral health of elderly people show an worrisome situation. The purpose of this study was to estimate the frequency of edentulism, analyze both the use and need profiles of prosthesis, calculate the DMFT index and check the condition of periodontal elderly residents in the Federal District. One hundred and forty women aged 60 years or above were examined. The condition of each prosthesis was evaluated to detect the presence of functional or aesthetic damage. Then, clinical examination was carried out to detect the number of decayed, missing or filled teeth in order to calculate the DMFT index. The periodontal examination included the index of visible plaque, bleeding index, measurement of clinical probing depth, measurement of clinical attachment level and teeth mobility. The results showed poor oral conditions of the patients. The rate of edentulism was high, the DMFT index was elevated (29.8) with a predominance of the extracted component (87.1%) and periodontal condition was considered severe. From these data we can conclude that the oral condition of elderly represented in this study is precarious and reflects the need for health promotion and rehabilitation programs for this segment of the population.

Key-words: elderly people, DMFT index, edentulism

INTRODUÇÃO

Levantamentos epidemiológicos são fundamentais para o estudo da distribuição de problemas de saúde na população e para a investigação dos fatores determinantes desta distribuição. Dados extraídos destes estudos possibilitam uma base para auxiliar a escolha das intervenções a serem implementadas em função da condição encontrada ¹.

Em se tratando do segmento da população com idade acima de 60 anos, estudos de prevalência são escassos. Segundo a Fédération Dentaire Internationale ², são consideradas idosas as pessoas com mais de 60 anos. O grupo de pessoas nesta faixa etária está crescendo de forma acelerada com o aumento da expectativa de vida da população ³.

Estima-se que 17% da população de países como Suécia e Japão apresentem idade superior a 65 anos. Já em países em desenvolvimento este índice declina bastante ³. No Brasil, a última pesquisa nacional de domicílios realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ⁴ revelou que 9,7 % dos indivíduos são idosos, o que equivale a aproximadamente 17,6 milhões de pessoas. Contudo, algumas pesquisas estimam que, com o elevado ritmo de crescimento deste grupo etário, no ano 2025 os idosos representarão 15% da população brasileira ⁵. Este fato evidencia a necessidade de maior preocupação com a saúde deste segmento etário tendo em vista que doenças crônicas que requerem cuidados continuados são aspectos que podem acompanhar o envelhecimento.

No país, a situação que se observa no perfil bucal do idoso é precária. Estudos da década de 90 revelaram que cerca de 65% dos idosos mostravam ausência de dentes ^{6,7}. Trabalhos mais recentes reportam menores taxas de edentulismo, porém as condições precárias na saúde bucal dos idosos quando se avalia o grande percentual de dentes extraídos no índice CPOD ainda são notórias ⁸.

A Odontogeriatrics é uma especialidade recente da Odontologia que surgiu a partir destas novas necessidades da sociedade atual relacionadas ao aumento da expectativa de vida da população ⁸. Todavia, a odontologia geriátrica deve estar inserida em contexto integral de atenção à saúde. Considerando a diversidade e a complexidade do idoso, a atuação de uma equipe multiprofissional torna-se essencial, na medida em que analisa e integra conhecimentos específicos de áreas distintas com a finalidade comum de promover e manter a saúde do idoso.

A Universidade Católica de Brasília (UCB-DF) vem desenvolvendo o *Projeto para Promoção da Saúde dos Idosos* que é composto por professores, estudantes e profissionais de diferentes formações profissionais (Nutrição, Farmácia, Medicina, Educação Física, Fisioterapia, Odontologia e Biologia), que pesquisam aspectos da senescência humana ^{9,10}. O projeto tem seu foco principal na saúde de mulheres idosas. A justificativa de gênero é embasada no fato do envelhecimento populacional ser marcado por maior longevidade entre mulheres ¹¹.

A partir deste acompanhamento integral da saúde de idosas do Distrito Federal foi observada a necessidade de se investigar o perfil da condição bucal dos indivíduos incluídos no projeto. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil de saúde bucal de idosas do Distrito Federal.

MÉTODOS

Descrição da amostra

O presente trabalho foi delineado como estudo transversal descritivo com finalidade de traçar perfil de saúde bucal de mulheres idosas, com ênfase na frequência de edentulismo, na condição periodontal e no índice CPOD dos sujeitos da pesquisa.

Esta pesquisa foi desenvolvida em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Gerontologia da UCB-DF como segmento do Projeto para Promoção da Saúde dos Idosos. A casuística foi composta por amostra de conveniência, formada por mulheres não-institucionalizadas constantes do banco de dados do Projeto, com idade igual ou superior a 60 anos, residentes na periferia do Distrito Federal, que atenderam a convite público para engajamento em projeto universitário envolvendo ações de promoção da saúde e acompanhamento ambulatorial voltadas ao controle da hipertensão arterial sistêmica realizadas entre os meses de abril de 2006 e dezembro de 2007 ¹². Desta forma, compôs-se um conjunto de regiões administrativas de procedência das idosas voluntárias, a saber: Candangolândia, Ceilândia, Núcleo Bandeirante, Recanto das Emas, Riacho Fundo, Samambaia e Taguatinga.

Quanto à condição sócio-econômica da população idosa participante, estudos prévios demonstraram que a frequência conjunta de indivíduos que não possuem educação formal ou que relatam ensino fundamental incompleto chega a mais de 60% deste segmento etário. Com relação à renda familiar mensal, aproximadamente uma em cada três dessas idosas apresenta renda igual ou inferior a um salário mínimo ^{13,14}.

A execução deste estudo seguiu critérios nacionais para pesquisa em seres humanos, estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, assim como pelo Código de Ética Profissional Odontológico, segundo Resolução CFO 179/91.

Todos os pacientes foram informados da natureza e objetivos da pesquisa e, após instrução e/ou leitura, foram convidadas a assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Procedimentos Clínicos

O exame clínico inicial foi conduzido com espelho plano bucal e iluminação com foco de luz em equipo odontológico. Nesta primeira etapa, as pacientes foram

examinadas para avaliar o uso e a condição da prótese, segundo critérios modificados de Colussi *et al.*⁸ : ausência total de dentes em um arco sem a presença de prótese; ausência dental de um ou mais elementos; presença de próteses com comprometimento estético e/ou funcional (próteses quebradas, mal adaptadas, associadas a lesões na mucosa, com desgaste excessivo, sem retenção); presença de próteses satisfatórias ou presença de todos os dentes sem a necessidade de prótese.

As pacientes que apresentavam dentes foram submetidas a exame radiográfico periapical (Ektaspeed, Eastman Kodak Co, Rochester, U.S.A.) pela técnica do paralelismo, e em alguns casos, exame radiográfico interproximal. Logo após, foi iniciado novo exame clínico para avaliar o índice CPOD. Este índice é composto pelos seguintes fatores: dentes cariados (C), perdidos (P) e obturados (O). O exame clínico seguiu critérios do Manual do Ministério da Saúde¹⁵ que considera o denteariado quando há evidência clínica de esmalte socavado, existindo uma cavidade definida com descoloração ou opacidade ao longo das margens. Nas superfícies proximais de dentes posteriores, o diagnóstico clínico foi complementado com exame radiográfico interproximal. O dente foi considerado “obturado” quando se observou a reconstituição da cavidade com material restaurador direto ou indireto. Dentes com lesão de cárie secundária foram classificados como cariados.

Em seguida foi realizada a avaliação periodontal de cada paciente a qual incluiu a análise da documentação radiográfica periapical, índice de placa visível¹⁶, índice de sangramento gengival¹⁶, medidas de profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e mobilidade dental de todos os dentes presentes¹⁷. As medidas de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica foram realizadas com sonda periodontal milimetrada estéril do tipo “Michigan 0” com marcações de Williams (Neumar, São

Paulo, SP, Brasil). As medidas foram realizadas em quatro sítios por dente: mesio-vestibular, disto-vestibular, lingual/palatina e vestibular.

O diagnóstico da condição periodontal foi baseado na perda de inserção clínica, conforme descrito por Armitage¹⁸. A severidade da doença em cada dente baseou-se no sítio de maior perda de inserção, caracterizado da seguinte maneira: periodontite leve: perda de inserção de 1 a 2 mm; moderada: 3 a 4 mm; severa: maior ou igual a 5 mm.

RESULTADOS

Foram examinadas 140 idosas com idade média de 69,8 anos. A faixa etária variou de 60 a 95 anos.

Índice CPOD

Os dados do CPOD e seus componentes encontram-se listados na tabela 1. A análise dos dados mostrou alto índice CPOD atingindo o valor de 29,8. A avaliação dos componentes evidenciou grande participação dos dentes extraídos (87,1%).

Tabela 1 – Índice CPOD e seus componentes

CPOD e seus componentes	N	%	Média
Cariado	158	3,8	1,1
Perdido	3640	87,1	26,0
Obturado	380	9,1	2,7
Total	4178	100,0	29,8

A prevalência de cárie de raiz foi de 19%, com maior frequência em caninos e pré-molares inferiores. Ao considerar as restaurações radiculares, a prevalência aumentou para 24%.

Uso e Necessidade de Prótese

O percentual de edentulismo para os arcos superior e inferior encontram-se na tabela 2. Os dados refletem altas taxas de edentulismo total, principalmente na arcada superior (75,8%).

Tabela 2 – Distribuição do percentual de edentulismo

Condição	Arco Superior		Arco Inferior	
	n	%	n	%
Edentada total	106	75,8	74	52,8
Desdentadas parciais	29	20,7	60	42,9
Arcada completa	5	3,5	6	4,3

Tabela 3 – Distribuição das idosas segundo o uso e a necessidade de prótese por arcada e tipo.

		ARCADA SUPERIOR		ARCADA INFERIOR	
		N	%	n	%
Prótese Total		104	74,3	66	47,1
PPR *		14	10,0	31	22,2
Prótese Fixa		4	2,8	0	0
Não usam	Indicado	13	9,3	37	26,4
	Não indicado	5	3,6	6	4,3
Total		140	100	140	100

* PPR – Prótese parcial removível

Em relação ao uso e necessidade de próteses, os resultados apontados na tabela 3 revelaram que a grande maioria de idosas usa algum tipo de prótese, sendo a prótese total a mais freqüente no arco superior (74,3%) e inferior (47,1%). Vale ressaltar que muitas idosas não utilizam prótese inferior (26,4%), apesar da necessidade e indicação.

Quando se analisa a tabela 4, pode-se observar que grande parte dos trabalhos reabilitadores encontra-se em condição insatisfatória, independente do tipo de prótese.

Tabela 4 – Distribuição das idosas segundo a condição da prótese (satisfatória ou insatisfatória)

		ARCADA SUPERIOR		ARCADA INFERIOR	
		n	%	n	%
Prótese Total	Satisfatória	30	21,4	24	17,1
	Insatisfatória	74	52,9	42	30,0
PPR*	Satisfatória	3	2,2	7	5,0
	Insatisfatória	11	7,9	24	17,1
Prótese fixa	Satisfatória	0	0	0	0
	Insatisfatória	4	2,8	0	0
Ausência de prótese		18	12,8	43	30,8
Total		140	100	140	100

* PPR – Prótese parcial removível

A condição da prótese foi avaliada em relação à presença de prejuízos estético-funcionais. Dentre os problemas detectados em portadores de próteses superiores, a presença de lesões hiperplásicas devido à câmara de sucção foi o mais freqüente (75%), seguindo-se do desgaste acentuado (60%), falta de retenção e/ou adaptação (20%) e

fraturas (18%). No caso da arcada inferior, o principal problema detectado foi a falta de retenção da prótese (70%). Cabe lembrar que o mesmo aparelho protético, em alguns casos, apresentava mais de um defeito estético e/ou funcional.

Condição Periodontal

Tabela 5 – Características periodontais das pacientes idosas: média da profundidade de sondagem clínica em milímetros, média da perda de inserção clínica em milímetros, média do índice de placa e média do índice gengival.

Características	Gengivite ou DP leve* (n=22)	DP Moderada a severa* (n=41)
Média sondagem (mm)	1,79	2,21
Média perda de inserção (mm)	0,75	5,63
Índice de Placa (%)	0,27	0,40
Índice Gengival (%)	0,23	0,67

*DP: Doença Periodontal

Ao se considerar a análise periodontal, a maioria das pacientes apresentou grau moderado ou severo da doença, com perda de inserção clínica elevada associada à presença de placa e sangramento gengival que indicam sinais clínicos da inflamação dos sítios analisados (tabela 5).

DISCUSSÃO

Os trabalhos que envolvem pesquisas epidemiológicas possuem relevância na medida em que fornecem dados sobre prevalência e severidade das doenças. Além disso, esclarecem aspectos relativos à etiologia e aos fatores determinantes do processo

¹. Em se tratando das afecções odontológicas que acompanham o processo de envelhecimento, são poucos os estudos que estimam prevalência de cárie, doença periodontal e edentulismo em indivíduos com idade acima de 60 anos.

No Brasil, o Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal ¹⁵, realizado em 1986, apesar de não contemplar a faixa etária acima de 60 anos, divulgou situação crítica no grupo etário de 50 a 59 anos de idade. Os dados deste levantamento revelaram CPOD médio de 27,2 para esta faixa etária, com 86% de participação dos dentes extraídos, refletindo uma condição oral severamente insatisfatória naqueles indivíduos que atingiram a terceira idade. Desta forma, os resultados encontrados na presente pesquisa refletem o cenário nacional na medida em que também registram alto índice CPOD e alta taxa de dentes extraídos (Tabela 1). Ademais, nossos resultados corroboram que a situação de saúde bucal da presente geração de idosos não apresentou melhora em relação à daquela considerada no estudo de 1986. Os dados do mais recente levantamento epidemiológico bucal realizado no Brasil (SB Brasil 2003 ¹⁹) confirmam o CPOD elevado da população idosa, cujo valor atingiu 27,7 no grupo etário de 65 a 74 anos. O componente perdido chegou a aproximadamente 93%, enquanto os dentes obturados corresponderam a menos de 3% dos idosos pesquisados. Estes dados, assim como os encontrados na presente pesquisa (tabela 1), refletem a falta de políticas preventivas de saúde destinada à população geriátrica para que este grupo mantenha seus dentes por toda a vida. Além disso, os dados retratam a falta de acesso a tratamentos restauradores pelos idosos, o que torna a extração o procedimento mais freqüente para solucionar casos de dor.

Estudo efetuado na região de São Paulo reportou que a condição bucal de pacientes idosos é crítica. O percentual de edêntulos indicou que mais da metade dos indivíduos perderam todos os dentes ⁶. Estes resultados são semelhantes aos aqui

encontrados (tabela 2). Sabe-se que a perda da dentição natural influi sobre diversos aspectos do organismo, dentre os quais o aspecto estético, a fonética e a função mastigatória. Estes problemas podem ser, em parte, solucionados pelo uso de prótese. Contudo, alguns estudos verificaram que o número de próteses insatisfatórias devido a problemas funcionais e/ou estéticos é elevado ²⁰. Além disso, segundo Frare *et al.* ⁷, a maior parte dos edêntulos não utiliza a prótese total inferior alegando desconforto com a mesma. Este fato foi constatado também pelo presente trabalho, que mostrou o grande número de trabalhos reabilitadores insatisfatórios (tabela 4) e também a não utilização de prótese inferior por inúmeros indivíduos (tabela 3), principalmente devido ao problema de retenção da mesma.

O grave problema relacionado à perda dentária que foi apontado na presente pesquisa pode estar relacionado à percepção dos idosos sobre sua saúde oral. Estudo realizado no Distrito Federal com pessoas da terceira idade institucionalizadas mostrou que a saúde oral é percebida com pouca importância entre os idosos. A perda dentária é vista como algo natural e conseqüente da idade. Os idosos adaptam-se às suas limitações e aprendem a conviver com as seqüelas das doenças por considerá-las normais ao processo de envelhecimento. Este fato reflete a ausência de orientação apropriada voltada para o envelhecimento saudável ²¹.

Outra condição freqüentemente apontada em trabalhos é a alta ocorrência de cárie de raiz em indivíduos idosos ^{8, 22, 23}. Estudo em população idosa japonesa reportou que 39% dos indivíduos apresentaram uma ou mais raízes cariadas ²², assim como o trabalho de Rihs *et al.* ²⁶, que encontrou taxa de 31,8% de lesões cariosas radiculares entre idosos de São Paulo. O registro de lesões de cárie de raiz verificado no presente estudo também se mostrou bastante alto. O aumento da freqüência de lesões cariosas na raiz tem etiologia multifatorial, mas a exposição supragengival de superfícies radiculares é

considerada pré-requisito para a cárie radicular. A exposição freqüentemente se deve à perda de aderência e à recessão associada à doença periodontal ou a seu tratamento ²⁴.

Em se tratando da doença periodontal, dados relacionados à idade acima de 60 anos são escassos, embora a severidade e extensão desta afecção aumente com a idade. O envelhecimento por si não implica maior suscetibilidade do indivíduo em desenvolver a doença periodontal, mas os efeitos cumulativos da doença no decorrer da vida podem explicar a maior prevalência da periodontite crônica em pessoas idosas ²⁵. Estudo realizado em Goiânia mostrou que 55% dos idosos institucionalizados exibiram presença de cálculo ²³. As condições periodontais encontradas por Rosa *et al.* ⁶ também foram severas. Nos idosos em domicílios, metade dos sextantes examinados necessitavam de tratamento complexo (raspagem radicular e/ou tratamento cirúrgico). Já nas pessoas examinadas nas instituições, este percentual mostrou-se mais elevado. Os resultados da presente pesquisa revelaram que grande parte das idosas dentadas apresentou doença periodontal crônica de grau moderado ou severo. Somente pequena parte da amostra obteve o diagnóstico de gengivite ou periodontite de grau leve confirmando a alta prevalência da doença neste grupo etário, conforme mostra a literatura.

O perfil precário de saúde bucal dos idosos foi confirmado pelo presente trabalho. Os escassos estudos com esta faixa etária revelam elevado índice CPOD, grande percentual de dentes extraídos, muitas necessidades protético-reabilitadoras e péssima condição periodontal. Urge a busca de novas estratégias de prevenção e controle do quadro atualmente instalado em indivíduos idosos. Sugere-se que ações específicas de saúde bucal para a terceira idade sejam inseridas o quanto antes nos programas de saúde já existentes a fim de estimular a manutenção de condições odontológicas saudáveis por toda a vida e para superar, ao menos em parte, o crítico cenário atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Pereira MG. Indicadores de Saúde. In: Pereira MG. *Epidemiologia teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 49-73.
- 2- Fédération Dentaire Internationale (FDI). *Oral needs of the elderly*. Commission on Oral Health. FDI Research and Epidemiology Working Group 5. Amsterdam: FDI; 1987.
- 3- Niessen LD. Geriatric dentistry in the next millennium: opportunities for leadership in oral health. *Gerodontology* 2000;17(1):3-7.
- 4- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, coordenação de trabalho e rendimento, pesquisa nacional por amostra de domicílios 2004-2005. Disponível em: <http://ibge.gov.br>
- 5- Barbosa AF, Barbosa AB. Odontologia geriátrica – perspectivas atuais. *J Bras Clin Odontol Int* 2002;6(33):231-34.
- 6- Rosa AGF, Fernandez RAC, Pinto VG, Ramos LR. Condição de saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no município de São Paulo. *Rev Saúde Pub* 1992;26:155-60.
- 7- Frare SM, Limas A, Albarello FJ, Pedot G, Régio RAS. Terceira idade: quais os problemas bucais existentes? *Rev Assoc Paul Cirur Dent* 1997;5(16):573-6.
- 8- Colussi CF, Freitas SFT, Calvo MCM. Perfil epidemiológico da cárie e do uso e necessidade de prótese na população idosa de Biguaçu, Santa Catarina. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7(1):88-97.
- 9- Karnikowski M, Córdova C, Oliveira RJ, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *São Paulo Med J* 2007;125(6):333-337.

- 10- Colares FCJ, Silveira SRP, Silva APR, Córdova COA, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Ferro, folato e vitamina B12 - análise da ingestão e ocorrência de anemia em idosas. *J Bras Med* 2008; 94, p.46 - 49, 2008.
- 11- Camarano AA, Kanso S, Mello JM. Como vive o idoso brasileiro? In: Camarano AA. *Os novos idosos brasileiros. Muito além dos 60?* Rio de Janeiro: IPEA, 2004.
- 12- Moraes CF, Souza ER, Souza VC, Medeiros EF, Gonçalves TF, Toledo JO, Karnikowski M, Gomes L, Karnikowski MG, Córdova C, Nóbrega OT. A common polymorphism in the renin angiotensin system is associated with differential outcome of antihypertensive pharmacotherapy prescribed to Brazilian older women. *Clin Chim Acta* 2008;396:70-5.
- 13- Bortolon PC, Medeiros EFF, Naves JOS, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Análise do perfil de automedicação em mulheres idosas brasileiras. *Rev C S Col* 2008; 13(4):1219-1226.
- 14- Nóbrega OT, Melo GF, Karnikowski MGO. Pattern of drugs prescribed for community-residing middle-aged and older adults from the outskirts of Brasilia. *Rev Bras Ciênc Farm* 2005;41(2):271-277.
- 15- Ministério da Saúde (MS). *Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal: Brasil, Zona Urbana*. Brasília: Divisão Nacional de Saúde Bucal, MS;1986.
- 16- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25(4):229-35.
- 17- Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodont Res* 2007;42:219-227.
- 18- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.

- 19- Ministério da Saúde (MS). *Condição de saúde bucal da população brasileira 2002-2003*. Brasília: Projeto SB Brasil 2003. Disponível em: <http://www.cfo.org.br>.
- 20- Colussi CF, Freitas SFT. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2002;18:1313-20.
- 21- Somchinda A, Fernandes FC. Saúde e qualidade de vida na terceira idade: uma introspecção dos idosos institucionalizados. (Monografia de especialização). Brasília (DF): Associação Brasileira de Odontologia – Curso de Especialização em Saúde Coletiva; 2003.
- 22- Imazato S, Ikebe K, Nokubi T, Ebisu S, Walls AW. Prevalence of root caries in a select population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil* 2006;33(2):137-43.
- 23- Reis SCGB, Higino MASP, Melo HMD, Freire MCM. Condição de saúde bucal de idosos institucionalizados em Goiânia-GO, 2003. *Rev Bras Epidemiol* 2005;8(1):67-73.
- 24- Beck J. The epidemiology of root surface caries. *J Dent Res* 1990;69:1216-1221.
- 25- Papapanou PN & Lindhe J. Epidemiologia das doenças periodontais. In: Lindhe F, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.49-73.
- 26- Rihs LB, Souza MLR, Wada RS. Prevalência de cárie radicular em adultos e idosos na região sudeste do estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2005; 21(1):311-316.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo encaminhado para avaliação ao periódico *Gerodontology*



**Interleukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor-alpha (G-308A) gene
polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis**

Costa AM¹

Guimarães MCM²

Nóbrega OT³

Bezerra ACB⁴

¹ Restorative Dentistry Division, Catholic University of Brasília, Brazil

² Periodontics Division, Catholic University of Brasilia, Brazil

³ Strictu Sensu Program of Gerontology, Catholic University of Brasília, Brazil

⁴ Strictu Sensu Program of Health Science, University of Brasilia, Brazil.

Gene polymorphisms and periodontitis

Corresponding author:

Ana Maria Costa

SQSW 305 Bloco L Apt. 201 – Sudoeste – Brasília – DF –

BRAZIL – CEP: 70673463

Tel: 55 61 81169526

e-mail: anam@ucb.br or amc@stj.gov.br

Key-words: periodontitis, tumor necrosis factor, polymorphism, interleukin-6, elderly

Abstract

Background and Objective: Periodontitis is a chronic inflammatory disease and genetic factors may have an important role in its severity. Polymorphism in the promoter regions of the interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) genes have been reported to cause changes in the production of these cytokines. The aim of this study was to evaluate the possible role of interleukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor (G-308A) polymorphisms in the severity of chronic periodontitis.

Methods: In this study, a group of 65 elderly women, comprising 17 patients with moderate chronic periodontitis, 21 with severe chronic periodontitis and 27 healthy patients were selected. DNA was isolated from all subjects, and polymerase chain reaction was used to study the IL-6 and TNF- α gene polymorphisms.

Results: The results of this study showed a significant difference in the allele and genotype frequencies of interleukin-6 gene polymorphism between patients with periodontal disease and controls. Subjects carrying the G/G genotype of IL-6 were most severely affected by periodontitis. The TNF- α gene polymorphism showed no association with chronic periodontitis between patients and controls.

Conclusion: The results suggest that the interleukin-6 gene polymorphism may be associated with chronic periodontitis, and that TNF- α gene polymorphism may not be involved in the progression of chronic periodontitis in the population of elderly Brazilian women.

Introduction

The genetic background of an individual may influence the susceptibility to several diseases and conditions. Periodontal disease, one of the most common chronic inflammatory diseases, caused by an overgrowth of specific Gram-negative bacteria in the periodontal pockets, is no exception (1). During recent years, the influence of genetic factors on the pathogenesis of periodontal disease has been evaluated. However, the exact role of these factors in susceptibility to periodontitis has not been elucidated (2).

Gene polymorphisms that encode molecules of the immunological system, such as pro-inflammatory cytokines, have been targeted as potential genetic markers for periodontitis (3). These cytokines play an important role in the initiation and amplification of the inflammatory response. The local inflammatory response in periodontal disease is initiated in the presence of several virulence factors derived from bacteria, such as lipopolysaccharides that stimulate the production of several cytokines (4). Differences in the rate of production of some cytokines may lead to the destruction of soft tissue and bone (2, 5).

The biological basis for the association between cytokine gene polymorphism and periodontal disease is that carriage of certain alleles of a cytokine gene is suspected to cause changes in the production of a given cytokine (2). Numerous studies suggest that the severity of periodontitis may differ in carriers of rare alleles of single cytokines, such as the A allele of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene and the C allele of interleukin-6 (IL-6) gene (1, 6, 7, 8, 9).

However, the question is: what are the arguments that explain why TNF- α and IL-6 gene polymorphisms can be good candidates for genetic studies in relation to periodontitis?

TNF- α is one of the most widely studied cytokines in periodontitis (1). It is a potent immunological mediator with pro-inflammatory properties. This cytokine has been found at high levels in gingival crevicular fluids and gingival tissues from affected sites in patients with chronic periodontitis, and it has the capacity to induce tissue destruction and increase bone resorption (7, 10). Polymorphisms in the promoter region of the TNF- α gene at position -308 (G to A) have been evaluated (5, 11, 12). The -308 A allele has been associated with high promoter activity and enhanced TNF- α production (7, 13). However, there are conflicting results on the functional relevance of this polymorphism; therefore further investigation in this area is necessary to confirm the association between the -308 G/A polymorphism and periodontitis.

Interleukin – 6 is involved in the pathogenesis of several inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and Alzheimer’s disease, therefore constituting an important mediator of the host response to injury and infection (8). Since this cytokine seems to have a key role in the development of chronic inflammatory diseases, some researchers have investigated the association between IL-6 polymorphism in the -174 promoter region and chronic periodontitis and have found interesting results (9, 14). Higher levels of IL-6 were found in sites with periodontal inflammation in comparison with non inflamed sites (15). In addition, genetic studies showed that the presence of the rare allele may represent a protective function since the carriage of the C allele decreases the production of the cytokine (9).

Despite the large number of genetic studies, many fail to determine the contribution of a particular polymorphism to disease risk. This failure is frequently

associated with environmental confounders that are not adequately neutralized. Variables such as the age of the subjects in cases and controls have to be matched. Ageing process is accompanied by a low-grade chronic, systemic inflammatory state that has to be considered since this phenomenon may influence the level of some cytokines (16).

Since the influence of the different genotypes of TNF- α and IL-6 genes in the periodontal disease is not fully established, especially in elderly population, the aim of this study was to investigate the possible association between gene polymorphisms of these two cytokines and chronic periodontitis in a highly homogenous population of Brazilian geriatric women.

Methods

The subjects of the present study were selected from a list of elderly women that participate in a research project of the Catholic University of Brasilia named the Elderly Health Promotion Project. Public invitations through mass communication networks were used to invite elderly women from the outskirts of Brasilia to join this Project, which involves health promotion actions and ambulatory follow-up. There are other reports of the project activities published elsewhere (17,18,19).

Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol was approved by the ethics committee of the Catholic University of Brasilia, Brazil.

All selected subjects were Brazilian women aged 60 years or older. They were submitted to anamnesis and to clinical and periodontal examination. The examination of each subject was conducted using a standardized periodontal evaluation procedure with

a Michigan-type “0” probe at four locations on each tooth (mesio-vestibular, disto-vestibular, lingual/palatine and vestibular).

The periodontal examination included the verification of clinical attachment loss, probing depth, supragingival plaque index (20) and bleeding on probing index (20). Clinical attachment loss was measured by simple probing and identifying the cemento-enamel junction and measuring the distance to the base of the pocket. Probing depth was the measurement of the distance from the soft tissue margin to the tip of the probe (21). All sites were dichotomously assessed for supragingival plaque (20) and bleeding on probing (20). Sets of periapical radiographs were obtained using a standardized parallel technique (Ektaspeed, Eastman Kodak Co, Rochester, U.S.A.).

The periodontal status of each subject was assessed on the bases of the amount of clinical attachment loss (22). The patients were divided into three different groups according to their periodontal status, as follows:

- Group 1 (control group): subjects with a high standard of oral hygiene, low gingival index and plaque index, without clinical loss of attachment and absence of bone loss as determined by radiographs. None of the control subjects had a history of periodontitis or tooth loss because of pathogenic tooth mobility.
- Group 2 (moderate generalized chronic periodontitis): Each patient had to present more than 30% of the sites with clinical attachment loss (≥ 3 mm) associated with the presence of clinical signs (bleeding on probing and plaque accumulation) and bone loss confirmed by radiographs.
- Group 3 (severe generalized chronic periodontitis): subjects having more than 30% of affected sites with clinical attachment loss (≥ 5 mm) associated

with the presence of clinical signs (bleeding on probing and plaque accumulation) and bone loss confirmed by radiographs.

Exclusion criteria included severe systemic disorder that would require antibiotic prophylaxis or would affect the periodontitis condition (diabetes mellitus, immunological disorders, hepatitis, human immunodeficiency virus infection), and patients who used systemic or subgingival antimicrobial agents or made chronic use of anti-inflammatory medication. All patients were nonsmoking.

Genotype identification

Total DNA was isolated from peripheral blood leukocytes according to standard procedures (23). The -174 G/C polymorphism in the promoter region of the human IL-6 gene (rs1800795) and the -308 G/A polymorphism in the promoter region of the human TNF- α gene (rs1800629) were determined by direct sequencing of a polymerase-chain-reaction (PCR) product.

Detection of the bi-allelic polymorphisms:

For IL-6 gene, a 628bp region was amplified using a pair of specific primers: 5'-GAACACAGAAGAACTCAGATGACTGG-3' (sense) and 5'-AGGAGTTCATAGCTGGGCTCCTGGAG-3' (antisense), which flank the polymorphism. Primers used for the TNF- α gene were the primer A (sense) 5'CCTCAAGCCTGCCACCAAGC 3' and primer B (antisense) 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3'. Each reaction tube contained 100 ng DNA, 10mM Tris-HCL pH 9.2, 25mM KCL, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 20pmol of each primer, 0.5 μ g of purified chicken albumin and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brasil) in a final volume of 50 μ l. After 1 minute of hot start

at 80 C° and initial denaturation of 2 minutes at 94 C°, the amplification was done for 36 cycles of 40 seconds at 94 C°, 45 seconds at 64 C° and 50 seconds at 72 C° followed by a final 5 minutes extension at 72 C°. Each PCR product was directly sequenced on a ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), using primer 5'- GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC- 3' for the IL-6 product and the afore-described primer A for the TNF- α . Each sequence obtained was examined using the Staden software package (MRC, Cambridge, UK) and confirmed by visual inspection (19).

Statistical analysis

Comparisons were made between genotype (Table 2) and allele frequencies (Table 3) in the disease and control populations and the significance of differences between the two groups was determined by chi-square analysis.

Due to the low numbers of homozygous individuals for the C allele of IL-6 gene and for the A allele of TNF- α (Table 2 and 3), the -308 A/A TNF- α and the -174 C/C Interleukin-6 genotypes were merged with the heterozygous subjects and the significance of difference was determined by Fisher's exact test (Table 4).

All data analysis was performed using SigmaStat for Windows Version 3.11 (Systat Software Inc., California, USA). For all statistical procedures the level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Mean values (\pm standard deviation) for the clinical parameters in the selected population are summarized in Table 1. DNA samples from 65 aged women were

analyzed for the G/C-174 polymorphism of the interleukin-6 gene and for the G/A-308 polymorphism of TNF- α .

Table 1 – Mean values (SD) of clinical parameters of the three experimental groups

<i>Clinical parameters</i>	<i>Group 1</i> <i>n=27</i>	<i>Group 2</i> <i>n=17</i>	<i>Group 3</i> <i>n=21</i>
Age	68.70 \pm 7.22	68.11 \pm 6.18	68.00 \pm 4.68
Probing depth (mm)	1.76 \pm 0.35	1.91 \pm 0.27	2.54 \pm 0.61
Attachment loss (mm)	0.0	3.64 \pm 0.49	7.71 \pm 1.30
Plaque (%)	0.25 \pm 0.15	0.28 \pm 0.12	0.52 \pm 0.30
Bleeding on probing (%)	0.28 \pm 0.14	0.63 \pm 0.35	0.73 \pm 0.26

Table 2 – Distribution of the IL-6 and TNF- α genotypes in the healthy group and in groups with moderate and severe chronic periodontitis

Genotypes	Group 1		Group 2		Group 3		p-value
	n	%	n	%	N	%	
TNF-α G/G	18	66.7	15	88.2	18	85.7	P=0.153
TNF-α G/A	6	22.2	0	0.0	1	4.8	
TNF-α A/A	3	11.1	2	11.8	2	9.5	
IL-6 G/G	12	44.4	15	88.2	16	76.2	P=0.019*
IL-6 G/C	12	44.4	2	11.8	5	23.8	
IL-6 C/C	3	11.2	0	0.0	0	0.0	

*Level of Significance at 5%.

Table 3 – Allele frequencies of IL-6 and TNF- α in the healthy group and in groups with moderate and severe chronic periodontitis.

Allele	Group 1		Group 2		Group 3		p-value
	n	%	n	%	N	%	
TNF-α G	42	77.8	30	88.2	37	88.1	P=0.285
TNF-α A	12	22.2	4	11.8	5	11.9	
IL-6 G	36	66.7	32	94.1	37	88.1	P=0.002*
IL-6 C	18	33.3	2	5.9	5	11.9	

*Level of Significance at 5%.

A significant difference was found in the IL-6 genotype distribution between the patients and control group (Table 2). The proportion of individuals carrying the IL-6 G allele was significantly higher in the group of patients with moderate or severe periodontitis (Table 3). No significant differences were found for the TNF- α genotype distribution or the carriage rate frequencies (Table 2 and 3).

When analyzing Table 4, according to this dominant model (GG vs GC+CC) related to IL-6 gene, G homozygous subjects were significantly more affected by periodontal disease than individuals who carry the C allele. On the other hand, for TNF- α , G homozygous subjects showed no statistical difference when compared with A homozygous and heterozygous subjects (Table 4).

Table 4 – Genotype frequencies of the IL-6 and TNF - α according to the dominant model (GG vs GA+AA and GG vs GC+CC) in the healthy group and periodontitis (moderate-to-severe) group

Genotype	Healthy		Moderate-to-severe		p-value
	n	%	n	%	
TNF GG	18	66.7	33	86.8	P=0.069
TNF GA+AA	9	33.3	5	13.2	
IL-6 GG	12	44.5	31	81.6	P=0.003*
IL-6 GC+CC	15	55.5	7	18.4	

*Level of Significance at 5%.

Discussion

This study investigated the frequencies of two single nucleotide polymorphisms (interleukin-6 -174G/C and tumor necrosis factor- α -308G/A) in elderly women and evaluated their correlation with periodontal conditions. Although several authors have reported the association between polymorphism and periodontal disease, an insufficient number of studies have recognized confounding factors and considered the importance of environmental factors in the categorization of cases and controls.

A criticism that arises in the association studies of periodontal disease is the variation in the literature with respect to disease definition and classification. Additionally, there are many differences as regards that which is defined as a case and that which constitutes a control in periodontitis studies. The present study carefully defined and classified periodontal disease in accordance with the American Academy of

Periodontology Workshop (22). The clinical parameters of the sample of the present study can be analyzed in Table 1. It is important to emphasize that the healthy group did not show clinical attachment loss, whereas the disease groups revealed a high level of clinical attachment loss associated with the presence of clinical signs of periodontal disease, such as a high bleeding on probing index and plaque accumulation confirming disease activity.

Other complications are related to environmental exposures such as smoking, oral hygiene, systemic disease, or general factors (e.g. socioeconomic status, age, and gender) since they have a large influence on the expression of the phenotype (2). The sample in the present study was uniform since cases and controls had similar characteristics. All participants were Brazilian elderly women, with low socioeconomic status (17, 18), and nonsmoking. These definitions make comparisons across groups more valuable.

It is recognized that an age-related increase in IL-6 serum level takes place among individuals beginning as early as 30-40 years of age, being prevalent despite any chronic disorder condition and becoming prominent in later life (24, 25). Some authors explain this condition as a phenomenon called *inflammaging*, which is used to characterize an inflammatory basal activity that is caused by chronic antigenic agents or by an idiopathic production of cytokines (16, 25). For this reason, it can be observed that the geriatric population displays immunological features that have to be considered. Therefore, the age stratum may become an important confounding factor. In the present study, cases and controls were 60 years-old or older.

The main finding of the present study was that the -174 G/G genotype of IL-6 was statistically associated with moderate-to-severe periodontal disease after controlling confounding factors (Table 2 and Table 4) Tervonen et al. (14) found an evident

association between the G/G genotype of IL-6 and clinical signs of chronic periodontitis in a Caucasian population in Finland, whereas Trevillato et al. (9) reported similar findings in a Brazilian population. This genetic association with the status of periodontitis is consistent with observations made in the present investigation. The results of the present study also corroborate a statement mentioned by Trevillato et al (9), which emphasized that the presence of the C allele may represent a protective function, since it may reduce IL-6 production. The findings of the present study revealed that carriers of the C allele were significantly less affected by periodontal disease when compared with carriers of the G allele (Table 3).

Despite numerous reports on the role of TNF- α in the pathogenesis of periodontal disease (26, 27), in the present study there was no significance difference between genotypes of TNF- α in the groups (Table 2 and Table 4). The A allele carriage rate for the TNF- α polymorphism among the periodontitis patients did not differ from that of the control group (Table 3). The lack of association of the TNF- α gene polymorphism with periodontitis in Brazilian women found in the present study is in line with other studies that reported that genetic polymorphism in the TNF- α gene at position -308 could not be identified as susceptibility or severity factors in periodontitis (11, 12, 28, 29). In contrast, Galbraith et al.(30) found that periodontitis patients carrying the rare allele at position -308 of the TNF- α gene had higher TNF- α production than the non-carriers. However, in a preceding study, the same authors were unable to detect significant differences in the distribution of TNF- α -308 genotypes, although levels of TNF- α were found to be higher in periodontitis patients with the uncommon allele (27). The contradictory findings could be attributed to the differences of size and choice of subjects and due to the effect of smoking and gender.

The present study has some limitations. Being a study conducted with an elderly female casuistic, the authors could not extrapolate conclusions to male or younger individuals because literature has demonstrated significant gender and age influence in genetic studies (2). Another factor that must be considered is that the present research was not designed as a longitudinal investigation. Therefore the results should be analyzed with caution. Longitudinal studies with patient follow-up must be conducted to confirm the findings of the present study.

It is important to point out that the present study is the first investigation on whether the IL-6 promoter variants are linked to periodontal disease in an elderly population. Large epidemiological studies have demonstrated an increase in the prevalence and severity of periodontal attachment loss with increasing age (31). Thus, the identification of candidate genes is relevant since it may result in new diagnostic techniques for risk assessment, early detection and individualized treatment approaches (8).

In conclusion, based on the findings of the present study and on the available literature, there are limited data to support associations between TNF- α gene polymorphism at position -308 and periodontitis. On the other hand, the assessment of IL-6 gene polymorphism at position -174 revealed that genotype G/G was significantly associated with chronic periodontitis in elderly Brazilian women. These findings suggest that the G allele may play an important role in the progression of periodontal disease in this population.

References

- 1- Takashiba S & Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006;**40**:94-106.
- 2- Kinane DF, Shiba H, Hart T. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2005;**39**:91-117.
- 3- Kornman KS, Crane A, Wang HY et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:72-77.
- 4- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M A, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;**25**:134-144.
- 5- Donati M, Berglundh T, Hytönen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 474–479.
- 6- Taylor, JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;**35**:158-182.
- 7- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32**(Suppl. 6):159-179.
- 8- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:102-132.
- 9- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SRP. 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.
- 10- Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K: Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 463–469.
- 11- Fassmann A, Izakovicova Holla L, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252 (A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G) tumor necrosis facto-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodont Res* 2003;**38**:394-399.

- 12- Folwaczny M, Glas J, Török HP, Mende M, Folwaczny C. Lack of association between TNF α G-308A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; **31**:449-453.
- 13- Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF α) -1031/ -863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:524-531.
- 14- Tervonen T, Raunio T, Kanuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2007;**34**:377-383.
- 15- Duarte PM, de Oliveira MCG, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Overexpression of interleukin-1 β and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodont Res* 2007;**42**:377-381.
- 16- Giunta S. Is inflammaging an auto(innate) immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing* 2006;**3**:12.
- 17- Karnikowski M, Córdova C, Oliveira RJ, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *Sao Paulo Med J* 2007;**125**:333-337.
- 18- Bortolon PC, Medeiros EFF, Naves JOS, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Analysis of the self-medication pattern among Brazilian older-adult women. *C S Col*, 13(4):1219-1226.
- 19- Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, Gomes L, Karnikowski MGO, Córdova C, Nóbrega OT. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. *Braz J Med Biol Res* 2008;**41**(1):47-53.
- 20- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;**25**(4):229-35.
- 21- Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodont Res* 2007;**42**:219-227.
- 22- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1-6.

- 23- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:1215.
- 24- Myliwska J, Bryl E, Foerster J, Myliwski A. Increase of Interlukin 6 and decrease of interleukin 2 production during aging process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev* 1998;**100**:313-328.
- 25- Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Bonafe M, Monti D, Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev* 2003;**2**(4):419-432.
- 26- Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:1046-1052.
- 27- Galbraith, GM, Steed, RB, Sanders, JJ & Pandey, JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998;**69**: 428–433.
- 28- Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG: Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 28–34.
- 29- Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006; **33**: 765–770.
- 30- Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; **26**:705-709.
- 31- Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; **29**:177-206.

DISCUSSÃO COMPLEMENTAR



Discussão Complementar

Tanto as mudanças fisiológicas que ocorrem no processo de envelhecimento como os processos patológicos associados a determinados problemas sociais contribuem para a ocorrência de problemas bucais. A presença de múltiplas patologias, uso de drogas, limitações funcionais além de alguns fatores ambientais tornam o idoso um indivíduo com peculiaridades que devem ser levadas em consideração durante o tratamento das afecções bucais¹².

Na primeira parte da presente pesquisa foi observado que o perfil de saúde bucal das idosas do Distrito Federal encontra-se em situação alarmante, resultado que está em conformidade aos dados encontrados na literatura (dados que podem ser confirmados no corpo do artigo 1). A alta taxa de edentulismo total reflete cenário epidemiológico brasileiro precário. Quando o edentulismo se faz presente é porque as medidas de atenção à saúde bucal inexisteram ou fracassaram. Neste contexto, as condições críticas de saúde bucal aliadas à tendência de aumento da população idosa suscitam melhorias na atenção e assistência à saúde bucal.

A importância em se conhecer a magnitude dos problemas bucais da população brasileira, por meio de trabalhos como este, está ligada à possibilidade de estabelecer políticas apropriadas de intervenção e promoção de saúde, o que poderia contribuir para melhoria da qualidade de vida destes pacientes, além de alertar profissionais da área para a necessidade de conhecimento específico e habilidade para o atendimento deste grupo de indivíduos.

A etapa seguinte do presente trabalho referiu-se ao estudo de correlação entre polimorfismo genético e a presença de doença periodontal em uma população feminina e idosa. Enfatizou-se, neste estudo, a importância de se investigar de forma cautelosa esta parcela da população tendo em vista as evidências relacionadas à presença de uma taxa basal de inflamação, caracterizada principalmente pela alteração na produção de mediadores inflamatórios durante o processo de envelhecimento^{18,30}. Contudo, o processo inflamatório pode ser influenciado também por variações genotípicas, que foram objeto de estudo deste trabalho. Importantes resultados mostraram que o polimorfismo na região promotora do gene da Interleucina-6 na posição -174 (G/C) foi associado positivamente à severidade da doença periodontal. Em contrapartida, o polimorfismo de nucleotídeo único do gene do TNF (G/A) não mostrou correlação com a doença periodontal.

Frente a estes achados, são necessárias algumas considerações mais detalhadas relacionadas à amostra.

1. Critérios de Exclusão:

No trabalho de correlação foi necessária a utilização de diversos critérios de exclusão. A amostragem inicial foi de 152 pacientes idosas. No entanto, ao final do processo de triagem, o número de idosas foi finalizado em 65 pacientes que preencheram todos os requisitos. Foram excluídas pacientes que apresentavam edentulismo total, já que não foi possível pesquisar de forma objetiva as causas das extrações. Das pacientes dentadas e parcialmente dentadas, foram incluídas na amostra somente aquelas que apresentavam periodonto saudável ou com gengivite para constituir o grupo controle, e

periodontite generalizada moderada a severa para compor os grupos de estudo.

Pacientes que apresentavam periodontite localizada de graus leve, moderado e severo; periodontite generalizada leve, periodontite como manifestação de doença sistêmica ou periodontite agressiva foram excluídas da análise. Outra causa de exclusão foi a presença de número de dentes inferior a seis ². Indivíduos que faziam uso contínuo de medicamentos antiinflamatórios também foram excluídos devido ao potencial destas drogas em interferir nos valores dos marcadores investigados. Durante a anamnese, idosos que referiram doenças sistêmicas ou fatores ambientais que pudessem interferir na progressão da doença periodontal, tais como, diabetes, AIDS, tabagismo, dentre outras, também não foram incluídas na pesquisa. Pacientes que realizaram tratamento periodontal nos últimos seis meses foram eliminadas da amostra pela possibilidade de mascarar o quadro da doença presente no decorrer do estudo.

Tendo em vista o grande número de fatores de exclusão que foram considerados essenciais para evitar viés de seleção, o “n” final da amostra tornou-se reduzido, sem, contudo, afetar o potencial estatístico dos resultados.

2. Limitações do estudo:

Além da amostra reduzida, outros fatores devem ser considerados como limitadores. O fato de o estudo ter delineamento transversal e não longitudinal dificulta a possibilidade de se confirmar a relação causa-efeito entre o polimorfismo dos genes estudados como determinantes para o desenvolvimento da doença periodontal.

O estudo transversal indica se existe associação entre exposição e doença, na população investigada, em determinado momento; ou seja, se naquele momento específico, no grupo de pessoas expostas ao fator de risco é também encontrado maior número de doentes ou vice-versa. Em outros momentos, pode ser que a associação entre os eventos seja diferente. Assim sendo, tais resultados devem ser interpretados com cautela ^{36,37}.

O estudo longitudinal ou de coorte, por outro lado, é uma pesquisa que determina primeiro a causa e depois o efeito. O pesquisador toma conhecimento, detecta ou observa a exposição nas pessoas que serão objeto de acompanhamento, antes de ocorridos os desfechos clínicos; a vigilância subsequente informa sobre a incidência destes efeitos. É uma investigação que segue o curso natural dos acontecimentos: da causa em direção aos efeitos ^{36,37}, o que torna a avaliação mais confiável a longo prazo.

Em face da dificuldade em inferir relação causal a partir de estudo transversal, no presente estudo foram utilizadas alternativas metodológicas para se aproximar às características do estudo longitudinal, entre as quais, a utilização de dados retrospectivos com a inclusão de questionário de saúde e de sinais clínicos que permitiram avaliar os efeitos cumulativos da doença periodontal. Além disso, a neutralização de inúmeros tipos de viés de confundimento assegurou maior validade dos resultados. Por exemplo, a restrição de categorias, que tratou da escolha de somente determinado segmento a população, com alto grau de homogeneidade, para serem incluídos na amostra a ser investigada: foi o caso de selecionar somente um gênero ou uma faixa etária. Desta forma, estes dois fatores, gênero e idade, foram controlados e não tiveram influência nos resultados. Este fato também

contribuiu para a formação de grupos (teste e controle) homogêneos, diferentes em apenas um fator: a doença periodontal.

Outra limitação do presente estudo foi a impossibilidade de mensurar diretamente o efeito da variável relacionada à estrutura e à composição da placa bacteriana nos sítios avaliados. Embora seja fator com influência direta sobre a progressão da doença periodontal, este exame microbiológico não foi realizado. Contudo, as análises clínicas aqui utilizadas permitiram inferir o papel da placa bacteriana como importante agente etiológico, tendo em vista que o índice de placa e o índice de sangramento aumentaram com a severidade da doença. A tabela com estes dados pode ser conferida no corpo do artigo presente nesta dissertação (Tabela 1 - Artigo 2).

Outra co-variável de difícil controle foi a possibilidade da interferência do trauma oclusal como fator colaborador na severidade da doença periodontal. As pacientes do estudo apresentavam condição protética precária ou ausência de dentes sem a correta reabilitação. Devido às dificuldades relacionadas ao custo e ao tempo, o tratamento prévio destes problemas não foi realizado. A neutralização deste efeito foi realizada excluindo-se da análise os sítios em que se observou perda óssea severa associada ao trauma oclusal. Situações semelhantes ocorreram em sítios próximos às regiões edêntulas, em que se notou perda de inserção aumentada devido à reabsorção provocada pela ausência do dente adjacente e não devido aos fatores etiológicos da doença periodontal. Estes sítios também foram excluídos da análise.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS



Considerações Finais

Em se tratando da primeira etapa da presente pesquisa, o perfil de saúde bucal do idoso encontrado mostrou-se precário com necessidade urgente de se alterar o quadro instalado. Estes achados são relevantes já que inexistem artigos publicados com ênfase na saúde bucal da população idosa do Distrito Federal.

Em relação à segunda fase do presente trabalho baseada em análises genéticas, pode-se considerar que este estudo consistiu na primeira investigação, considerando a população idosa, sobre as variações na região promotora dos genes da interleucina-6 e do fator de necrose tumoral e sua relação com doença periodontal. O ineditismo da presente pesquisa encontra-se na possibilidade de considerar os possíveis distúrbios do envelhecimento nas análises realizadas. Resultados relevantes foram encontrados que mostraram indícios de que a presença do alelo raro C no gene da interleucina-6 pode apresentar função protetora contra a doença periodontal. Por outro lado, nesta população específica e homogênea, a influência do polimorfismo do gene do TNF na progressão da doença periodontal não pôde ser confirmada.

A importância dos estudos genéticos em periodontia refere-se a possibilidade de se detectar precocemente grupos de risco à doença periodontal, e desta forma, minimizar seus efeitos negativos relacionados à destruição dos tecidos de suporte.

Perspectivas Futuras

A transição epidemiológica observada em vários países evidenciou importante crescimento da população idosa com grandes desafios para a sociedade. Contudo, as doenças não devem ser encaradas como conseqüências inevitáveis do envelhecimento. Grande parte das causas de morbidade pode ser reduzida, desde que sejam estruturados recursos de promoção de saúde, diagnóstico precoce e tratamento das doenças crônicas, minimizando suas seqüelas. Neste sentido, estudos com o segmento geriátrico são de fundamental importância para identificação dos grupos de risco e para elaboração de estratégias de intervenção que produzam impacto positivo na qualidade de vida dos idosos.

A presente pesquisa trouxe contribuição relacionada ao perfil de saúde bucal de idosos. Contudo, outros trabalhos são necessários para se aferir os efeitos desta condição precária na saúde geral dos gerontes. Desta forma, é fundamental, por exemplo, o estudo da influência do péssimo estado das próteses totais ou do edentulismo sobre o estado nutricional do idoso; ou ainda, trabalhos enfatizando a autopercepção do idoso sobre sua saúde bucal, já que existe a tendência entre os idosos em acreditar que a perda dentária é conseqüência direta do envelhecimento. Cabe ressaltar que a saúde bucal, como parte integrante da saúde geral é norteadora de envelhecimento saudável.

A imunogerontologia representa importante linha de pesquisa baseada na investigação do efeito das variações genéticas em doenças que acompanham o envelhecimento. Avanços no registro do genoma humano

permitiram a genotipagem dos polimorfismos genéticos mais freqüentes, em especial, os polimorfismos de base única (SNPs). O projeto internacional HAPMAP identifica e cataloga os principais SNPs que ocorrem no genoma humano e caracteriza suas freqüências alélicas em diferentes grupos étnicos (www.hapmap.org).

Espera-se que com esta fonte de variações genéticas, pesquisadores realizem investigações para identificar polimorfismos com papel importante na etiologia de doenças e desenvolvam novas estratégias de diagnóstico e tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Referências Bibliográficas

- 1- Beck J. The epidemiology of root surface caries. *J Dent Res* 1990;69:1216-1221.
- 2- Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodont Res* 2007;42:219-227.
- 3- Bourgeois D, Nihtila A, Mersel A. Prevalence of caries and edentulousness among 65-74-years-olds in Europe. *Bull World Health Organ.* 1998;76(4):413-417.
- 4- Bulgarelli AF, Manço AR. Idosos vivendo na comunidade e a satisfação com a própria saúde bucal. *CS Col*, 2007
- 5- Calich VLG, Vaz CAC. *Imunologia básica*. São Paulo, Artes Médicas, 1989.
- 6- Camarano AA, Kanso S, Mello JM. Como vive o idoso brasileiro? In: Camarano AA. *Os novos idosos brasileiros. Muito além dos 60?* Rio de Janeiro: IPEA, 2004.
- 7- Colussi CF, Freitas SFT, Calvo MCM. Perfil epidemiológico da cárie e do uso e necessidade de prótese na população idosa de Biguaçu, Santa Catarina. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7(1):88-97.
- 8- Colussi CF, Freitas SFT. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2002;18:1313-20.
- 9- Donati M, Berglundh T, Hytonen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 474–479.
- 10- Duarte PM, de Oliveira MCG, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Overexpression of interleukin-1 β and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodont Res* 2007;42:377-381.

- 11- Ellen RP. Determinantes ecológicos das cáries de superfície radicular. In: Bowen WH & Tabak LA. Cariologia para década de 90. 1ª ed, São Paulo: Editora Santos; 1995. p.319-32.
- 12- Ettinger RL. Oral health needs of the elderly – an international review. *Int Dent J* 1993;32:348-354.
- 13- Fassmann A, Izakovicova Holla L, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252 (A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G) tumor necrosis facto-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol Res* 2003;38:394-399.
- 14- Folwaczny M, Glas J, Török HP, Mende M, Folwaczny C. Lack of association between TNF α G-308A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31:449-453.
- 15- Freitas EV, Py L, Neri AN, Cançado FLX, Gorzoni LM, Rocha SM. Tratado de geriatria e gerontologia, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
- 16- Galbraith GMP, Hendley TM, Sanders JJ, Palesh Y, Pandy JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:705-709.
- 17- Górska R, Gregorek H, Kowalki J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1046-1052.
- 18- Guinta S. Is inflammaging an auto(innate) immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing* 2006;3:12.
- 19- Imazato S, Ikebe K, Nokubi T, Ebisu S, Walls AW. Prevalence of root caries in a select population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil* 2006;33(2):137-43.
- 20- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Diretoria de Pesquisas, coordenação de trabalho e rendimento, pesquisa nacional por amostra de domicílios 2004-2005. Disponível em: <http://ibge.gov.br>

- 21- Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Interações entre parasita e hospedeiro na doença periodontal. In:Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 4ª ed, Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;2005. p148-171.
- 22- Kinane DF, Shiba H, Hart T. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2005;39:91-117.
- 23- Kornman KS, Crane A, Wang HY et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72-77.
- 24- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):159-179.
- 25- Loos BG, Van der Velden U. A genética relacionada à periodontite. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 4ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 376-388.
- 26- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000 1997;71:1699-1707.
- 27- Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, J. E., Segal, N. L., Bouchard, T. J. Jr & Pihlstrom, B. L. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;62, 293–299.
- 28- Ministério da Saúde. Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal: Brasil, Zona Urbana, 1986. Brasília: Divisão Nacional de Saúde Bucal, MS.
- 29- Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003. Condição de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. <http://www.cfo.org.br>.
- 30- Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Bonafe M, Monti D, Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing* 2003;2(4):419-432.
- 31- Myliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwka A. Increase of Interlukin 6 and decrease of interleukin 2 production during aging process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev* 1998;100:313-328.

- 32- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Citocinas. In: Stites DP & Terr AI. *Imunologia Básica*. 1ª. Ed, Rio de Janeiro, Prentice-Hall do Brasil, 1992. p.61-78.
- 33- Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol* 1999;1:110-6.
- 34- Papapanou PN, Lindhe J. Epidemiologia das doenças periodontais. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. 4ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 49-73.
- 35- Parajara E. Guzzo F. Sim, é possível envelhecer saudável! *Rev Assoc Paul Cirur Dent* 2000; 54:91-99.
- 36- Pereira MG. Estrutura, vantagens e limitações dos principais métodos. In: Pereira MG. *Epidemiologia teoria e prática*. 2ª. Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 289-306.
- 37- Pereira MG. Indicadores de Saúde. In: Pereira MG. *Epidemiologia teoria e prática*. 2ª. Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 49-73.
- 38- Pucca Jr GA. Perfil do edentulismo e do uso de prótese dentária em idosos residentes no município de São Paulo. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia). Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP – Escola Paulista de Medicina.
- 39- Ramos LR. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso, São Paulo. *Cad Saúde Pub* 2003; 19:793-798.
- 40- Reis SCGB, Higino MASP, Melo HMD, Freire MCM. Condição de saúde bucal de idosos institucionalizados em Goiânia-GO, 2003. *Rev Bras Epidemiol* 2005; 8(1):67-73.
- 41- Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in elderly. *Mech Ageing Dev* 1998;102:199-209.
- 42- Rosa AGF, Fernandez RAC, Pinto VG, Ramos LR. Condição de saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no município de São Paulo. *Rev Saúde Pub* 1992;26:155-60.

- 43- Slade GD & Spencer AJ, Gorkic E, Andrews G. Oral health status and treatment needs of non-institutionalized persons aged 60+ in Adelaide, South Australia. *Aust Dent J* 1993;38(5):373-80.
- 44- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M A, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1988;25:134-144.
- 45- Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF α) -1031/ -863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in japanese. *J Clin Periodontol* 2003;30:524-531.
- 46- Spanish Geriatric Oral Health Research Group (SGOHRG). Oral health issues of Spanish adults aged 65 and over. *Int Dent J* 2001;51(3suppl):228-34.
- 47- Takashiba S & Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006;40:94-106.
- 48- Taylor, JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;35:158-182.
- 49- Tervonen T, Raunio T, Kanuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2007;34:377-383.
- 50- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SRP. 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.
- 51- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of polimorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;43:02-132.

ANEXO A

Fichas clínicas e de anamnese



ANAMNESE

ESTÁ EM TRATAMENTO MÉDICO? QUAL(IS)?	() SIM	() NÃO
TOMA MEDICAMENTOS? QUAL(IS)?	() SIM	() NÃO
COSTUMA TER DESMAIOS OU CONVULSÃO?	() SIM	() NÃO
É FUMANTE?	() SIM	() NÃO
USA BEBIDA ALCOÓLICA COM FREQUÊNCIA?	() SIM	() NÃO
FAZ REPOSIÇÃO HORMONAL?	() SIM	() NÃO
TEM ALERGIA A MEDICAMENTOS? QUAL(IS)?	() SIM	() NÃO
DISTÚRBIOS CARDÍACOS?	() SIM	() NÃO
PROBLEMAS GÁSTRICOS? QUAL(IS)?	() SIM	() NÃO
PROBLEMAS RENAIIS?	() SIM	() NÃO
É HIPERTENSO? Pressão arterial:	() SIM	() NÃO
TEM PROBLEMA DE CICATRIZAÇÃO?	() SIM	() NÃO
TEM DIABETES?	() SIM	() NÃO
TEM OU TEVE HEPATITE?	() SIM	() NÃO
TEM OU TEVE ALTERAÇÕES NA TIREÓIDE?	() SIM	() NÃO
TEM OU TEVE ALGUMA DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL (AIDS, SÍFILIS...)	() SIM	() NÃO
JÁ FEZ TRATAMENTO DE GENGIVA? HÁ QUANTO TEMPO?	() SIM	() NÃO
RANGE OS DENTES?	() SIM	() NÃO

HISTÓRIA PREGRESSA QUANTO `A PERDA DE DENTES:

Declaro serem verdadeiras as informações prestadas neste questionário.

Brasília, _____ de _____ de _____.

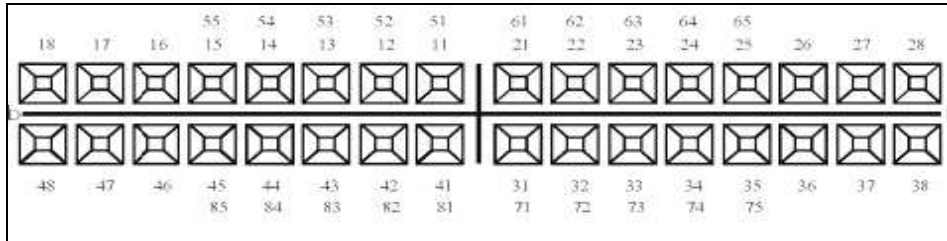
assinatura do paciente ou responsável

assinatura do pesquisador

FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO AOS IDOSOS

Nome/Prontuário	Data de nascimento
-----------------	--------------------

Odontograma



- LEGENDA**
- Cárie cavitada (vermelho)
 - Cárie sem cavidade (verde)
 - Restauração satisfatória (azul)
 - Restauração Insatisfatória (preto)
 - Dente Ausente (cruz)
 - Prótese Fixa (listra)

NO. DENTES CARIADOS:
NO. DENTES PERDIDOS:
NO. DENTES RESTAURADOS:
NO. TOTAL DE DENTES PRESENTES:

Condição das restaurações

Característica	Score	Critério USPHS modificado	Dentes
1. CÁRIE SECUNDÁRIA	A	sem evidência de lesão de cárie na interface dente-restauração	
	B	com lesão de cárie na interface dente-restauração	
2. DESCOLORAÇÃO MARGINAL	A	sem descoloração marginal	
	B	descoloração marginal na interface dente-restauração	
	C	descoloração na margem em direção à parede pulpar	
3. TEXTURA SUPERFICIAL	A	Lisa	
	B	ligeiramente rugosa ou porosa que pode ser repolida	
	C	rugosa e não pode ser repolida	
4. INTEGRIDADE MARGINAL	A	sem evidência de fratura marginal	
	B	evidência de fratura mas sem expor a junção amelo-dentinária	
	C	dentina ou material de base exposto	
	D	restauração está móvel, fraturada ou deslocada	
5. ESTABILIDADE DE COR	A	sem alteração na cor, brilho e translucidez	
	B	alteração normal de cor, brilho e translucidez	
	C	alteração de cor, brilho e translucidez fora do padrão	
6. FRATURA	A	sem evidência de fratura de corpo	
	B	Fraturada	

Condição da Prótese

Arcada Superior:

- () ausência total de dentes num arco (edentulismo) sem a presença de próteses
- () ausência dental de um ou mais elementos, com prejuízo estético e/ou funcional
- () Presença de próteses com comprometimento estético e/ou funcional (próteses quebradas, mal adaptadas, associadas a lesões na mucosa, com desgaste excessivo, sem retenção, outros: _____).
- () Presença de próteses satisfatórias.
- () Presença de todos os dentes, não usa prótese.

Arcada Inferior:

- () ausência total de dentes num arco (edentulismo) sem a presença de próteses
- () ausência dental de um ou mais elementos, com prejuízo estético e/ou funcional
- () Presença de próteses com comprometimento estético e/ou funcional (próteses quebradas, mal adaptadas, associadas a lesões na mucosa, com desgaste excessivo, sem retenção, outros: _____).
- () Presença de próteses satisfatórias.
- () Presença de todos os dentes, não usa prótese.

Outras observações: _____

Periograma

Dente	Profundidade da bolsa				IS	IP	Envolvimento de Furca	Mobilidade Dentária	Recessão Gengival		Diagnóstico					
	M	D	V	L					V	L	1	2	3	4	5	
18					X	X										
17					X	X										
16					X	X										
15					X	X										
14					X	X										
13					X	X										
12					X	X										
11					X	X										
21					X	X										
22					X	X										
23					X	X										
24					X	X										
25					X	X										
26					X	X										
27					X	X										
28					X	X										
38					X	X										
37					X	X										
36					X	X										
35					X	X										
34					X	X										
33					X	X										
32					X	X										
31					X	X										
41					X	X										
42					X	X										
43					X	X										
44					X	X										
45					X	X										
46					X	X										
47					X	X										
48					X	X										

Legenda:

IS – índice de sangramento

IP – índice de placa visível

Diagnóstico:

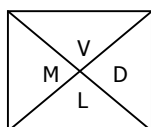
1: Gengivite

2: Periodontite leve (1 a 2 mm de perda de inserção clínica)

3: Periodontite moderada (3 a 4 mm)

4: Periodontite grave (acima de 5 mm)

5: dente condenado à extração



ANEXO B

Carta de Aprovação do Artigo Científico 1

pelo Periódico Ciência e Saúde Coletiva

Perfil da Condição Bucal de Idosas do Distrito Federal



Prezado(a) Ana Maria Costa,

Informamos que seu artigo **PERFIL DA CONDIÇÃO BUCAL DE IDOSAS DO DISTRITO FEDERAL**, foi aprovado **sob condição**, conforme pareceres abaixo.

O prazo para reapresentação do artigo, com as modificações é de até 30 dias, após este prazo consideramos que o artigo não será reapresentado.

Peço a gentileza de formatar o texto conforme as normas de publicação encontradas no site (instruções para colaboradores).

Para entrar em sua área restrita, acesse o endereço <http://www.cienciaesaudecoletiva.com.br> e, na caixa com o título de **Acesso Restrito**, informe seus dados de acesso:

Login: anam
Senha: anamaria

Em seguida, clique no botão "**Meus Artigos**", à esquerda. O sistema lhe mostrará todos os artigos inseridos por você.

Atenciosamente,

Raimunda M. do Nascimento Mangas
Editora Executiva da Revista Ciência & Saúde Coletiva

Veja a seguir as informações que poderão ajudá-lo na criação deste novo artigo:
- De acordo com as normas da revista este artigo possui estrutura e metodologia adequada para a pesquisa e os dados obtidos respondem a proposição, e os resultados e discussão compõem um quadro adequado para este trabalho
- Segundo nosso critério, o artigo é importante para a saúde pública do DF, na medida que proporciona informações importantes sobre a condição de saúde bucal das idosas. Entretanto, parece importante conhecer a origem das pessoas, o artigo mostra que trata-se de um programa de uma Faculdade, mas as pacientes provêm de onde? Como foi selecionada a amostra ou trata-se de algum universo particular? gostaria ver no artigo essa resposta. No DF por outro lado já existem outros artigos que tem estudado os problemas dos Idosos, se mal não lembro no curso de Especialização em Saúde Coletiva da UnB, um artigo especial o de Fernando Chamoschine Fernandes. vale a pena re-ver a literatura sobre estudos similares no DF, para melhor produzir e discutir os achados. Não estou seguro do site mas vi algumas destas monografias no www.unb.br/sbc/ no banco de monografias.

Revista Ciência & Saúde Coletiva da Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva
Av. Brasil, 4036, sala 700 - Manguinhos - 21040-361 - Rio de Janeiro - RJ
(21) 388-29153 e (21) 2290-4893 - Todos os direitos reservados para ABRASCO.
Desenvolvido por ZANDA Multimeios da Informação.

ANEXO C

Comprovante de encaminhamento do

Artigo Científico 2 ao Periódico Gerodontology

Interleukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor-alpha (G-308A) gene

polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis



Dear Dr Costa,

Manuscript no. 1404: Interleukin-6 (G-174C) and tumor necrosis factor-alpha (G-308A) gene polymorphisms in geriatric patients with chronic periodontitis

We acknowledge receipt of the above manuscript. Thank you for sending this paper for our consideration.

My apologies for not confirming receipt of your manuscript earlier; I have been on holiday for a few days.

With kind regards

Barbara Tucker

Executive Secretary *Gerodontology*

ANEXO D

Versão em português do Artigo Científico 2



**Polimorfismo dos genes da Interleucina-6 (G-174C) e do fator de necrose tumoral-
alfa (G-308A) em pacientes geriátricos com periodontite crônica**

Costa AM¹

Guimarães MCM²

Nóbrega OT³

Bezerra ACB⁴

¹ Universidade Católica de Brasília – Curso de Odontologia – Dentística

² Universidade Católica de Brasília – Curso de Odontologia - Periodontia

³ Universidade Católica de Brasília - Pós-graduação *Strictu Sensu* em Gerontologia

⁴ Universidade de Brasília – Pós-graduação em Ciências da Saúde

Polimorfismo genético e periodontite.

Autor Responsável

Ana Maria Costa

SQSW 305 Bloco L Apt. 201 – Sudoeste – Brasília – DF –

BRAZIL – CEP: 70673463

Tel: 55 61 81169526

e-mail: anam@ucb.br ou amc@stj.gov.br

Palavras-chaves: periodontite, fator de necrose tumoral, polimorfismo, interleucina-6,
envelhecimento

Resumo

Histórico e objetivo: Periodontite é uma doença inflamatória crônica cujos fatores genéticos podem ter papel importante em sua severidade. O polimorfismo na região promotora dos genes da interleucina -6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral - α (TNF- α) podem causar mudanças na produção destas citocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do polimorfismo da interleucina-6 (G-174C) e do fator de necrose tumoral- α (G-308A) na severidade da doença periodontal crônica.

Métodos: Foram selecionadas 65 mulheres idosas, dentre elas 17 com periodontite crônica generalizada de grau moderado, 21 com periodontite crônica generalizada de grau severo e 27 pacientes com periodonto saudável. O DNA de todas as pacientes foi isolado e a reação em cadeia da polimerase foi realizada.

Resultados: Os dados mostraram diferença significativa na distribuição alélica e na frequência dos genótipos do gene da IL-6 entre pacientes com doença periodontal e controles. Os pacientes que apresentavam o genótipo G/G da IL-6 foram os mais severamente afetados pela doença. O polimorfismo do gene do TNF- α não mostrou associação estatística entre pacientes com periodontite e pacientes saudáveis.

Conclusão: Os resultados sugerem que o polimorfismo do gene da IL-6 pode ser associado à presença de periodontite crônica. Em contrapartida, o polimorfismo do gene do TNF- α não mostrou indícios de influência na progressão da periodontite crônica nesta população de mulheres idosas brasileiras.

Introdução

O perfil genético de um indivíduo pode influenciar na susceptibilidade a diversas doenças e condições de saúde. A doença periodontal, uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns, causada pelo crescimento de bactérias Gram-negativas específicas, não é uma exceção (1). Recentemente, a influência de fatores genéticos na patogênese da doença periodontal foi avaliada. Entretanto, o papel exato destes fatores na susceptibilidade à periodontite não foi elucidado (2). O polimorfismo do gene que codifica moléculas do sistema imunológico, tais como citocinas pró-inflamatórias, foi sugerido como fator genético colaborador para o desenvolvimento da periodontite (3). As citocinas possuem importante papel na iniciação e na amplificação da resposta inflamatória. A resposta inflamatória local na doença periodontal é iniciada na presença de diversos fatores de virulência derivados de bactérias, tais como os lipopolisacarídeos, que estimulam a produção de diversas citocinas (4). As diferenças na taxa de produção de alguns mediadores podem conduzir à destruição do tecido e do osso (2, 5).

A base biológica para a associação entre o polimorfismo do gene de certas citocinas e a doença periodontal é que a presença de determinados alelos do gene podem levar a mudanças na produção das citocinas (2). Os estudos sugerem que a severidade da periodontite pode ser diferente ao comparar portadores de alelos raros, tais como o

alelo A do gene do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o alelo C do gene da interleucina-6 (IL-6) (1, 6, 7, 8, 9).

Questão importante relacionada a este assunto refere-se ao seguinte: quais são os argumentos que explicam porque o polimorfismo do gene da IL-6 e do TNF- α podem ser bons candidatos para estudos genéticos?

O TNF- α é uma das citocinas mais extensamente estudadas em relação à periodontite (1). É um mediador imunológico com propriedades pró-inflamatórias que foi encontrado em alta quantidade no fluido crevicular gengival e em tecido gengival de sítios afetados de pacientes com periodontite crônica. O TNF- α tem a capacidade de induzir à destruição tecidual e de aumentar a reabsorção óssea (7, 10). O polimorfismo na região promotora do gene do TNF- α na posição -308 (G - A) já foi investigado (5, 11, 12). O alelo A foi associado à elevada produção de TNF- α (7, 13). Entretanto, há resultados conflitantes no que diz respeito à relevância funcional deste polimorfismo, e por este motivo, são necessárias novas pesquisas nesta área para confirmar a associação entre o polimorfismo -308 G/A e a doença periodontal.

A interleucina-6 está envolvida na patogênese de diversas doenças inflamatórias, tais como a artrite reumatóide e a doença de Alzheimer, consistindo, portanto, em importante mediador da resposta imunológica (8). Tendo em vista o importante papel desta citocina no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, alguns investigadores estudaram a associação entre o polimorfismo na região promotora do gene da IL-6 na posição -174 e a periodontite crônica e encontraram resultados interessantes (9, 14). Níveis mais elevados de IL-6 foram encontrados em locais com inflamação periodontal em comparação com locais não afetados pela doença (15). Ademais, os estudos genéticos mostraram que a presença do alelo raro pode representar uma função protetora já que a presença do alelo C diminui a produção desta citocina (9).

Apesar dos inúmeros estudos genéticos, muitos apresentam problemas de ordem metodológica, tais como, a presença de fatores de confundimento que não são adequadamente neutralizados. A idade, por exemplo, é uma variável que deve ser considerada e uniformizada entre o grupo teste e controle (16). Além disso, variáveis como gênero, raça e fatores sócio-econômicos devem ser controlados. Estes fatores de confusão podem exercer grande influência na expressão de determinados fenótipos (2).

Tendo em vista que a influência dos diferentes genótipos dos genes do TNF- α e da IL-6 na doença periodontal não ter sido elucidada, o objetivo deste estudo foi

investigar a possível associação entre os polimorfismos dos genes destas duas citocinas e a doença periodontal crônica em uma população homogênea de mulheres idosas brasileiras.

Métodos

Os sujeitos do presente estudo foram selecionados a partir de uma lista de mulheres idosas que participam do Projeto de Promoção de Saúde de Idosas da Universidade Católica de Brasília. Foi utilizado meio de comunicação em massa para convidar mulheres acima de 60 anos de Brasília e entorno para participar do Projeto o qual envolve ações de promoção de saúde e acompanhamento ambulatorial. Outros estudos relacionados aos resultados destas atividades já foram publicados (17,18,19).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todas as participantes. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Brasília, Brasil.

Todas as pacientes selecionadas eram do gênero feminino, brasileiras e com idade acima de 60 anos. As pacientes foram submetidas à anamnese e ao exame clínico periodontal. O exame periodontal foi realizado com sonda periodontal milimetrada estéril do tipo “Michigan 0” com marcações de Williams (Neumar, São Paulo, SP, Brasil) em quatro sítios por dente (mesio-vestibular, disto-vestibular, lingual/palatina e vestibular). O exame incluiu a verificação da perda de inserção clínica, profundidade de sondagem clínica, índice de placa supragengival (20) e índice de sangramento à sondagem (20). A perda de inserção clínica foi mensurada por meio da distância entre a junção cimento-esmalte e a base do sulco gengival. A profundidade de sondagem clínica foi medida por meio da distância entre a margem do tecido gengival e o fundo do sulco gengival (21). Todos os sítios foram avaliados dicotomicamente para registrar o índice de placa e o índice de sangramento (20). Realizou-se exame radiográfico periapical de todos os dentes presentes (Ektaspeed, Eastman Kodak Co, Rochester, U.S.A.).

A severidade da doença periodontal de cada paciente foi avaliada com base na perda da inserção clínica (22). Os pacientes foram divididos em três grupos:

- Grupo 1 (controle): sujeitos com bom padrão de higiene bucal, baixo índice de sangramento gengival e baixo índice de placa, ausência de perda de inserção clínica e ausência de perda óssea determinada por exame radiográfico. Nenhum dos pacientes do grupo controle apresentavam histórico de periodontite ou perda dentária devido à mobilidade.

- Grupo 2 (periodontite crônica generalizada de grau moderado): Cada paciente apresentava mais de 30% dos sítios com perda de inserção clínica (≥ 3 mm) associada com a presença de sinais clínicos da doença (sangramento à sondagem e acúmulo de placa) e perda óssea confirmada por exame radiográfico.

- Grupo 3 (periodontite crônica generalizada de grau severo): sujeitos com mais de 30% dos sítios afetados com perda de inserção clínica (≥ 5 mm) associada à presença de sinais clínicos da doença (sangramento à sondagem e acúmulo de placa) e perda óssea confirmada por exame radiográfico.

Os critérios de exclusão foram presença de doenças sistêmicas com necessidade de profilaxia antibiótica ou condições que pudessem afetar o curso da doença periodontal (diabetes mellitus, doenças auto-imunes, hepatite, AIDS) e uso de antimicrobianos (sistêmico ou subgengival) ou utilização crônica de anti-inflamatórios. Todas as pacientes selecionadas eram não-fumantes.

Identificação dos genótipos

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico (5 ml) coletados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A extração foi realizada seguindo-se protocolo padrão (23).

O polimorfismo -174 G/C na região promotora do gene humano da IL-6 (s1800795) e o polimorfismo -308 G/A na região promotora do gene humano do TNF- α (rs1800629) foram determinados por sequenciamento direto em reação de cadeia da polimerase (PCR).

Deteção de polimorfismos bi-alelicos:

Para o gene da IL-6, fragmento de 628bp foi amplificado utilizando-se um par de *primers* específicos: 5'-GAACACAGAAGAAGCTCAGATGACTGG-3' (sense) and 5'-AGGAGTTCATAGCTGGGCTCCTGGAG-3' (antisense). Os *primers* usados para o gene do TNF- α foram os seguintes: *primer* A (sense) 5'CCTCAAGCCTGCCACCAAGC 3' e *primer* B (antisense) 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 3'. O tubo de cada reação foi constituído de 100 ng DNA, 10mM Tris-HCL pH 9.2, 25mM KCL, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 20pmol de cada *primer*, 0.5 μ g de albumina de galinha purificada e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brasil) em um volume final de 50 μ l. Após 1 minuto de iniciação a 80 C° e desnaturação inicial de 2 minutos a 94 C°, a amplificação foi realizada com 36 ciclos de 40 segundos a 94 C°, 45 segundos a 64 C° e 50 segundos

a 72 C° seguida de 5 minutos de extensão a 72 C°. Cada produto de PCR foi diretamente sequenciado no ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando primer 5'- GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC- 3' para IL-6 e o primer A previamente descrito para TNF- α . Cada seqüência obtida foi examinada por meio do Staden software package (MRC, Cambridge, UK) e confirmado por inspeção visual (19).

Análise estatística

As comparações foram feitas entre as freqüências de genótipo (Tabela 2) e de alelos (Tabela 3) considerando os grupos de doentes e o grupo controle. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste Chi-quadrado.

Devido ao pequeno número de indivíduos homozigotos para o alelo C do gene da IL-6 e o alelo A do TNF- α (Tabela 2 e 3), os genótipos -308 A/A do TNF- α e o -174 C/C da IL-6 foram unificados com os sujeitos heterozigotos (também portadores do alelo raro) e a diferença estatística foi determinada pelo teste exato de Fisher (Tabela 4).

Os dados estatísticos foram analisados pelo programa SigmaStat for Windows Version 3.11 (Systat Software Inc., California, USA). Para todos os cálculos estatísticos o nível de significância foi de 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Valores médios (\pm desvio padrão) referentes aos parâmetros clínicos da população selecionada estão sumarizados na tabela 1. Amostras de DNA de 65 mulheres idosas foram analisadas em relação ao polimorfismo -174 G/C do gene da IL-6 e ao polimorfismo -308 G/A do TNF- α .

Tabela 1 – Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros clínicos dos três grupos experimentais

<i>Parâmetros clínicos</i>	<i>Grupo 1 n=27</i>	<i>Grupo 2 n=17</i>	<i>Grupo 3 n=21</i>
Idade	68,70 \pm 7,22	68,11 \pm 6,18	68,00 \pm 4,68
Profundidade (mm)	1,76 \pm 0,35	1,91 \pm 0,27	2,54 \pm 0,61
Perda de inserção (mm)	0,0	3,64 \pm 0,49	7,71 \pm 1,30
Placa (%)	0,25 \pm 0,15	0,28 \pm 0,12	0,52 \pm 0,30
Sangramento (%)	0,28 \pm 0,14	0,63 \pm 0,35	0,73 \pm 0,26

Tabela 2 – Distribuição dos genótipos da IL-6 e TNF- α no grupo de pacientes saudáveis e nos grupos com periodontite moderada e severa.

Genótipos	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
TNF-α G/G	18	66,7	15	88,2	18	85,7	P=0,153
TNF-α G/A	6	22,2	0	0,0	1	4,8	
TNF-α A/A	3	11,1	2	11,8	2	9,5	
IL-6 G/G	12	44,4	15	88,2	16	76,2	P=0,019*
IL-6 G/C	12	44,4	2	11,8	5	23,8	
IL-6 C/C	3	11,2	0	0,0	0	0,0	

*Nível de significância 5%.

Tabela 3 – Frequência alélica da IL-6 e TNF- α nos grupos saudável e com periodontite moderada e severa.

Alelo	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
TNF-α G	42	77,8	30	88,2	37	88,1	P=0,285
TNF-α A	12	22,2	4	11,8	5	11,9	
IL-6 G	36	66,7	32	94,1	37	88,1	P=0,002*
IL-6 C	18	33,3	2	5,9	5	11,9	

*Nível de significância 5%.

Diferença significativa foi encontrada na distribuição genotípica entre pacientes doentes e controles (Tabela 2). A proporção de indivíduos portadores do alelo G da IL-6 foi significativamente maior no grupo de pacientes com periodontite moderada ou severa (Tabela 3). Não foi observada diferença estatística na distribuição dos genótipos ou na distribuição alélica do TNF- α (Tabelas 2 e 3).

Ao analisar a tabela 4, segundo modelo de dominância (GG vs GC+CC) relacionado ao gene da IL-6, indivíduos homocigotos G foram significativamente mais

afetados pela doença periodontal do que aqueles portadores do alelo C. Por outro lado, para o TNF- α , indivíduos homocigotos G não mostraram diferença estatística quando comparados com homocigotos A e heterocigotos (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de genótipos da IL-6 e TNF - α de acordo com modelo de dominância (GG vs GA+AA e GG vs GC+CC) nos grupos controle e com doença periodontal (moderada a severa)

Genotipo	Saudáveis		Moderada-a-severa		p-valor
	n	%	n	%	
TNF GG	18	66,7	33	86,8	P=0,069
TNF GA+AA	9	33,3	5	13,2	
IL-6 GG	12	44,5	31	81,6	P=0,003*
IL-6 GC+CC	15	55,5	7	18,4	

*Nível de significância 5%.

Discussão

O presente estudo investigou a frequência de dois polimorfismos de nucleotídeo único (interleucina-6 -174G/C e fator de necrose tumoral- α -308G/A) em idosos e avaliou sua correlação com as condições periodontais. Embora inúmeros autores reportaram associação entre polimorfismos e doença periodontal, poucos estudos preocuparam-se em neutralizar fatores de confundimento e consideraram a importância dos fatores ambientais na categorização de casos e controles.

A crítica existente entre os estudos de correlação relacionados à doença periodontal refere-se à variação na literatura quanto à conceituação e classificação da doença e sua severidade. Ademais, há diferenças na definição dos casos e controles. O presente estudo definiu e classificou a doença periodontal de acordo com a Academia Americana de Periodontologia (22). Os parâmetros clínicos da amostra do presente trabalho podem ser analisados na tabela 1. Vale ressaltar que o grupo controle não mostrou perda de inserção clínica enquanto os grupos com a doença revelaram perda de inserção clínica significativa associada à presença de sinais clínicos de doença

periodontal tais como alto índice de sangramento e placa, confirmando a atividade da doença.

Outras questões que merecem consideração estão relacionadas aos fatores ambientais, por exemplo, o hábito de fumar, a higiene bucal, doenças sistêmicas ou características gerais (classe sócio-econômica, idade e gênero) já que todos exercem influência na expressão de determinados fenótipos (2). A amostra do presente estudo apresenta características homogêneas haja vista que casos e controles são semelhantes: todos os participantes são mulheres idosas brasileiras, com nível sócio-econômico baixo (18) e nenhuma apresenta o hábito de fumar. Estas semelhanças tornam as comparações entre grupos mais acurada, aumentando o grau de validade do estudo.

A literatura demonstrou que ocorre aumento do nível de IL-6 no soro à medida que ocorre o avanço da idade. Este aumento inicia-se entre 30-40 anos, torna-se mais evidente independentemente de quaisquer desordens crônicas e mostra-se proeminente na terceira idade (24,25). Alguns autores justificam esta condição através do fenômeno denominado *inflammaging*, o qual é usado para caracterizar estado de atividade inflamatória basal causada por agentes antigênicos ou por produção idiopática de citocinas (16,25). Por esta razão, cabe enfatizar que a população geriátrica apresenta particularidades referentes ao aspecto imunológico que devem ser consideradas. Portanto, a idade deve ser considerada como importante fator de confundimento. No presente estudo, casos e controles apresentaram idades similares, acima de 60 anos.

O principal achado do presente estudo foi que o genótipo G/G -174 da interleucina-6 foi estatisticamente associado à doença periodontal moderada a severa após neutralização dos fatores de confusão (Tabela 2 e 4). Tervonen et al. (14) relataram evidente associação entre o genótipo G/G da IL-6 e susceptibilidade à periodontite crônica em população Caucásica da Finlândia, enquanto Trevillato et al. (9) reportaram dados similares em população brasileira. Esta associação genética com o grau de severidade da periodontite é consistente com os achados da presente pesquisa. Os resultados também corroboraram a verificação mencionada por Trevillato et al (9) a qual realça que a presença do alelo C pode representar função protetora visto que este fato pode levar à produção reduzida de IL-6. Os resultados da presente pesquisa mostraram que os portadores do alelo C foram significativamente menos afetados pela doença periodontal quando comparados aos portadores do alelo G (Tabela 3).

Apesar de numerosas pesquisas sobre o papel do TNF- α na progressão da doença periodontal (26,27), no presente estudo não foi observado diferença estatística

entre os genótipos do TNF- α nos grupos comparados (Tabela 2 e 4). A distribuição do alelo A do polimorfismo do gene do TNF- α entre indivíduos com periodontite não se mostrou diferente do grupo controle (Tabela 3). Esta falta de associação aqui encontrada está em conformidade com outros estudos que reportaram que o polimorfismo do gene do TNF- α na posição -308 não pode ser identificado como fator de suscetibilidade ou severidade à doença periodontal (11,12,28,29). Por outro lado, Galbraith et al.(30) relataram que pacientes com doença periodontal portadores do alelo raro na posição -308 do gene do TNF- α apresentaram maior produção de TNF- α quando comparados aos não portadores. Contudo, em estudo anterior realizado pelos mesmos autores, não foi detectado diferença significativa na distribuição dos genótipos do TNF- α -308, embora os níveis de TNF- α encontrados tenham se mostrado mais altos em pacientes doentes portadores do alelo raro (27). Os resultados conflitantes podem ser atribuídos a diferenças do tamanho e na forma de seleção da amostra ou, ainda, devido ao efeito de fatores como fumo ou gênero não controlados.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Por se tratar de estudo com casuística estritamente feminina e idosa, não é possível extrapolar as conclusões para o gênero masculino ou para pacientes jovens já que a literatura demonstrou que gênero e idade podem exercer influência em estudos genéticos (2). Outra questão que deve ser considerada é que a presente pesquisa não foi delineada como investigação longitudinal. Conseqüentemente, os resultados devem ser analisados com cuidado. Estudos longitudinais com acompanhamento de pacientes devem ser conduzidos para confirmação dos achados.

É importante salientar que este é o primeiro estudo em que as variações genéticas da IL-6 foram relacionadas à doença periodontal considerando população idosa. Inúmeros estudos epidemiológicos já demonstraram aumento da perda de inserção clínica periodontal à medida que aumenta a idade (31). Portanto, a identificação de genes candidatos pode resultar em novos recursos diagnósticos para avaliação de risco da doença, diagnóstico precoce e individualização do tratamento (8).

Em conclusão, baseando-se nos presentes achados e na literatura disponível, existem dados insuficientes para confirmar a associação entre o polimorfismo do gene do TNF- α na posição -308 e doença periodontal. Em contrapartida, a avaliação do polimorfismo do gene da IL-6 na posição -174 revelou que o genótipo G/G foi significativamente correlacionado à presença de periodontite crônica em pacientes

idosas brasileiras. Estes achados sugerem que o alelo G pode exercer papel importante na progressão da doença periodontal nesta população. Entretanto, são necessárias investigações longitudinais para confirmação dos resultados.

Referências Bibliográficas

1. Takashiba S & Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2006;**40**:94-106.
2. Kinane DF, Shiba H, Hart T. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2005;**39**:91-117.
3. Kornman KS, Crane A, Wang HY et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:72-77.
4. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M A, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;**25**:134-144.
5. Donati M, Berglundh T, Hytönen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2005; **32**: 474–479.
6. Taylor, JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;**35**:158-182.
7. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;**32**(Suppl. 6):159-179.
8. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;**43**:102-132.
9. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SRP. 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.
10. Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K: Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 463–469.
11. Fassmann A, Izakovicova Holla L, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252 (A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G) tumor

- necrosis factor- α genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodont Res* 2003;**38**:394-399.
12. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Mende M, Folwaczny C. Lack of association between TNF α G-308A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; **31**:449-453.
 13. Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor- α gene (TNF α) -1031/ -863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:524-531.
 14. Tervonen T, Raunio T, Kanuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2007;**34**:377-383.
 15. Duarte PM, de Oliveira MCG, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Overexpression of interleukin-1 β and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodont Res* 2007;**42**:377-381.
 16. Giunta S. Is inflammaging an auto(innate) immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing* 2006;**3**:12.
 17. Karnikowski M, Córdova C, Oliveira RJ, Karnikowski MGO, Nóbrega OT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *Sao Paulo Med J* 2007;**125**:333-337.
 18. Bortolon PC, Medeiros EFF, Naves JOS, Karnikowski MGO, Nóbrega OT Analysis of the self-medication pattern among Brazilian older-adult women. *C S Col*, 13(4):1219-1226.
 19. Tonet AC, Karnikowski M, Moraes CF, Gomes L, Karnikowski MGO, Córdova C, Nóbrega OT. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. *Braz J Med Biol Res* 2008;**41**(1):47-53.
 20. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;**25**(4):229-35.
 21. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodont Res* 2007;**42**:219-227.

22. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1-6.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:1215.
24. Myliwska J, Bryl E, Foerster J, Myliwski A. Increase of Interlukin 6 and decrease of interleukin 2 production during aging process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev* 1998;**100**:313-328.
25. Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Bonafe M, Monti D, Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev* 2003;**2**(4):419-432.
26. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:1046-1052.
27. Galbraith, GM, Steed, RB, Sanders, JJ & Pandey, JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998;**69**: 428–433.
28. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG: Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 28–34.
29. Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006; **33**: 765–770.
30. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; **26**:705-709.
31. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; **29**:177-206.